

BR 88/8705

ISSN 0101-3084

CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

**EFEITOS DOS PRODUTOS DE RADIÓLISE DA ÁGUA NA
CROTAMINA (TOXINA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*)**

Tânia Alves da Costa e José Roberto Rogero

PUBLICAÇÃO IPEN 142

JULHO/1988

SÃO PAULO

**EFEITOS DOS PRODUTOS DE RADIÓLISE DA AGUA NA CROTAMINA
(TOXINA DO VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*)**

Tânia Alves da Costa e José Roberto Rogero

DEPARTAMENTO DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA

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

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C11.00

BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS

SNAKES

TOXINS

VENOMS

IPEN - Doc - 3009.

Aprovado para publicação em 02/06 88.

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

EFETOS DOS PRODUTOS DE RADIÓLISE DA ÁGUA NA CROTAMINA

(TOXINA DO VENENO DE Crotalus durissus terrificus)

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. A crotamina foi obtida a partir de um "pool" do veneno de Crotalus durissus terrificus por cromatografia de exclusão molecular e irradiada em uma concentração de 1 mg/ml em solução aquosa com radiação gama produzida por uma fonte de ^{60}Co . Realizou-se os seguintes ensaios: determinação da concentração proteica, SDS - PAGE e imunodifusão. Resultados preliminares mostraram uma redução de 55% na concentração proteica com a dose de 5000 Gy, um aumento de número de bandas na SDS-PAGE, sugerindo a presença de agregados proteicos que foi proporcional com o aumento das doses. Os dados de imunodifusão mostraram uma redução da atividade imunológica contra o antisoro produzido pelo Instituto Butantan.

EFFECTS OF RADIOLYSIS PRODUCTS ON CROTAMINE (TOXIN
FROM Crotalus durissus terrificus venom)

ABSTRACT

Ionizing Radiations changes the molecular structure due to chemical bond destruction. These chemical alterations are able to change the biological properties of the biomolecules. Crotamine was obtained from Crotalus durissus terrificus venom by molecular exclusion chromatography and irradiated in a concentration of 1 mg/ml in aqueous solution with gamma radiation produced by a ^{60}Co source. We used doses of 100 Gy, 2000 Gy and 5000 Gy (dose rate = $1,14 \times 10^3$ Gy/h). We performed the following experiments: proteic concentration, SDS-PAGE and immunodiffusion. Preliminary results showed a reduction of 55% in proteic concentration; with dose of 5000 Gy; an increa-

se of the number of bands in SDS-PAGE suggesting the appearance of protein aggregates that was proportional as the dose increases. The immunodiffusion data showed a reduction of the immunochemical activity against the Butantan antisera.

Keywords: Toxins, snakes, biological radiation effects

INTRODUÇÃO

A crotamina é uma toxina proteica que foi isolada do veneno de cascavel da região central e sul do Brasil, por Gonçalves e Vieira em 1950 (5). Quando injetada intra-peritonealmente em camundongos, provoca a contração imediata seguida de contrações irregulares e espontâneas dos membros posteriores, além de ser capaz de induzir a contração do músculo esquelético de gatos e ratos. Estas observações demonstram que a fibra muscular é o alvo principal de ação da crotamina (9).

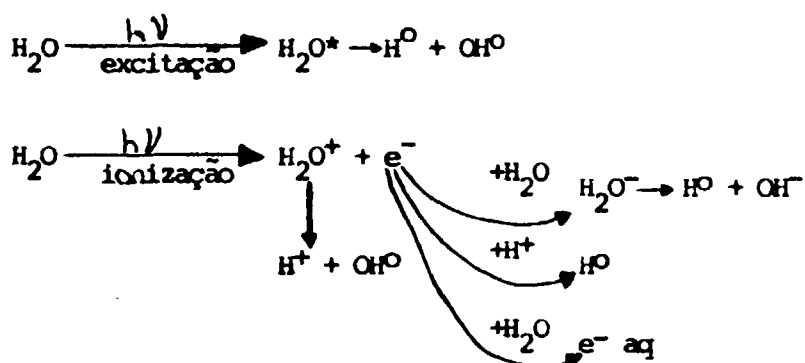
A crotamina isolada de Crotalus durissus terrificus, var. crotamnicus, é um polipeptídeo de cadeia simples com P₁ 4880 daltons, de característica básica (pI 10,3), constituído por 42 resíduos de aminoácidos, sendo 6 resíduos de cys comprometidos em pontes dissulfeto. A estrutura primária foi determinada por Laure em 1975 (6).

A presença das três pontes dissulfeto conferem a proteína uma forma compacta e altamente resistente ao calor, suportando o aquecimento até 70°C por 12 horas sem perder sua toxicidade (Hampe e Gonçalves em 1976 em 1978) (6).

Com relação ao efeito das radiações ionizantes sobre proteínas, as primeiras investigações foram iniciadas no começo deste século e uma vasta literatura é encontrada sobre este aspecto (1).

Tanto a ação direta e indireta de radiações ionizantes tem mostrado alterações da atividade biológica, sendo esta enzimática, hormonal ou imunológica.

Ação direta é o termo usado quando a macromolécula é excitada ou ionizada; a ação indireta ocorre quando o ataque sobre esta são mediados pelos produtos de radiólise da água neste caso, a água absorve a maior parte da radiação gama, podendo ocorrer excitação ou ionização desta, da seguinte forma:



Existem na literatura, dados com relação à forma que os produtos de radiólise da água reagem com a estrutura proteica. Por exemplo, radicais hidroxila (OH^\bullet) reagem numa proporção relativamente baixa com aminoácidos. A principal reação é a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono α . Entretanto, onde os carbonos β e γ estão presentes, o ataque pode ocorrer nestes sítios (1).

A proporção de reação é maior com aminoácidos aromáticos, onde as reações são principalmente sobre o anel de estrutura. Com cisteína a abstração do hidrogênio do grupo -SH produz radicais RS^\bullet que podem reagir de diferentes formas, posteriormente. Com relação ao radical H^\bullet e e^- aquoso o mecanismo de reação com a proteína é muito pouco compreendido. Os tipos de radicais produzidos nas reações com os produtos de radiólise da água e os aminoácidos são, portanto, extremamente diversos (1).

Como consequência da radiação foram verificadas modificações na estrutura da proteína, por uma variedade de medidas físicas e químicas, além da formação de ligações covalentes intermoleculares, as quais devem contribuir para a precipitação na forma de agregados. Produtos de irradiação tais como estes devem também contribuir para a alteração de atividade das proteínas.

II MATERIAIS E MÉTODOS.

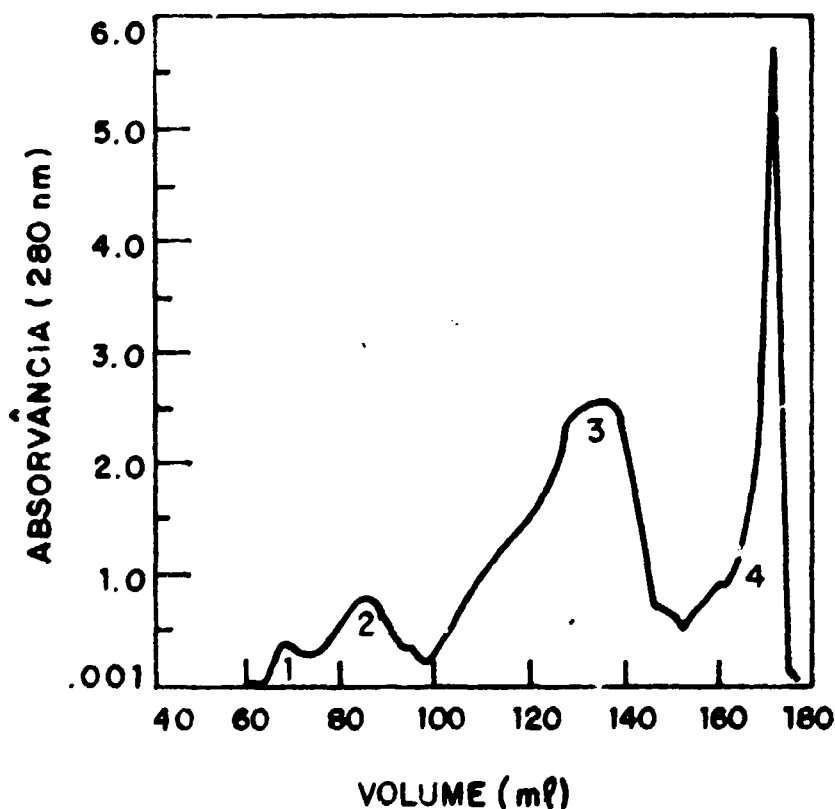
A partir de um "pool" de veneno da cascavel, bruto e seco da região de Goiás, realizou-se cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-75 "fine" em ácido acético 0,1 M, numa coluna de 80 x 1,6 cm (figura 1). A crotamina foi recromatografada na mesma coluna para garantir maior pureza de amostra.

A toxina foi submetida à radiação gama proveniente de uma fonte de ^{60}Co , com uma taxa de dose de $1,14 \times 10^3$ Gy/h nas doses de 100, 2000 e 5000 Gy. A irradiação foi realizada em solução aquosa numa concentração de

1 mg/ml, na presença de O_2 atmosférico em temperatura ambiente.

A determinação do conteúdo proteico nas amostras foi realizado pelo método de Lowry, modificado por Miller (8), usando o soro albumina bovina como padrão. Na análise em SDS-PAGE (figura 2), segundo o método de Weber e Osborn (12), utilizou-se como gel de corrida poliacrilamida 15% em tampão tris-glicina 0,375M pH 8.8 e como gel de empilhamento poliacrilamida 2,5% em tampão Tris-HCL 0,125M pH 6.7. Por este método é possível estimar o peso molecular das amostras, sendo os padrões adotados: BSA 68000, ou albumina 45000, aldolase 38000, quimiotriprisino gênio 24000 e lisosima 14300. Para análise antigênica utilizou-se a reação de imunodifusão, baseada no método de Ouchterlony (10, 11). As amostras testadas frente ao soro anticrotalino obtido no Instituto Butantan.

III. RESULTADOS



Obs.: o pico nº 4 corresponde a crotamina

TABELA 1 - Conc. Proteica das Amostras Irradiadas

DOSE (Gy)	Conc. Média (mg/ml)
0	0,85
100	0,80
2000	0,82
5000	0,47

TABELA 2 - Comparação da Proteína Nativa (n = 9) e Amostra Irradiadas (n = 9)

	Proteína Nativa	Proteína Irrad. 100 Gy	Proteína Irrad. 2000 Gy	Proteína Irrad.
\bar{X} (mg/ml)	0,85	0,80	0,82	0,47
S	0,1666	0,2328	0,4328	0,1851
t_0		0,0953	0,1423	4,57

$$Gl = 9 + 9 - 2 = 16$$

$$P = 5\%$$

$$t_{\alpha} = 2,120$$

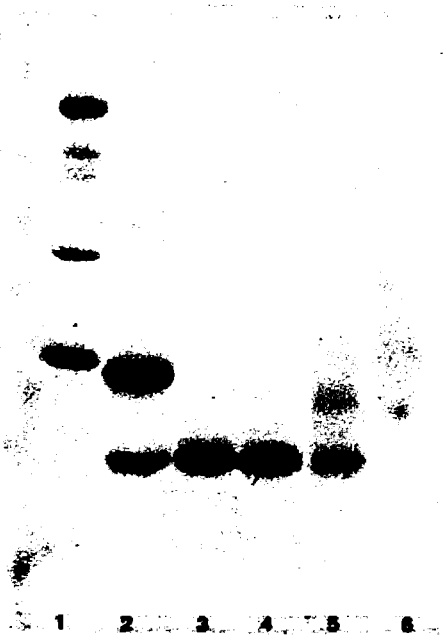


Fig. 2 - SDS - PAGE

- Legenda :
1. Padrões de peso molecular
 2. Veneno total
 3. Crotoxina não-irradiada
 4. Crotoxina irradiada c/ 100 Gy
 5. Crotoxina irradiada c/ 2000 Gy
 6. Crotoxina irradiada c/ 5000 Gy

Fig. 3 - Imunodifusão

- Legenda :
1. Soro anticrotálico
 2. Veneno total
 3. Crotoxina não-irradiada
 4. Crotoxina irradiada c/ 100 Gy
 5. Crotoxina irradiada c/ 2000 Gy
 6. Crotoxina irradiada c/ 5000 Gy

IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com os ensaios realizados, verificou-se que a concentração proteica das amostras irradiadas com relação à proteína nativa não se alterou nas doses de 100 e 2000 Gy, já na dose de 5000 Gy verificou-se uma perda de 55% do material protéico que é significativo com erro de 5%, estatisticamente, pelo test t student. Pela SDS-PAGE observou-se um aumento crescente na formação de agregados em função do aumento da dose. Na reação de imunodifusão ficou demonstrado da forma qualitativa a perda da antigenicidade da proteína com relação ao aumento de doses ao qual foi submetida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. MUTTER, 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.; CONÇALVES, J.M.; BOURILLET, F.; ROUCH-ARVEILLER, M. Action neuromusculaire compares de la crotamine et du venin de "Crotalus 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 o 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. GONÇALVES, J.M. & POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. Arch. Biochem., 13: 253 - 9, 1947.
05. GOLÇACVES, J.M. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre veneno de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. An. Acad. Bras. Cienc., 22 (1): 141 - 9, 1950.
06. HAMPE, O.G. & GONÇALVES, J.M. Optical rotatory dispersion of crotamine: effect of denaturants. Polymer, 17: 638, 1976.
07. LAURE, C.J. Die Primstruktur des Crotamins. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 356: 213, 1975.
08. MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. Anal. Chem., 31: 964, 1959.

09. 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).
10. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy, (5): 1 - 78, 1958.
11. OUCHTERLONY, O. Immunodifusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D.M., ed. Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell, 1967.
12. WEBER, K. & OSBORN, N. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., 244 (16): 4406 - 12, 1969.