

Estudo dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co na bothropstoxina 1 do veneno de *Bothrops jararacussu*

Diego de Almeida Silva, Murilo Casare da Silva, Patrick Jack Spencer
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

INTRODUÇÃO

Venenos ofídicos são misturas complexas de proteínas e peptídeos, além de carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos. Os principais componentes tóxicos são proteínas e as enzimas [1]

Os venenos botrópicos possuem grande quantidade de enzimas. Os efeitos destes venenos estão relacionados às suas propriedades proteolíticas, hemorrágicas e coagulantes.

A bothropstoxina I (BTHX I), um homodímero do veneno de *Bothrops jararacussu*, é uma miotoxina com 13721 Da. Apesar de não apresentar atividade catalítica, a BTHX I pode ser considerada uma fosfolipase A_2 por apresentar grandes semelhanças de estrutura com as fosfolipases A_2 de venenos de serpentes da família *Crotalidae* [2].

A irradiação de proteínas em solução aquosa tem sido estudada por causar mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas e nas estruturas primárias, secundárias e terciárias das proteínas. Estas mudanças estão relacionadas com perda de atividade biológica, além de poder interferir nas propriedades imunológicas após a irradiação.

Sendo assim, a irradiação da água ou de soluções aquosas consiste em um "ato primário", produzindo espécies moleculares e radicais livres.

A extensão do dano da radiação pode ser estudada e modificada pela adição, no momento da irradiação, de seqüestradores "scavengers" que possuem a capacidade de competir no meio pelas espécies reativas específicas. Os scavengers mais comumente empregados são: álcool t-butílico (radical hidroxila) e o nitrato de sódio (elétron aquoso).

Face ao exposto, verifica-se o interesse crescente no estudo dos efeitos da radiação gama nas proteínas.

Para isso, a BTHX I foi analisada antes e após a irradiação, na presença ou não de

substâncias "scavengers", para que se possam elucidar os efeitos de alguns dos produtos da radiólise da água nesta toxina.

OBJETIVO

Avaliar e caracterizar os efeitos da radiação gama de ^{60}Co na BTHX I.

METODOLOGIA

OBTENÇÃO DA TOXINA: Primeiramente, separou-se a BTHX I do veneno total de *Bothrops jararacussu* por meio do FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) utilizando uma coluna de troca iônica do tipo Resource S.

VERIFICAÇÃO DE PUREZA: Realizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% para verificar a pureza das frações obtidas.

ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS: Realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, visando comparar as frações de BTHX I nativas e irradiadas, na presença ou não de scavengers.

RESULTADOS

O perfil cromatográfico obtido (Figura 1) foi similar aos previamente obtidos para a BTHX I.

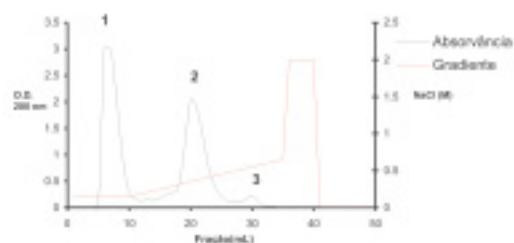


Figura 1: Perfil Cromatográfico Obtido na Purificação da Toxina por Troca Iônica

A fração purificada apresentou uma única banda com peso molecular em torno de 14 kDa (Figura 2), compatível com aquele descrito para a BTHX I.

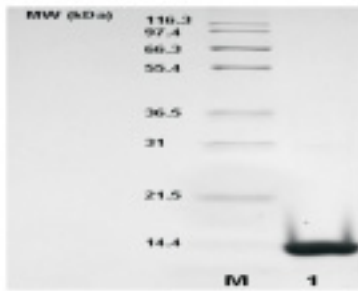


Figura 2: SDS PAGE da Fração Purificada na Presença de Agente Redutor (M-Marcadores de Peso Molecular; 1-Fração purificada)

A eletroforese das amostras de toxina, nativa e irradiada, com ou sem "scavengers" (Figura 3) indica que, nas condições analíticas por nós utilizadas, não foi possível identificar complexos de maior peso molecular (agregados solúveis) ou produtos de menor peso, resultantes de quebras na cadeia protéica.

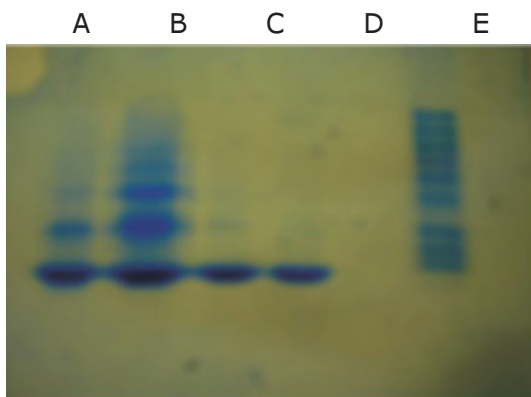


Figura 3: Eletroforese Em Gel de Poliacrilamida (A-BTHX I Nativa; B-BTHX I Nativa com Scavengers; C-BTHX I Irradiada; D-BTHX I Irradiada com Scavengers; E-Padrão de Massa Molecular)

CONCLUSÕES

A metodologia empregada na purificação da BTHX I mostrou-se eficaz.

A eletroforese das frações nativas e irradiadas (Figura 3) nos permite sugerir que as amostras irradiadas, com e sem scavengers, não apresentam mudanças significativas, já que as bandas obtidas para estas amostras se mostram muito similares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] MEYER, J. Venomous Snakes. In: STOCKER, K. F. Medical Use of Snake Venom Proteins. Boca Raton, Boston, 57-65, 1990.

[2] SPENCER, PJ, , Efeitos da radiação na estrutura da Bothropstoxina I. São Paulo, 88p. (Tese de Doutorado- IPEN- CNEN/SP, 2000).

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq/PIBIC