



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

Jayme Nunes de Souza Filho
José Roberto Rogero

Divisão de Radiobiologia
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Comissão Nacional de Energia Nuclear
São Paulo

SUMÁRIO

A crotóxina 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 GAMMACELL⁶⁰Co na concentração de 2 mg/ml NaCl 0,85 % sob taxa de dose de $1,19 \times 10^5$ 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.

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 1.19×10^5 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 crottoxina, 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 crottoxina foi primeiramente isolada e cristalizada por Slotta, C.H. e Fraenkel-Conrat, H. (18), em 1958. Os resultados de análise amino-terminal executados por Fraenkel-Conrat, H. e Singer, B. mostraram a presença de duas sub-unidades distintas na crottoxina (4). Utilizando cromatografia de troca iônica, Rusbamen, K. et alli (17) e Hendon, R.A. e Fraenkel-Conrat, H. (8), separaram a crottoxina 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 (15). 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-crottoxina quando da 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 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^\cdot , H_2O_2 , H^\cdot , e $\bar{\text{e}}$ aq. e outros. Esses produtos formados pela radiólise da água atacam os terminados 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^\cdot) possui 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 consequentemente, 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 usado como padrão de dosagem.

As absorvâncias das amostras e padrões foram lidas em comprimento de onda

de 650 nm em um espectrofotômetro Carl Zeiss FMQ 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 B-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 ug/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 irradiada 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 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 sobrevivências 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.

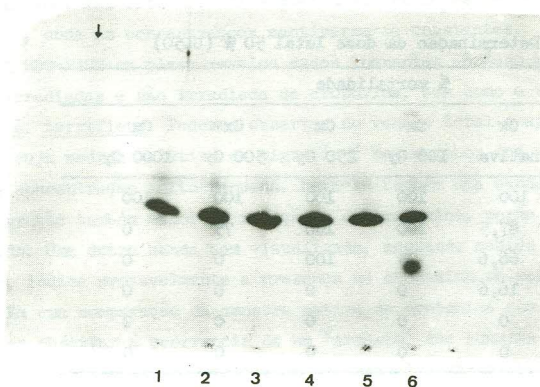
RESULTADOS

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

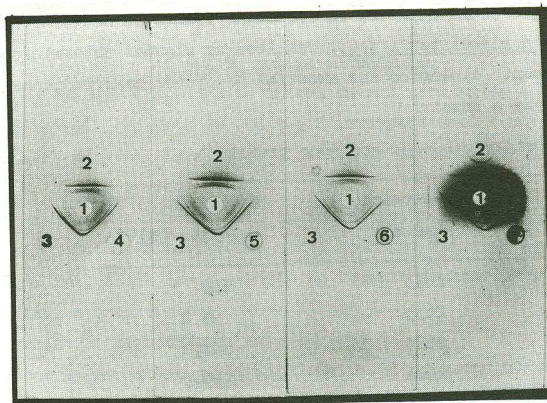
Amostra de crotoxina	Concentração (ug/ml)	Concentração relativa (%)
Cx nativa	2653	100
Cx 250 Gy	2633	99,2
Cx 500 Gy	2683	101,1
Cx 1000 Gy	2613	98,5
Cx 2000 Gy	2243	84,5

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 vivenciado pelos achados de Darke, P.L. et alli (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 alli (7) usaram o fator de correção proposto, tanto para a determinação do conteúdo de fosfolipase A2 como para o veneno total, embora destacando 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 irradiada 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" desses 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 1000 Gy, 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 de 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.
IN: Rev. Ass. Med. Bras., 26 (6): 212-218, Jun. 1980.
- 2 - Butler, J.; Land, E.J. and Swallow, A.J.. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems.
IN: Radiat. Phys. Chem., 24 (3/4): 273-282, 1984.
- 3 - Darke, P.L.; Jarvin, A.A.; Deems, R.A. and Dennis, E.A.. Further characterization and N-terminal sequence of cobra venom phospholipase A2.
IN: Biochimica et Biophysica Acta, 626: 154-161, 1980.
- 4 - Fraenkel-Conrat, H. and Singer, B.. Fractionation and composition of crotoxin.
IN: Archives of Biochemistry and Biophysics, 60: 64-73, 1956.
- 5 - Hall, E.J. - Radiobiology for the radiologist (Edited by Harper e Row, publishers, Inc. Medical Department) - 2^a ed. - 1978.
- 6 - Hanley, M.R.. Conformation of the neurotoxic crotoxin complex and its subunits.
IN: Biochemistry, 18 (9): 1681-1688, 1979.
- 7 - Hazlett, T.L. and Dennis, E.A.. Affinity chromatography of phospholipase A2 from Naja naja naja (indian cobra) venom.
IN: Toxicon, 23 (3): 454-466, 1985.
- 8 - Hendon, R.A. and Fraenkel-Conrat, H.. Biological roles of the two components of crotoxin.
IN: P. Natl. Acad. Sciences, USA, 68 (7): 1560-1563, Jul. 1971.
- 9 - Hendon, R.A. and Tu, A.T.. The role of crotoxin subunits in tropical rattle snake. Neurotoxic action.
IN: Biochimica et Biophysica Acta, 578: 243-252, 1979.
- 10 - Jeng, T.W.; Hendon, R.A. and Fraenkel-Conrat, H.. Search for relationships among the hemolytic, phospholipolytic and neurotoxic activities of snake venoms.
IN: Proc. Natl. Acad. Sciences, USA, 75 (2): 600-604, Fev. 1978.

- 11 - Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randal, R.J.. Protein measurement with the Folin phenol reagent.
IN: J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 12 - Miller, G.L.. Protein determination for large numbers of samples.
IN: Analyt. Chem., 31: 964, 1959.
- 13 - Nakazone, A.K.; Rogero, J.R. ang Gonçalves, J.M.. Crotoxin. Immunology and interaction of the subunits.
IN: Braz. J. Med. Biol. Res., 17: 119-128, 1984.
- 14 - Ouchterlony, O.. Diffusion in gel methods for immunological analysis.
IN: Progr. Allergy, 5: 1-78, 1958.
- 15 - Reed, L.J. and Muench, H.. A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
IN: Am. J. Hyg., 27 (3): 493-497, Mai. 1937.
- 16 - Rogero, J.R.. Toxinas do veneno de Crotalus durissus terrificus. Interação proteína-proteína e cinética de troca isotópica H - T.
Dissertação e tese - IEA - DT 119, Abr. 1979.
- 17 - Rubsamen, K.; Breithaupt, H. and Habermann, E.. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex.
IN: Naunyn Salmiedeberts Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 270: 274-288, 1971.
- 18 - Slotta, C.H. and Fraenkel-Conrat, H.. Purificação e cristalização do veneno de cobra cascavel.
IN: Memórias do Instituto Butantan, XII: 505-513, 1938.