

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO GAMA NOS VENENOS DE  
Crotalus durissus terrificus (CASCAVEL), Bothrops jararaca (JARARACA)  
e Bothrops jararacussu (JARARACUÇU)**

MIRIAM C. GUARNIERI<sup>1</sup>; PATRICK SPENCER<sup>2</sup>; YOKO MURATA<sup>2</sup>; MARIA APARECIDA CAMILLO<sup>2</sup>; REGINA A. PAULA<sup>2</sup>; CARLA L. VASCONCELOS<sup>1</sup> e JOSÉ R. ROGERO<sup>2</sup>.

1. Lab. de Radiobiologia, Depto de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, Pernambuco.

2. Divisão de Radiobiologia, Depto de Aplicações Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

### INTRODUÇÃO

A radiação gama pode ser ferramenta útil como agente atenuante e no estudo do mecanismo de ação de toxinas de venenos ofídicos, assim como esses venenos podem ser utilizados como modelos para o estudo dos danos radioinduzidos em proteínas.

### OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi comparar os efeitos da radiação gama em venenos de serpentes pertencentes aos principais gêneros de importância médica no Brasil.

### METODOLOGIA

Alíquotas dos venenos de Crotalus durissus terrificus, Bothrops jararaca e Bothrops jararacussu, diluídos em solução salina pH 7,0 (2 mg/ml), foram irradiadas com as doses de 500, 1.000 e 2.000 Gy em uma fonte de <sup>60</sup>Co, sob a taxa de dose média de 750 Gy/h, à temperatura ambiente e em presença de oxigênio.

Para determinação do conteúdo protéico, antes e após a irradiação, foi utilizado o método de Lowry (1951).

A análise do peso molecular das proteínas processou-se em sistema desnaturante (eletroforese em gel de poliácridamida na presença de SDS) e não desnaturante (cromatografia em Sephadex<sup>R</sup> G-75 e Sephacryl<sup>R</sup> S-200). Com o intuito de analisar quantitativamente as alterações do peso molecular dos venenos foram calculadas as áreas das três principais frações obtidas por cromatografia.

A atividade proteolítica das amostras foi avaliada utilizando caseína como substrato e a toxicidade foi estimada pela determinação da dose letal 50% (DL50), por via intraperitoneal, em camundongos.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira diferença de resposta frente à radiação entre os venenos estudados foi detectada pela dosagem protéica. O veneno crotálico apresentou redução de 25% e 54% do conteúdo protéico nas amostras irradiadas com 1.000 e 2.000 Gy, respectivamente, enquanto os venenos botrópicos (jararaca e jararacuçu) não apresentaram precipitação de proteínas após a irradiação. Vale ressaltar que Nascimento (1992) conseguiu inibir a precipitação da crotoxina (principal toxina do veneno de cascavel) durante o processo de irradiação, utilizando salina pH 3,0 na diluição das amostras.

Os perfis eletroforéticos das amostras do veneno botrópico e crotálico foram similares, apresentando difusão das proteínas no gel a medida que a dose de radiação aumentava e redução das principais frações nos venenos de jararaca e jararacuçu.

Os perfis cromatográficos das amostras irradiadas com 500 Gy sugerem que tanto para os venenos botrópicos, quanto para o crotálico, essa dose foi insuficiente para causar modificações estruturais, detectáveis nas condições ex

perimentais. Por outro lado, diferenças gênero-específicas foram observadas nos resultados das cromatografias das amostras irradiadas com maiores doses. Na dose de 1.000 Gy o veneno de jararaca apresentou aumento de 107% da fração de alto peso molecular, enquanto o veneno crotálico irradiado com a mesma dose permaneceu inalterado; na dose de 2.000 Gy a fração de alto peso molecular do veneno de jararaca apresentou aumento de 338%, proporcional a diminuição das outras frações, enquanto o veneno de cascavel apresentou comportamento inverso, tendo a área das frações de maior peso molecular reduzidas em 70% e 80%, e apresentando aumento de 88% da fração de menor peso molecular.

Esses resultados aliados aos obtidos na dosagem proteica sugerem que a radiação causou a formação de complexos de alto peso molecular no veneno de jararaca e, provavelmente, também no veneno de cascavel, sendo os últimos insolúveis, talvez pela distribuição de cargas das toxinas. O aumento da fração de baixo peso molecular no veneno de cascavel sugere a fragmentação das moléculas durante o processo de irradiação.

As enzimas responsáveis pela atividade proteolítica demonstraram extrema radiorresistência, tendo sua atividade mantida em todas as amostras de veneno de cascavel irradiado. Por outro lado, a atividade caseinolítica dos venenos botrópicos foi reduzida proporcionalmente ao aumento da dose de radiação, apresentando 75,8%, 66,7% e 42,4% da atividade inicial do veneno de jararaca e 85,9%; 56% e 43,2% da atividade inicial do veneno de jararacuçu, quando irradiados com 500, 1.000 e 2.000 Gy, respectivamente. Esse comportamento pode ser explicado pela concentração relativamente baixa de enzimas proteolíticas no veneno de cascavel em relação aos venenos botrópicos, nesse caso, maiores doses de radiação seriam necessárias para inativação das referidas enzimas.

Com relação a toxicidade, os três venenos estudados foram atenuados a medida que a dose de radiação aumentava; porém foram evidenciadas diferenças de radiosensibilidade, apresentando-se em ordem crescente de radiorresistência os venenos de jararaca, cascavel e jararacuçu.

## CONCLUSÕES

Embora os venenos de diferentes gêneros respondam de maneira diferencial frente a alguns aspectos, os efeitos da radiação são basicamente os mesmos para todos os venenos estudados e podem ser modulados de acordo com as condições experimentais como a dose de radiação.

Os resultados obtidos estimulam a continuidade do trabalho, na tentativa de obter venenos menos tóxicos e mais imunogênicos, úteis à produção de antissoros.

Apoio Financeiro: CNPq

Marcação da *Ceratitidis capitata* Wied. com manganês e análise por ativação neutrônica.

Valdemar Luiz Tornisielo, Wiendl, F. M.<sup>1</sup>, Vasconcellos, M. B.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Energia Nuclear na Agricultura USP Piracicaba SP.

<sup>2</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares CNEN São Paulo.

A análise por ativação neutrônica é considerada como um método instrumental, pois não envolve separações químicas ou pré-tratamento de amostras. Além disto o manuseio das amostras dispensa cuidados especiais e não destrói as amostras, podendo estas serem guardadas por tempo indeterminado. A aplicação desta técnica em ecologia de insetos pode contribuir sobremaneira para facilitar a marcação dos indivíduos, que poderão ser usados para determinação de comportamento, densidade populacional, hospedeiros intermediários, distribuição e raio de vôo. O propósito deste trabalho foi estudar a aplicabilidade da marcação de adultos *Ceratitidis capitata* (Wied., 1824) com manganês estável e sua posterior ativação com neutrons, para diferenciação, por meio de centilometria entre insetos marcados e não marcados.

#### Material e Métodos

Larvas de *C. capitata* foram criadas em dieta artificial enriquecida com as seguintes concentrações de  $MnCl_2$ : 0; 0,0001; 0,0005; 0,0010; 0,005; e 0,01 g/g de dieta, com três repetições para cada tratamento. Em cada repetição foi colocado 500 ovos com idade entre 0 a 6 horas e viabilidade de 98 %. Todo o experimento foi conduzido em uma sala climatizada, com temperatura de 25°C e umidade de 70 % em fotoperíodo de 14 horas. Os adultos obtidos foram colocados em gaiolas especiais para criação desta espécie de inseto, os quais receberam água e alimento para adulto, e assim foram mantidos até a morte natural, quando eram coletados, sexados, secos a 40°C e embalados para posterior ativação com neutrons. Dessas, quatro amostragens em épocas diferentes foram tomadas, como segue: 13º dia; 25º dia; 37º e 57º dia pós emergência dos adultos. As moscas foram ativadas em reator nuclear por 60 segundos a um fluxo de  $2,67 \cdot 10^{11}$  nêutrons por  $cm^2/s$ , e em seguida contadas por 120 segundos em um detector germânio hiperpuro: modelo GMX-20. Para detecção do  $^{56}Mn$  utilizou-se os picos de energia de 846,9 keV e sua confirmação pelo pico de 1.810,7 keV. Utilizou-se para comparação das amostras, as cpm obtidas do primeiro pico.

#### Resultados

Os resultados obtidos deste experimento mostraram que o  $MnCl_2$ , deve ser utilizado pelas moscas-das-frutas *C. capitata* como nutriente em baixas concentrações, mas ao mesmo tempo em concentrações mais elevadas, 0,005 e 0,01 g de  $MnCl_2$ , causou mortalidade total das larvas Tabela 1.

A marcação das moscas com  $MnCl_2$  medida pela cpm obtida após ativação com nêutrons, é apresentada na Tabela 2 onde constam também as respectivas médias. Verifica-se que o manganês aparece nitidamente na testemunha, o que evidencia a importância deste elemento como micronutriente. Neste trabalho nota-se pela Tabela 2 que os machos acumularam quantidade maior de manganês que as fêmeas.

As concentrações de 0,0005 e 0,0010 g de  $MnCl_2$  por g de dieta, foram suficientes para marcar tanto machos como fêmeas que morreram aos 13 dias, sendo que os machos apresentaram maior N° de cpm média. Já nas épocas de 37 e 57 dias, cerca de 60% dos insetos ativados, apresentaram contagens semelhantes à testemunha portanto perderam a marca, possivelmente por excreção, embora machos das concentrações 0,0005 e 0,001 e fêmeas da 0,0005 tenham conservado quantidade suficiente de manganês para diferenciá-los da testemunha, aos 57 dias.

#### Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram concluir que: O  $MnCl_2$  fornecido às larvas de *C. capitata*, em baixas doses, funciona como micronutriente (0,0001 g/g de dieta). Já a dose de 0,0005 g/g de dieta pode ser um bom marcador de adultos. Por outro lado quantidades superiores a 0,001 g/g são tóxicas para as larvas.

Tabela 1- Número total de pupas (T), número de adultos de *C. capitata* emergidos (E), número de pupas inviáveis (I) provenientes de 500 larvas criadas em dieta enriquecida com MnCl<sub>2</sub>.

concentração g/g		repetição			média
		1	2	3	
0	T	453	436	393	427,3
	E	427	416	369	404,0
	I	26	20	24	23,3
0,0001	T	467	440	461	456,0
	E	429	407	430	422,0
	I	38	33	31	34,0
0,0005	T	423	431	432	428,6
	E	383	398	372	384,3
	I	40	33	60	44,3
0,0010	T	358	326	355	346,3
	E	331	300	326	319,0
	I	27	26	29	27,3
0,0050	T	0	0	0	0,0
0,0100	T	0	0	0	0,0

Tabela 2- Médias de contagens por minuto obtidas de machos e fêmeas de *C. capitata* ativadas com fluxo de  $2,67 \cdot 10^{11}$  n/cm<sup>2</sup>/s por 60 segundos para cada época e respectivas concentrações.

concentração (g/g)	época (dias)							
	13		25		37		57	
	M	F	M	F	M	F	M	F
0	40AB	45Aa	56Aa	27Aa	90Bb	53Bb	91Aa	65Aa
0,0001	70Ab	61Aa	44Aa	39Aa	62Bb	37Bb	52Aa	59Aa
0,0005	330Aa	107Bb	155Ab	75Bb	161Aa	59Bb	251Ab	137Aa
0,0010	447Aa	188Ba	143Ab	70Bb	80Bb	73Bb	185Ab	91Ba