



22 a 27 de abril de 1990

## ANAIS - PROCEEDINGS

EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NO VENENO DE Bothrops jararaca.

Miriam Guarnieri Paciléo Cruz  
Yoko Murata  
Jayme Nunes de Souza Filho  
Nanci do Nascimento  
José Roberto Rogero

Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas  
Divisão de Radiobiologia  
Comissão Nacional de Energia Nuclear - IPEN-CNEN/SP

SUMÁRIO

As moléculas protéicas podem ser alteradas de acordo com a dose de radiação ionizante, mudando suas propriedades. O presente trabalho visa estudar as alterações produzidas pela radiação gama no veneno de jararaca, a fim de determinar a dose mais eficiente, a qual preserva a capacidade antigênica e imunológica, porém com atenuação da atividade tóxica. Para tanto, o veneno de Bothrops jararaca foi dissolvido em NaCl 0,85% na concentração de 2 mg/ml e irradiado com CO-60. Foram utilizadas doses de 500, 1000, 2000 e 5000 Gy com uma taxa de dose de 900 Gy/h. Após irradiação foi feita a determinação do conteúdo protéico, dos grupos sulfidrílicos livres do perfil eletroforético (SDS-PAGE) e análise do espectro de absorção na região ultravioleta. Os resultados mostraram a manutenção do conteúdo protéico porém sem mostrar o aparecimento de grupos sulfidrílicos livres, nas várias doses de radiação, pelo método de Ellman. A análise do espectro de absorção apresenta um aumento da densidade óptica na faixa de 230 a 400 nm à medida que a dose de radiação aumenta, enquanto o perfil eletroforético mostra discreta alteração.

ABSTRACT

The present paper studies the effects of gamma radiation on the jararaca venom in order to find the dose that is able to preserve the antigenic and immunological capacity but decreases the toxic activity. To obtain this purpose, the Bothrops jararaca venom was dissolved in 0.85% NaCl to a 2 mg/ml solution and irradiated in a CO-60 source. Doses of 500, 1,000, 2,000 and 5,000 Gy were used at a dose rate of 900 Gy/h. After the irradiation the proteic contents were determined as well as the eletrophoretic profile (SDS-PAGE) and the analysis of the UV spectrum. The results showed the maintenance of the proteic contents and no free sulphidrilic group in the various doses of radiation by the Ellman method. The analysis of the UV spectrum showed an increase of the optical density in the range of 230 to 400 nm with the increasing of radiation dose, while the eletrophoretic profile showed discret alteration.

## INTRODUÇÃO

Venenos são complexos protéicos, ricos em enzimas, glicoproteínas e peptídeos. O veneno de Bothrops jararaca é caracterizado pela presença de metaloproteínas com atividade hemorrágica intensa, enzimas proteolíticas, desfibrinantes, coagulantes, agregantes plaquetárias, entre outras. Estas toxinas quando utilizadas para produção de soro antibotrópico causam efeitos locais severos nos animais utilizados.

Muitos agentes químicos e físicos têm sido testados na tentativa de atenuar as atividades tóxicas com preservação das propriedades imunogênicas. Os efeitos das radiações ionizantes em proteínas tem sido bem estudados e já que os venenos ofídicos são constituídos basicamente por proteínas, grande parte desses conhecimentos pode ser aplicado no estudo da irradiação de venenos. A radiação gama pode alterar as propriedades das moléculas protéicas diretamente ou indiretamente, quando estas interagem com os radicais livres formados pela radiólise da água.

O presente trabalho visa estudar as alterações produzidas por diferentes doses de radiação gama no veneno de jararaca, com o objetivo de determinar a dose mais eficiente para preservação das propriedades imunogênicas com atenuação da toxicidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### I - Preparação e Irradiação das Amostras

Foi preparada uma solução de 2 mg/ml de veneno de Bothrops jararaca por ml em NaCl 0,85%. A amostra foi dividida em 5 tubos, dos quais 4 foram submetidos a irradiação gama em uma fonte de CO-60, tipo GAMMACELL 220 e um tubo com veneno não irradiado foi utilizado como referência nos ensaios. As amostras foram submetidas à radiação gama nas doses de 500, 1000, 2000 e 5000 Gy em uma taxa de dose de 900 Gy/h.

### II - Determinação do Conteúdo Protéico

Foi determinada a concentração protéica das amostras antes e após a irradiação segundo o método de Lowry (6) modificado por Miller (7), utilizando soroalbumina bovina como padrão.

### III - Determinação de Grupos Sulfidrílicos Livres

O método de Ellman (4) foi utilizado para determinar grupos SH livres que podem se formar durante a irradiação, pela quebra de pontes dissulfeto. Todos os ensaios foram realizados imediatamente após a irradiação, utilizando cisteína como padrão.

### IV - Determinação do Perfil Eletroforético

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio foi utilizada com o objetivo de evidenciar possíveis mudanças de peso molecular, em um sistema denaturante, detectando

quebras das proteínas em solução. O método foi realizado em placa usando gradiente de concentração de poliacrilamida de 7,5% a 15%. Foram aplicadas amostras de veneno não irradiado e irradiado em 500, 1000, 2000 e 5000 Gy na concentração de 1 mg/ml.  $\alpha$  lactoalbumina (14200 Daltons), inibidor de tripsina (20100 Daltons), tripsinogênio (24000 Daltons), fosfatase desidrogenase 3 gliceraldeído (36000 Daltons), anidrase carbônica (29000 Daltons), albumina de ovo (45000 Daltons) e albumina bovina (66000 Daltons) foram utilizadas como referência.

A placa foi corada com o Coomassie brilliant blue R-250 e fotografada, como mostra a figura 1.

#### V - Análise do Espectro de Absorção na Região Ultravioleta

O método foi utilizado com o objetivo de evidenciar possíveis mudanças conformacionais nas proteínas irradiadas. Foram analisadas amostras na concentração de 500  $\mu$ g/ml, no intervalo de 230 a 400 nm, no espectrofotômetro Cary Modelo 118C.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dosagem de proteínas das amostras demonstrou a manutenção do conteúdo protéico em todas as doses de radiação. Esse comportamento é semelhante ao veneno de Naja naja, o qual irradiado nas doses de 1000 a 50.000 Gy não apresentou precipitação (Kankonkar, et al 1975), mas diferente de outros venenos, como por exemplo Crotalus durissus terrificus que quando irradiado na dose de 2000 Gy apresentou precipitação de cerca de 60% do conteúdo protéico (Murata, 1988).

Nas condições experimentais não foram detectados grupos sulfídricos livres pelo método de Ellman (4). Provavelmente ocorrem quebras de pontes dissulfeto, mas na presença de oxigênio e de diferentes radicais, estas se reorganizam muito rapidamente não sendo possível quantificá-las.

Os perfis eletroforéticos foram mantidos porém as bandas das principais frações diminuíram proporcionalmente à dose de radiação, assim como apareceram frações de peso molecular menor, que indicam quebras de proteínas na solução. (figura 1).

No espectro de absorção na região ultravioleta (figura 2) podemos notar o aumento crescente da densidade óptica à medida que a dose de radiação aumenta e a diminuição da diferença entre o pico de absorção máxima e mínima, em 280 e 250 nm, respectivamente (tabela 1). Essa análise concorda com os resultados obtidos por Baride e colaboradores na irradiação de venenos de Naja naja, E. carinatus, B. cherulatus e V. russeli. Os resultados obtidos indicam prováveis mudanças conformacionais nas proteínas, uma vez que o aumento de absorção é causado pela maior exposição dos grupos cromóforos, possivelmente causado pelo desdobramento de cadeias polipeptídicas.

Os resultados apresentados mostram que as mudanças estrutu

rais observadas no veneno de jararaca, mesmo após a dose de 5000 Gy, são discretas, mostrando-se promissores para o prosseguimento do trabalho visando a atenuação. O estudo subsequente irá focar as propriedades imunológicas e toxicológicas do veneno, procurando confirmar a radiorresistência das propriedades imunogênicas do veneno atenuado, descritas por Puranananda, 1972; Salafranca, 1973 e Murata, 1988.

Tabela 1: Absorvância no pico máximo e mínimo obtidas no espectro de absorção na região ultravioleta de amostras de veneno no botrópico.

Amostra	Absorvância max. (280nm)	Absorvância min. (250nm)	Absorvância
NI	0,73	0,42	0,31
500	0,71	0,46	0,25
1000	0,71	0,47	0,24
2000	0,77	0,53	0,24
5000	0,82	0,60	0,22
NI - amostra não irradiada			

Nas figuras que se seguem as amostras estão identificadas com a seguinte numeração:

1. veneno não irradiado
2. veneno irradiado com 500 Gy
3. veneno irradiado com 1000 Gy
4. veneno irradiado com 2000 Gy
5. veneno irradiado com 5000 Gy

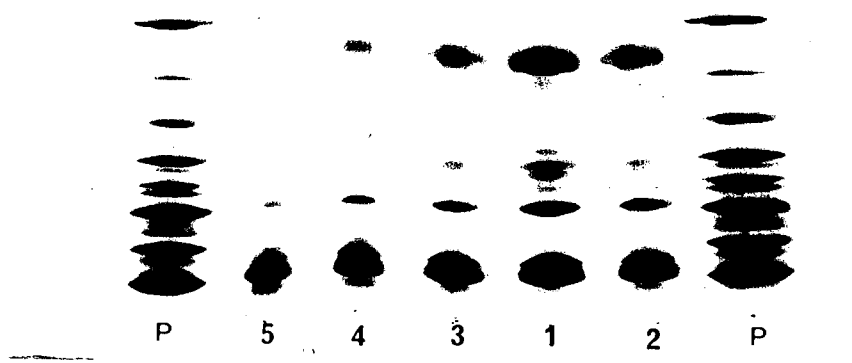


Figura 1: Eletroforese de veneno de jararaca não irradiado e irradiado nas doses de 500, 1000, 2000 e 5000 Gy em gel de poliacrilamida em sistema descontínuo com SDS, corada com Coomassie brilliant blue R-250. As amostras foram pré-tratadas com uréia e beta-mercaptoetanol.

P - Proteínas Padrões

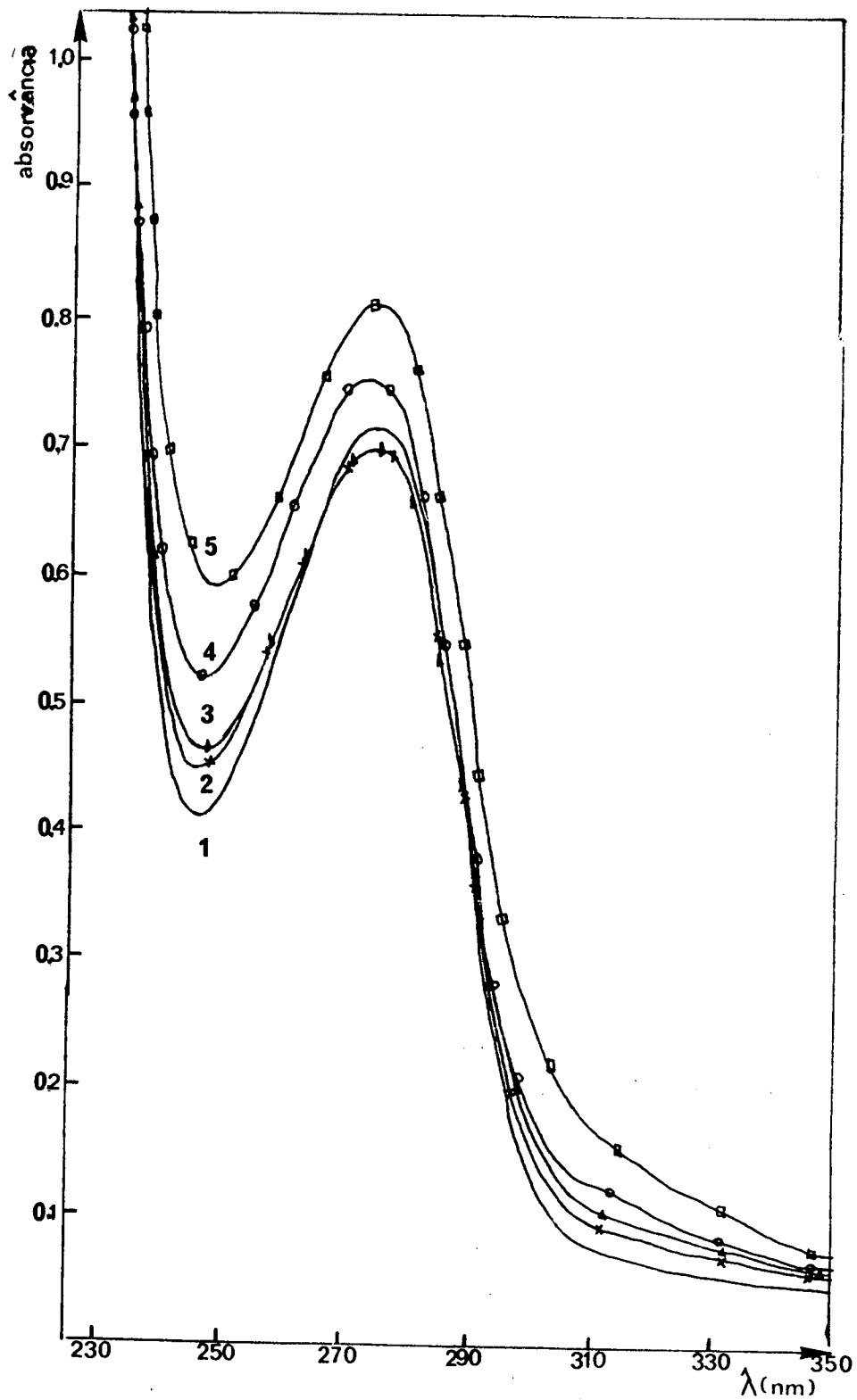


Figura 2: Espectro de absorção na região ultravioleta de amostras de veneno botrópico em solução de NaCl 0,85%, na concentração de 500µg/ml. Na leitura do espectro utilizou-se o intervalo de absorvância de 0 a 1,0, com uma variação de comprimento de onda de 0,5 nm/segundo, entre 240 e 350 nm. A velocidade do papel foi de 20 nm/polegada.

## BIBIOGRAFIA

01. BARIDE, R.M; JAIN, S.D., GAITONDE, B.R.-Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes.  
IN: Indian J. Med. Res., 72:571-6, 1980.
02. BUTTER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, J. - Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological system.  
IN: Radiat. Phys. Chem., 24 (314):273-82, 1984.
03. DENSON, K.W.E. and ROUSSEAU, W.E. - Separation of the coagulant components of Bothrops jararaca venom.  
IN: Toxicon, 7:5-11, 1969.
04. ELLMAN, G.L. - Tissue Sulphydryl groups.  
IN: Arch. Biochem. Biophys., 82:70-7, 1959.
05. KANKONKAR, S.R.; KANKONKAR, R.C.; GAITONDE, B.B. - Irradiated cobra Naja naja venom for biomedical application.  
IN: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Radioesterilization of medical products: proceedings of a symposium on ..., held in Bombay, 9.13 Dec. 1974. Vienna, 1975. p. 253-62.
06. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.- Protein measurement with the folin phenol reagent.  
IN: J. Biol. Chem., 193:265-75, 1951.
07. MILLER, G.L. - Protein determination for large numbers of samples.  
IN: Anal. Chem., 31:964, 1959.
08. MURATA, Y. - Efeitos da radiação gama no veneno de Crotalus durissus terrificus. - São Paulo, 1988 - Tese - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares autarquia associada à Universidade de São Paulo.
09. MURATA, Y.; NISHIKAWA, A.K.; NASCIMENTO, N.; HIGASHI, H.G. ; DIAS DA SILVA, W. and ROGERO, J.R. - Gamma irradiation reduces the toxic activities of Crotalus durissus terrificus venom but does not affect their immunogenic activities. Third Pan-American Symposium of Animal, Plant and Microbial Toxins. México, 1990 - In Press.
10. PURANANANDA, C. - Studies of effects of radiations snake venoms with special aspects on their sterilization. Vienna, International Atomic Energy Agency, 1972. (IAEA-R-661).
11. SALAFRANCA, E.S. - Irradiated cobra (Naja naja philippinensis) venom.  
IN: Int. J. Appl. Radiat. Isot., 24(1):60, 1973.