

## REAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES COM PROTEÍNAS E ENZIMAS: INATIVAÇÃO DO VENENO DE *BOTHROPS JARARACA*

MIRIAM C. GUARNIERI<sup>1</sup>; CARLA M. L. VASCONCELOS.<sup>1</sup>; EMERSON A. ARAÚJO<sup>2</sup> e JOSÉ R. ROGERO<sup>3</sup>

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

2. Lab de Radioisótopos, Depto. de Biofísica e Radiobiologia, CCB, UFPE, Pernambuco.

3. Departamento de Aplicações Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

### INTRODUÇÃO

Venenos ofídicos são misturas proteicas extremamente complexas e tóxicas, que causam um grande número de acidentes, principalmente em países tropicais como o Brasil (2000 acidentes/ano). Devido ao grande número de espécies e subespécies, a grande maioria dos acidentes corresponde ao gênero *Bothrops*. Nesses casos, o único tratamento de eficácia comprovada é a soroterapia, sendo o antissoro produzido a partir da hiperimunização de eqüinos com venenos ofídicos. Os animais soroprodutores desenvolvem os sintomas do envenenamento e nem sempre sobrevivem ao processo de imunização. Por essa razão vários métodos têm sido estudados com o objetivo de destoxicar esses venenos, inclusive a radiação gama.

### OBJETIVO

Uma vez que em trabalhos anteriores mostramos que o veneno de jararaca submetido à dose de 2000 Gy de raios gama, provenientes de uma fonte de <sup>60</sup>Co, apresenta suas atividades tóxicas e enzimáticas atenuadas e suas propriedades imunológicas mantidas, o presente estudo pretende identificar a participação dos radicais hidroxila (OH·) e elétrons hidratados (e<sup>-</sup>aq) nas alterações radioinduzidas no veneno de jararaca.

### METODOLOGIA

O veneno de jararaca em solução salina (2mg/ml) foi irradiado com a dose de 2000 Gy (taxa de dose= 860 Gy/h), na ausência e presença de diferentes concentrações de nitrato de sódio (0,001; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1M) e álcool butílico terciário (0,1; 0,5; 1; 1,5 e 2M) e na presença de oxigênio. Amostras não irradiadas contendo as diferentes concentrações desses "scavengers" foram utilizadas como controle.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro aspecto abordado foi a capacidade da radiação gama promover precipitação de proteínas. Embora o veneno irradiado na ausência de "scavengers" não tenha apresentado precipitação, as amostras contendo 1,5 e 2M de butanol apresentaram redução do conteúdo proteico de 51,5% e 69,2%, respectivamente.

Análises cromatográficas em HPLC (TSK G3000) e eletroforéticas (EGPA-DSS) indicaram a formação de complexos de alto peso molecular no veneno irradiado na ausência de "scavengers". O mesmo processo foi observado nas amostras irradiadas na presença de nitrato de sódio, enquanto a amostra contendo 0,1M de butanol apresentou padrão similar ao veneno nativo e nas demais concentrações de butanol foram

observadas modificações diferenciais no peso molecular das proteínas.

O espectro de absorção na região ultravioleta indicou alterações conformacionais nas toxinas irradiadas na ausência de "scavengers", na presença de nitrato de sódio e de 1,5 e 2M de butanol, e padrão similar ao veneno nativo nas amostras irradiadas contendo 0,1; 0,5 e 1M de butanol.

As mais importantes atividades biológicas e enzimáticas dos venenos botrópicos (coagulante, proteolítica, hemorrágica e edemaciante) foram atenuadas pela irradiação na ausência de "scavengers".

As atividades hemorrágica e edemaciante foram radioprotegidas pela presença de 0,005M e 0,01M de nitrato de sódio (hemor.- 57% e 76,5%; edema- 21,5% e 24,9%, respectivamente) e pela presença de 0,1 a 1,5M de butanol, sendo obtida máxima proteção pelas concentrações de 0,1M (hemor.- 80,9%) e 1,5M (edema- 71,1%) desse álcool.

Em relação às enzimas proteolíticas, estas foram radioprotegidas por nitrato de sódio nas concentrações de 0,1M e 0,05M (33,8% e 20,3%, respectivamente) e pelas concentrações de 0,1 a 1,5M de butanol, sendo conferida proteção máxima pelas concentrações de 0,5 e 1M desses "scavenger" (49,3% e 48,5%, respectivamente). A concentração de 2M desse álcool causou radiosensibilização dessas enzimas.

Por outro lado, a atividade coagulante parece estar relacionada com os danos oriundos da interação com os radicais OH·, tendo sido somente observada radioproteção nas amostras contendo butanol, apresentando nas concentrações de 1,5 e 2M desse "scavenger" atividade igual ao veneno nativo (100% de radioproteção).

Vale ressaltar que todos os controles (amostras não irradiadas contendo diferentes concentrações de nitrato de sódio e butanol) apresentaram perfis cromatográficos, eletroforéticos, espectros de absorção e atividades testadas idênticas à amostra nativa, com exceção da amostra contendo 2M de butanol que apresentou redução de 35,8% e 45,5% das atividades proteolítica e hemorrágica, respectivamente.

Os resultados indicam o radical hidroxila como o maior promotor do dano, promovendo alterações na estrutura e no peso molecular e modificações conformacionais das toxinas, que resultam na atenuação das atividades biológicas e enzimáticas das mesmas.

Por outro lado, embora os elétrons hidratados pareçam não desempenhar papel relevante nas alterações estruturais radioinduzidas, estes agem conjuntamente com os radicais hidroxila promovendo a redução das atividades proteolítica, hemorrágica e edemaciante do veneno de jararaca. Esses elétrons podem ter reagido com aminoácidos específicos, importantes na ligação enzima-substrato ou localizados no centro ativo das enzimas responsáveis por essas atividades.

## CONCLUSÕES

Os resultados apresentados justificam a utilização da radiação gama como técnica de atenuação, visando a obtenção de imunógenos mais adequados à produção de soros hiperimunes e como ferramenta para estudos de estrutura e função de proteínas.

Apoio Financeiro: CNPq