

CNEN/SP

ipen **Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares**

**EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA EM VENENO DE
Crotalus durissus terrificus: ASPECTOS ANTIGÊNICOS**

Yoko Murata e José Roberto Rogero

PUBLICAÇÃO IPEN 153

JULHO/1985

SÃO PAULO

**EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA EM VENENO DE
Crotalus durissus terrificus: ASPECTOS ANTIGÊNICOS**

Yoko Murata 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

IMMUNITY

SNAKES

VENOMS

IPEN - Dnc - 3027

Aprovado para publicação em 10/03/88.

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

EFETTO DA RADIAÇÃO GAMA EM VENENO DE Crotalus durissus terrificus: ASPECTOS ANTIGÊNICOS

Yoko Murata & José Roberto Rogero

RESUMO

As radiações ionizantes podem provocar perdas de ligações fracas entre as moléculas protéicas, assim como podem quebrar ligações covalentes, modificando a estrutura molecular. É importante verificar se estas radiações podem reduzir a toxicidade sem alterar a capacidade imunogênica do veneno de serpentes, pela escolha das condições de irradiação adequadas. Estes dados poderão ser explorados como método rápido de preparação de toxóides, nas mais diversas aplicações em ciências biológicas. Um "pool" de veneno de Crotalus durissus terrificus crotamina positivo, foi dissolvido em NaCl 0,85 % e o sobrenadante irradiado com radiação gama de uma fonte de ^{60}Co . Foram utilizadas doses de 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 Gy numa taxa de dose de 1190 Gy/h. Após a irradiação a toxicidade residual foi testada em todas as amostras. As propriedades antigênicas do veneno irradiado foram avaliadas por imunodifusão (método de Ouchterlony) e por imunoprecipitação (método de Kabat). Os resultados indicam que a antigenicidade mantém inalterada até a dose de 750 Gy, enquanto se observa uma detoxificação parcial.

EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON Crotalus durissus terrificus venom: ANTIGENIT ASPECTS

ABSTRACT

Ionizing radiation is known to cause loss of weak bounding between protein molecules and the appearance of covalent bond breaks. It was of interest to know if one could reduce the toxicity of snake venom proteins and retain the immunogenicity by suitable choice of radiation dose and strength of venom solution. If so, the method could be profitably exploited for the rapid preparation of venom toxoid and this could be expected to have many applications in the biological sciences. A pool of crotamine positive Crotalus durissus terrificus venom was dissolved in 0,85% NaCl and

the supernatant irradiated with Co-60 gamma radiation. Doses of 100, 250 , 500, 750, 1000, 1500 and 2000 Gy were used at the dose rate of 1190 Gy / h. After the irradiation, each sample was tested for residual toxicity. Anti - genic properties of irradiated venom were gated by immunodiffusion (Ouchterlony method) and immunoprecipitation (Kabat method). The results indicate that antigenicity of venom proteins assessed by immunodifusion and immunoprecipitation methods was almost maintained to 750 Gy. On the other hand dose of radiation produced a partial detoxification.

INTRODUÇÃO

Os acidentes por picada de cascavel são muito frequentes, sendo letais quando não são socorridos de forma rápida e adequada. Nestes casos, o único tratamento de eficácia comprovada é a soroterapia.

O soro anti-crotálico é obtido em cavalos por hiperimunização, esta técnica consiste em inocular o veneno no animal, estimulando a produção de anticorpos. Entretanto, a alta toxicidade deste veneno impede a inoculação de doses capazes de fornecer uma resposta imunológica adequada, tendo como consequência uma baixa produtividade.

O desenvolvimento de uma metodologia para atenuar o veneno de cascavel, diminuindo a toxicidade e aumentando a resposta imunológica, poderá levar a melhora acentuada na produção de anti-soro.

Na literatura podemos encontrar alguns estudos da aplicação da radiação gama^(3,5) obtendo uma diminuição da toxicidade com a manutenção da capacidade imunogênica, o que nos incentivou a utilizar esta técnica de atenuação em venenos crotálicos. A radiação ionizante provoca a perda de ligações fracas entre moléculas protéicas, assim como pode quebrar ligações covalentes modificando a estrutura molecular.

No presente trabalho o veneno de cascavel submetido a diferentes doses de radiação gama, será analisado quanto as possíveis alterações de sua antigenicidade e atividade tóxica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi preparada uma solução de 2 mg/ml de veneno de cascavel Crotalus durissus terrificus - em cloreto de sódio 0,85. Esta solução foi filtrada em papel Wharman nº 1 e a fração solúvel, submetida a radiação gama numa

fonte de Co-60, tipo Gammacell 220 da Atomic Energy of Canada Ltda.. Utilizou-se doses de 100, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 Gy numa taxa de dose de 1190 Gy/h.

Para a análise qualitativa do antígeno, utilizou-se a técnica de imunodifusão ⁽⁴⁾. A lâmina de microscópio utilizada como suporte, foi coberta com ágar a 2% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0. As amostras foram aplicadas na concentração de 600 ug/ml contra o soro anticrotálico com capacidade de neutralizar 1,5 mg de veneno por ml. Após incubar as lâminas por uma noite, em temperatura ambiente, numa câmara úmida, estas foram lavadas, secas e coradas com solução de negro de amido 0,4% em ácido acético 10%.

Na verificação da capacidade antigênica de modo quantitativo, utilizou-se a técnica de imunoprecipitação ⁽²⁾. Foram incubadas soluções de veneno crotálico em diferentes concentrações (75, 150, 200, 300, 400 e 600 ug / 0,8 ml de NaCl 0,15 M com 0,2 ml de soro anticrotálico por uma hora, em 37°C, e posteriormente por 24 horas a 4°C. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos e o precipitado lavado três vezes com solução de cloreto de sódio 0,85%. O precipitado foi ressuspenso com 2 ml de hidróxido de sódio 0,1 N, sendo sua absorvância determinada em 280 nm.

A determinação da toxicidade das amostras não irradiada e irradiadas foi feita pelo cálculo da dose letal 50% pelo método de REED e MUENCH ⁽⁶⁾.

A medida de DL₅₀ foi realizada em camundongos albinos agrupados em pesos entre 21 ± 1 g e 24 ± 1 g cada um, pela via intraperitoneal, utilizando 5 grupos de 4 camundongos cada, mais um grupo controle.

De cada amostra foram feitas diluições 3:4 em série, e injetadas num volume de 0,2 ml em cada animal.

As mortes e sobrevividas foram anotadas 24 horas após as injeções. O cálculo foi realizado da seguinte maneira.

$$d.p. = \frac{50 - Y}{X - Y}$$

$$c. = \log z + (d.p. \times \log 1,33)$$

onde

- | | |
|---|--|
| X | = % de mortalidade na diluição logo acima do valor que provocou 50% de morte ou mais. |
| Y | = % de mortalidade na diluição logo abaixo do valor que provocou 50% de morte ou mais. |
| Z | = % diluição inferior ao valor que provocou 50% de morte. |

d.p. = distância proporcional.

log. 1,33 = logarítmo decimal do fator de diluição.

O antilog de c forneceu a diluição exata em que ocorreu 50% de morte, e, conseqüentemente a concentração em mg/kg de peso.

RESULTADOS

Pela técnica de imunodifusão podemos verificar que as frações das amostras submetidas nas doses de 100, 250, 500 e 750 Gy mantem identidade com o veneno não irradiado. Já nas doses de 1000, 1500 e 2000 Gy as linhas de precipitação, embora correspondentes ao veneno não irradiado, apresentem maior difusão a medida que a dose de radiação aumenta (figura 1).

Foram traçadas curvas de imunoprecipitação das amostras irradiadas e nas várias concentrações (75, 150, 200, 300, 400 e 600 ug/0,8 ml) em função do precipitado formado com o anticorpo (figura 2 a 9). O gráfico demonstra um deslocamento da curva para a direita, indicando a necessidade de maior concentração protéica a medida que se aumenta a dose de radiação para obtenção da mesma quantidade de precipitado. Para facilitar a visualização deste fato, foram estimadas, a partir deste gráfico, as concentrações de proteína necessária para obter 0,5 e 1,0 de absorvância em 280 nm. (tabela 1).

Pela tabela 2, podemos verificar o aumento de 1,6; 2,4; 2,7 e 4,5 vezes da DL50, em comparação a amostra não irradiada nas amostras de 750, 1000, 1500 e 2000 Gy respectivamente. Na tabela 3 podemos verificar o aumento de 1,6 e 3,0 vezes da DL50, em comparação a amostra não irradiada, nas amostras de 500 e 1000 Gy respectivamente, e alterações não significativas nas amostras de 100 e 250 Gy.

Os resultados obtidos mostram a diminuição da toxicidade do veneno a medida que se aumenta a dose de radiação.

DISCUSSÃO

O veneno de cascavel tem características neurotóxicas associadas em menor escala com a capacidade imunodepressora, proteolítica, coagulásia e nefrotóxica. Esta mistura complexa de proteínas vem dificultando a produção de soro anticrotálico em cavalos.

A possibilidade de atenuação das toxinas por irradiação gama no emprego da preparação de anatoxinas, vem sido estudado e podemos verificar nos trabalhos realizados por KANKONRAN⁽³⁾ e PURANANANDA⁽⁵⁾.

A irradiação das toxinas, em solução, possibilita uma alteração química em alguns aminoácidos além de diminuir a dose necessária para ocorrer mudanças estruturais nos sítios tóxicos das proteínas.

A avaliação da capacidade antigênica das toxinas, pela imunodifusão (figura 1) e imunoprecipitação (figuras 2 a 9), mostra que a antigenicidade das proteínas presentes não são significativamente alteradas até a dose de 750 Gy, isto é, os antígenos irradiados até esta dose são reconhecidos pelos anticorpos, produzidos em cavalos, induzidos com o veneno não irradiado.

Os resultados obtidos são complementados pela análise de atividade tóxica. Como podemos verificar pela tabela 2 e 3, a toxicidade diminui com o aumento da dose de radiação em até 4,5 vezes com 2000 Gy. Embora ocorra variação da resposta em grupos de camundongos fêmea e machos, isto não compromete significativamente na análise de queda da toxicidade, concluindo que no intervalo de dose de 750 a 1000 Gy a estrutura protéica é modificada suficientemente para diminuir a atividade tóxica.

T A B E L A I

Concentração protéica (ug)

Amostra	Absorvância 0,50	Absorvância 1,00
não irradiada	200	280
irradiada 100 Gy	200	280
irradiada 250 Gy	200	300
irradiada 500 Gy	220	320
irradiada 750 Gy	250	330
irradiada 1000 Gy	290	340
irradiada 1500 Gy	320	400
irradiada 2000 Gy	380	450

T A B E L A I I

DL50 estimada em camundongos machos

Amostra	DL50 ($\mu\text{g/kg}$)
não irradiada	206,2
irradiada 750 Gy	325,7
irradiada 1000 Gy	493,6
irradiada 1500 Gy	561,5
irradiada 2000 Gy	938,9

T A B E L A I I I

DL50 estimada em camundongos fêmeas

Amostra	DL50 ($\mu\text{g/kg}$)
não irradiada	177,3
irradiada 100 Gy	152,9
irradiada 250 Gy	164,2
irradiada 500 Gy	293,5
irradiada 1000 Gy	541,3

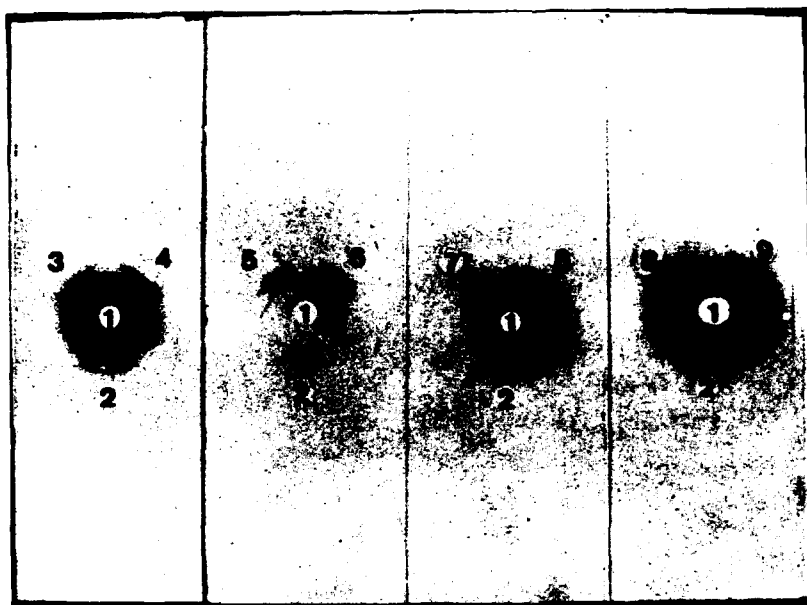


FIGURA 1

1- Soro anti-crotálico

2- Veneno de Crotalus durissus terrificus não irradiado

3- Veneno irradiado 100 Gy

4- Veneno irradiado 250 Gy

5- Veneno irradiado 500 Gy

6- Veneno irradiado 750 Gy

7- Veneno irradiado 1000 Gy

8- Veneno irradiado 1500 Gy

9- Veneno irradiado 2000 Gy

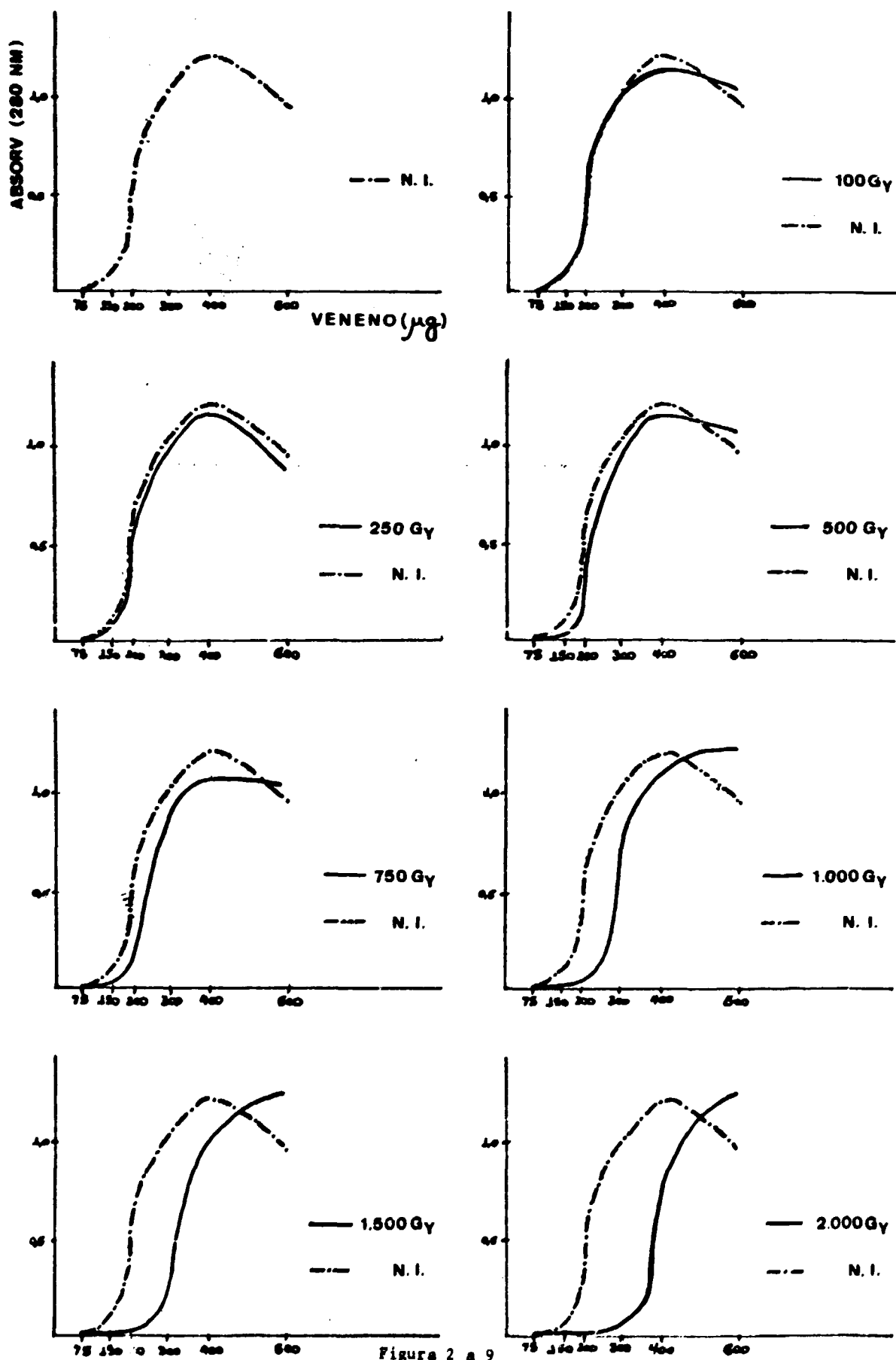


Figura 2 a 9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, J. Chemical mechanism of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem. , 24 (314): 273 - 82, 1984.
2. KABAT, E.A. & MAYER, M.M. Experimental immunochemistry. 2ed. Springfield, Ill., Charles C. Thomas, s.d.
3. KANKONKAR, S.R.; KANKONKAR, R.C.; GAJTONDE, B.B. Irradiated cobra (Naja naja) venom for biomedical application. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radiosterilization of medical products: proceedings of the symposium on ionizing radiation for..., held in Bombay, 9-13 December 1974. Vienna, 1975. p.253 - 62.
4. OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis Progr. Allergy, 5: 1 - 78, 1958.
5. PURANANANDA, C. Studies on effects of radiation on snake venoms with special aspects on their sterilization. Vienna, IAEA; jun. 1972.(IAEA-R-661).
6. REED, L.J. & MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. Am. J. Hygiene, 27 (3): 493 - 7, 1938.