

# INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS FORMADAS A PARTIR DA IRRADIAÇÃO DE PROTEÍNAS

André Andrade Baceti e Nanci do Nascimento  
Centro de Biologia Molecular - CBM

## OBJETIVO

Comparar a crotamina, toxina do veneno da cascavel brasileira, na sua forma nativa e após a irradiação do tipo gama, utilizando a dose de 2kGy, na presença ou não de substâncias *scavengers* que competem especificamente por principais espécies reativas, tendo como abordagem os aspectos físico-químicos e biológicos desta toxina.

## METODOLOGIA

A crotamina foi purificada do veneno total por gel-filtração seguida de cromatografia de troca catiônica [1], sendo então liofilizada. A seguir, a toxina foi irradiada em solução, na presença ou não de aceptores de radicais livres (*scavengers*). A crotamina foi então analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida e espectroscopia ultravioleta visando determinar possíveis alterações estruturais. Também avaliamos os efeitos da irradiação na atividade biológica da toxina em camundongos.

## RESULTADOS

A crotamina foi purificada com sucesso, resultando em uma única banda, com a massa molecular esperada, quando analisada por eletroforese (Figura 1). A irradiação não levou a formação de agregados insolúveis, diferentemente do que ocorre para outras toxinas [2]. A eletroforese do peptídeo após a irradiação sugere que, mesmo na presença de *scavengers*, houve formação de agregados solúveis e que esta formação era minimizada na presença de  $\text{NaNO}_3$ ,

um aceptor de elétron aquoso [3]. Por sua vez, os dados de espectroscopia indicam que a adição de *scavengers* por si só já levou a modificações estruturais da molécula. A irradiação levou às alterações no espectro ultravioleta, evidenciando mudanças conformacionais em todas as amostras (Figura 2 e 3). Os ensaios de atividade biológica indicam que, nas concentrações de toxina utilizadas, a irradiação aboliu a toxicidade da crotamina, mesmo na presença de *scavengers* (Tabela 1).



Figura 1. : Corrida em gel de poliacrilamida 20% das amostras de crotamina. 1,8- Peso molecular; 2- Nativa; 3- Nativa com butanol; 4- Nativa com  $\text{NaNO}_3$ ; 5- 2kGy sem "scavenger"; 6- 2 kGy com

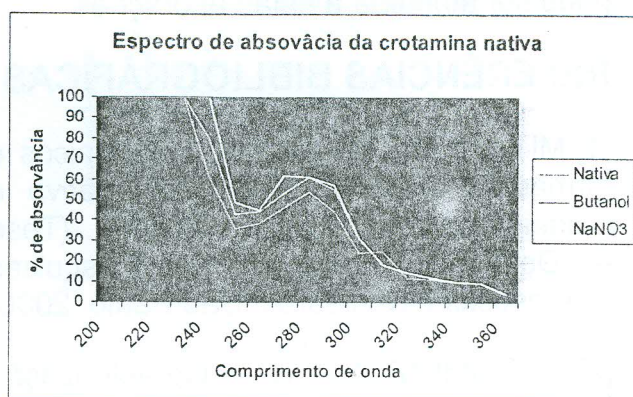


Figura 2.: Varredura do espectro de absorvância da crotamina nativa na presença ou não de "scavenger".

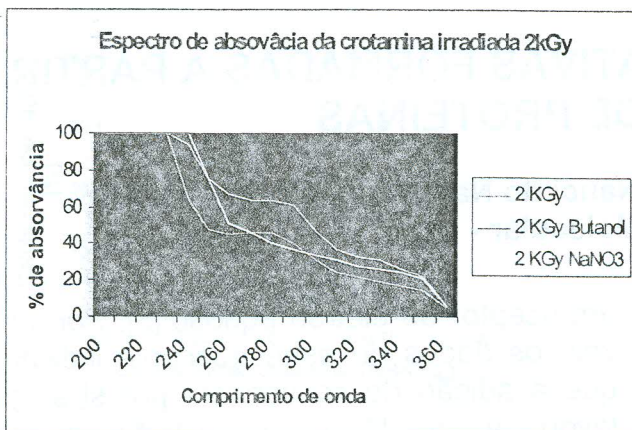


Figura 3.: Varredura do espectro de absorvância da crotoxina irradiada com 2 kGy na presença ou não de "scavenger".

Tabela 1 - Presença ou ausência de atividade da crotoxina de acordo com a amostra inoculada (+ presente; - ausente).

Amostra inoculada	Paralisia
Nativa sem "scavenger"	+
Nativa com butanol	+
Nativa com NaNO <sub>3</sub>	+
Irradiada 2000 Gy sem "scavenger"	-
Irradiada 2000 Gy com butanol	-
Irradiada 2000 Gy com NaNO <sub>3</sub>	-

## CONCLUSÕES

A irradiação da crotoxina levou a formação de agregados solúveis, sendo este efeito minimizado na ausência do elétron aquoso. O peptídeo irradiado apresentou mudanças estruturais, mesmo na presença de aceptores de radicais livres, sugerindo um efeito sinérgico dos produtos da radiólise da água. A ausência de atividade biológica da toxina irradiada pode ser atribuída a estas alterações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] MITAKE, M. B. Estudos bioquímicos e farmacológicos das crotoaminas nativa e irradiada com radiação gama <sup>60</sup>Co. (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000.

[2] NASCIMENTO, N. Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de

crotoxina. (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1995.

[3] ANDRIANI, E. P. Irradiação da crotoxina em solução aquosa: influência das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas. (Dissertação – Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1995.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq