

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**DANO DA RADIAÇÃO GAMA EM CROTAMINA
(TOXINA DA CASCAVEL BRASILEIRA)**

Tânia Alves da Costa e José Roberto Rogero

PUBLICAÇÃO IPEN 151

JULHO/1988

SÃO PAULO

**DANO DA RADIAÇÃO GAMA EM CROTAMINA
(TOXINA DA CASCAVEL BRASILEIRA)**

Tânia Alves da Costa 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

BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS

BRAZIL

SNAKES

TOXINS

IPEN - Doc - 3024

Aprovado para publicação em 25/09/87

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

DANO DA RADIAÇÃO GAMA EM CROTAMINA (TOXINA DA CASCAVEL BRASILEIRA)

Tânia Alves da Costa & José Roberto Rogero

RESUMO

Radiações ionizantes afetam a estrutura das moléculas devido à destruição das suas ligações químicas. Estas alterações químicas poderão levar a uma mudança nas propriedades biológicas das mesmas, como tem sido demonstrado na literatura. A Crotamina foi obtida a partir de um "pool" do veneno de Crotalus durissus terrificus através de cromatografia de exclusão molecular, sendo posteriormente irradiada em solução numa concentração de 2 mg/ml de NaCl 0,85% com radiação gama produzida por uma fonte de ^{60}Co . Foram adotadas as doses de 100 Gy, 250 Gy, 500 Gy, 1000 Gy e 2000 Gy (taxa de dose = $1,19 \cdot 10^3$ Gy/h). Realizou-se os seguintes ensaios: presença de grupos SH livres, determinação do conteúdo proteico, SDS-PAGE e imunodifusão. Observamos que houve um aumento do número de bandas na SDS-PAGE (sugerindo a formação de agregados protéicos) que foi proporcional ao aumento das doses. Pela imunodifusão não houve perda da atividade imunoquímica quando testadas contra o antisoro produzido pelo Instituto Butantan.

DAMAGE OF GAMMA RADIATION IN CROTAMINE (TOXIN OF BRAZILIAN RATTLESNAKE)

ABSTRACT

Ionizing radiations changes the molecular structure due to chemical bond destruction. These chemical alterations is able to change the biological properties of the macromolecules. Crotamine was obtained from Crotalus durissus terrificus venom by molecular exclusion chromatography and irradiated in concentration of 2 mg/ml in NaCl 0,85% with gamma radiation produced by a ^{60}Co source. We used doses of 100 Gy, 250 Gy, 500 Gy, 1000 Gy and 2000 Gy (dose rate = $1,19 \cdot 10^3$ Gy/h). We performed the following experiments: presence of free SH groups, proteic concentration, SDS-PAGE and immunodiffusion. Preliminary results showed an increase of the number of bands in SDS-PAGE suggesting the appearance of protein aggregates that was proportional to the dose increasing. The immunodiffusion data showed no modification of the immunochemical activity against the Butantan anti-sera.

INTRODUÇÃO

O veneno de cascavel brasileira Crotalus durissus terrificus é muito mais tóxico do que outros venenos pertencentes à mesma família por causar paralisia respiratória de origem periférica, embora este veneno possa também ter um efeito central. Há dois tipos de venenos produzidos por esta espécie, um contendo crotamina e outro sem crotamina, de acordo com a distribuição geográfica (Moussatché et al., 1956).

A crotamina é um polipeptídeo básico, de sequência conhecida, contendo 42 aminoácidos (Laure, 1975) e três pontes de dissulfeto (Conti et al., 1980). O peso molecular é de 4880 e o ponto isoelétrico de pH 10,3.

A fibra muscular é o alvo principal de ação da crotamina; induz a contração do músculo esquelético de gatos, ratos e camundongos (Gonçalves e Cheymol, 1971).

As primeiras investigações sobre o efeito de radiações ionizantes sobre proteínas foram iniciadas no começo deste século e uma vasta literatura agora existe sobre este assunto. Tanto a ação direta como a indireta de radiações ionizantes têm mostrado causar perda da atividade biológica, sendo esta enzimática, hormonal ou imunológica.

O ataque sobre alvos biológicos mediados pelos produtos de radiólise da água, como OH^\bullet , H^\bullet e e^-_{aq} , é definido como ação indireta de radiações ionizantes. Ação direta é o termo usado quando o alvo biológico é por si próprio excitado ou ionizado.

A irradiação leva a uma diminuição na antigenicidade e, ocasionalmente tem sido demonstrada a aquisição de novos determinantes antigênicos. Modificações na estrutura da proteína após a irradiação tem sido demonstradas por uma grande variedade de medidas físicas, lembrando que a conformação adotada pela proteína na forma nativa é estabilizada por ligações de hidrogênio. A estrutura secundária é um parâmetro essencial da função biológica.

Se irradiarmos as proteínas em solução aquosa, ocorrem com maior importância as reações de radiólise da água, produzindo os radicais OH^\bullet , H^\bullet e e^-_{aq} que passam a atuar com grande intensidade na produção do dano. Na literatura encontram-se vários estudos sobre reações destes radicais com substâncias biologicamente relevantes.

Radicais hidroxila (OH^\bullet) reagem numa proporção relativamente baixa com aminoácidos. A principal reação é a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo α C-H. Entretanto, onde os grupos β e γ C-H estão presentes, o ataque também pode ocorrer nestes sítios.

A proporção de reação é maior com aminoácidos aromáticos, onde as rea

ções são principalmente sobre o anel da estrutura. Com cisteína a abstração de hidrogênio do grupo-SH produz numa primeira etapa radicais RS° , os quais podem posteriormente dar radicais do tipo $RSSR^{\circ}$ e cátions $RSSR^{+}$ que podem ser formados da cisteína.

Os tipos de radicais produzidos nas reações dos radicais hidroxila com aminoácidos são, portanto, extremamente diversos.

É suposto que os radicais formados nas reações dos radicais de hidrogênio com aminoácidos sejam semelhantes às do radical hidroxila ou elétron hidratado. Infelizmente, devido às dificuldades de se investigar as reações do átomo de hidrogênio, existem relativamente poucas informações.

Elétrons hidratados, por exemplo, reagem com certas proteínas para dar principalmente $RSSR^{\circ}$ ou radicais histidina; já o radical hidroxila produz principalmente radicais de triptofano ou de tirosina.

Os vários mecanismos pelos quais as proteínas perdem sua atividade enzimática após a irradiação ainda não são completamente compreendidos.

Tem sido demonstrado que proteínas irradiadas podem formar ligações covalentes intermoleculares, as quais devem contribuir para sua precipitação em solução como agregados. Produtos de irradiação tais como estes devem também contribuir para a perda de atividade de proteínas.

MATERIAIS E METODOS

A partir de um "pool" de veneno bruto e seco de cascavel, oferecido pelo Instituto Butantan, realizou-se cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G50. Utilizou-se uma coluna de 80x1,6 cm, e o eluente foi ácido acético 0,1 M. Em cada cromatografia usou-se 200 mg de veneno em 2 ml do mesmo eluente (fig. 1).

A crotamina foi recromatografada na mesma coluna para garantir maior pureza da amostra.

A toxina foi submetida à radiação gama proveniente de uma fonte de ^{60}Co , com uma taxa de dose de 1.19×10^3 Gy/h nas doses de 100 Gy, 250 Gy, 500 Gy, 1000 Gy e 2000 Gy. A irradiação foi realizada em solução fisiológica numa concentração de 2 mg/ml, na presença de O_2 e em temperatura ambiente.

A determinação do conteúdo protéico nas amostras foi realizada pelo método de Lowry, modificado por Miller (1959), usando-se o soro albumina bovina (BSA) como padrão numa concentração de 1 mg/ml (fig. 2).

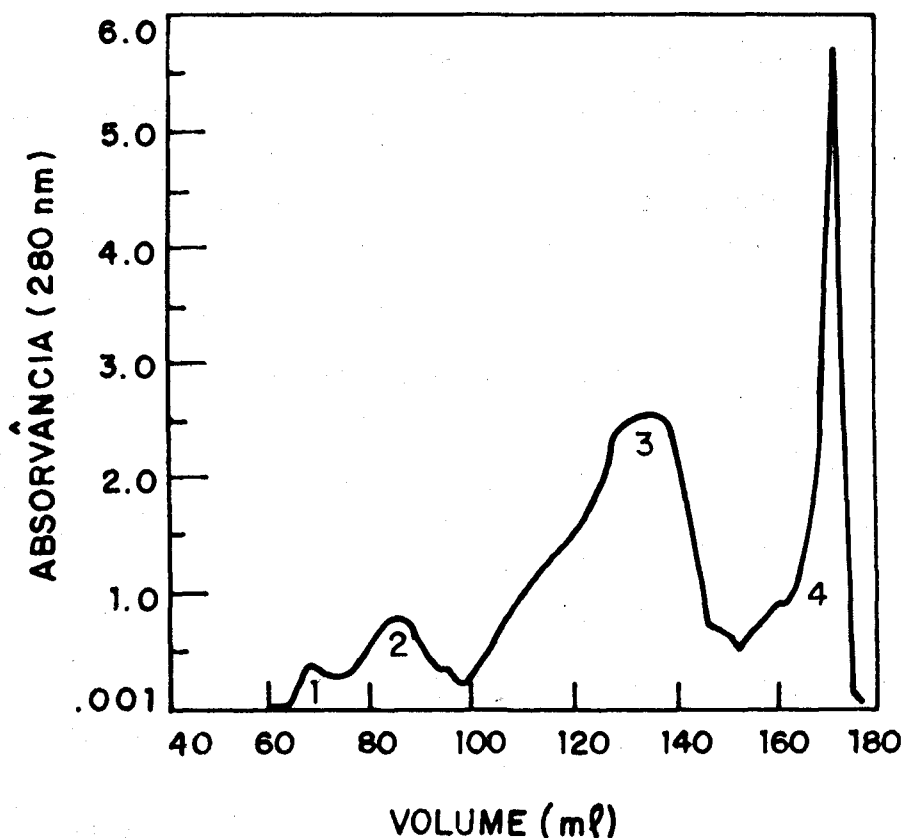
Para verificar a existência de grupos SH livres nas amostras utilizou-se o método de Ellman. A análise em SDS-PAGE (fig. 3) permite determi-

nar o peso molecular das amostras, e os padrões de peso molecular usados foram: BSA - 68000, ovalbumina - 45000, aldolase - 38000, quimotripsinogênio - 24000 e lisozina - 14300. Avaliamos, assim os pesos moleculares dos agregados protéicos produzidos após irradiação.

Na análise imunológica utilizou-se a reação de imunodifusão baseada no método de Ouchterlony. As amostras foram analisadas frente ao soro anticrotálico do Instituto Butantan (Fig. 4).

RESULTADOS

Fig. 1- Perfil cromatográfico-veneno bruto



Obs: o último pico corresponde à crotamina.

Tab 1 : Conentração protéica das amostras irradiadas

Dose (Gy)	Concentração Média (ug/ml)
0	2026
100	1906
250	2011
500	1906
1000	1817
2000	1800

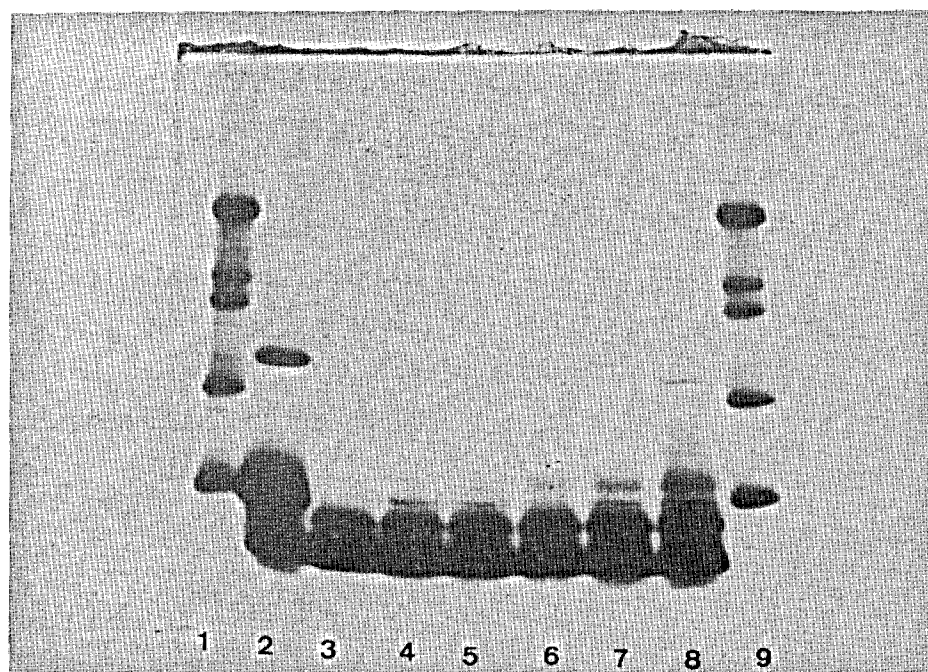


Fig. 3 - Eletroforese

- legenda 1 e 9 - padrões de peso molecular
 2 - veneno total
 3 - crotamina não-irradiada
 4 - crotamina irradiada c/ 100 Gy
 5 - crotamina irradiada c/ 250 Gy
 6 - crotamina irradiada c/ 500 Gy
 7 - crotamina irradiada c/ 1000 Gy
 8 - crotamina irradiada c/ 2000 Gy

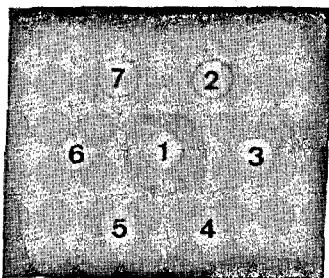


Fig. 4 - Imunodifusão

- legenda 1 - soro anti-crotálico
 2 - crotamina não-irradiada
 3 - crotamina irradiada c/ 100 Gy
 4 - crotamina irradiada c/ 250 Gy
 5 - crotamina irradiada c/ 500 Gy
 6 - crotamina irradiada c/ 1000 Gy
 7 - crotamina irradiada c/ 2000 Gy

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com os ensaios realizados, verificou-se que a concentração protéica das amostras irradiadas com relação à proteína nativa não alterou e não ocorreu precipitação das amostras irradiadas. Os valores para determinação dos grupos SH não foram considerados significativos, portanto não ocorreu rompimento de pontes de dissulfeto da macromolécula. Já na SDS - PAGE observou-se um aumento crescente na formação de agregados em função do aumento da dose. E pela reação de imunodifusão ficou demonstrado que a crotamina não perdeu sua atividade imunoquímica frente ao limite de doses ao qual foi submetida.

Atualmente estamos analisando a toxicidade "in vivo" da proteína nos limites de dose citados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BUTTER, J.; LAND, E.J.; SWALLER, J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem., 24 (3/4): 273-82, 1984.
02. CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J.M.; BOURILLET, F.; ROUCH-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du venin de "Crota - lus durissus terrificus" var. crotaminicus. Toxicon, 9: 279, 1971.
03. CONTI, M.A.B.; GIGLIO, J.R.; LAURE, C.J. Pontes dissulfeto da crotamina alfa In: SOCIEDADE Brasileira para Progresso da Ciência: resumos da 32ª reunião anual, Rio de Janeiro, R.J., jul. 6.12, 1980. Cienc. Cult. (São Paulo) Supl., 32 (7): 855, 1980.
04. ELLMAN, G.L. Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82:70-7, 1959.
05. LAURE, C.J. Die Primostruktur des Crotamins. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 356: 213, 1975.
06. MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem., 31: 964, 1959.
07. MOUSSATCHÉ, H.; GONÇALVES, J.M.; VIEIRA, G.D.; HASSON, A. Pharmacological properties of crotamine. In: BUCKLEY, E.E. & PORJES, N., eds. Venoms. Washington, D.C., AAAS, 1956. p.275 (Publ., 44)
08. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy, (5): 1 - 78, 1958.
09. OUCHTERLONY, O. Immunodifusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D.M., ed. Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell, 1967.