

Aspectos estruturais da crotoxina modificada pela radiação ionizante

Karina Corleto de Oliveira¹, Felipe Guimarães Albero, Denise Maria Zzell, Patrick Jack Spencer e Nanci do Nascimento

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN – CNEN / SP

Av. Professor Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária

CEP: 05508-000 – São Paulo – SP – Brasil

¹e-mail: kcorteto@usp.br

RESUMO

A radiação ionizante tem se mostrado como excelente ferramenta na diminuição da toxicidade de venenos e toxinas isoladas resultando na obtenção de melhores imunógenos para a produção de soro, único tratamento eficaz nos casos de acidentes ofídicos, além de contribuir para o bem estar dos animais soro-produtores. Assim, este trabalho teve por objetivo a caracterização estrutural da crotoxina, uma proteína do veneno da espécie *Crotalus durissus terrificus*, por Dicroísmo Circular (CD) e Espectroscopia de Infravermelho (FTIR). Após o isolamento da toxina por cromatografia, a crotoxina foi irradiada com 2,0 kGy (fonte de ⁶⁰Co). O espectro de CD, obtido das soluções de crotoxina nativa e irradiada, mostrou variações entre as amostras, tanto em regiões características da estrutura folha β como a da α -hélice. A análise de Infravermelho também mostrou diferenças significativas no espectro da crotoxina nativa e irradiada, considerando principalmente a banda da amida I. Tais resultados indicam que a radiação provoca mudanças progressivas na estrutura da toxina, o que poderia explicar a perda de sua neurotoxicidade após irradiação.

Descritores: crotoxina, radiação gama, Dicroísmo Circular, Espectroscopia de Infravermelho.

ABSTRACT

Ionizing radiation has proven to be an excellent tool for reducing the toxicity of venoms and isolated toxins, resulting in better immunogens for serum production, the only effective treatment in case of snake bites, and contributing to the welfare of serum-producing animals. Since the action of gamma radiation on venoms and toxins has not been yet fully clarified from the structural point of view, we proposed in this paper, to characterize the crotoxin, a venom protein of the species *Crotalus durissus terrificus*, by Circular Dichroism (CD) and Infrared Spectroscopy (FTIR) techniques. After chromatographic techniques, crotoxin was irradiated with 2.0 kGy (⁶⁰Co source). The CD spectra obtained of native and irradiated crotoxin solutions showed changes between the samples in characteristic regions of β -sheet and α -helix. The Infrared analyse showed changes expressive in the spectra of the native and irradiated crotoxin (amide I band region). These tests showed that crotoxin when subjected to gamma radiation, showed changes in their structural conformation compared with the samples in the native state. Such changes probably occur in the secondary structure and may explain its neurotoxic activities lose.

Keywords: crotoxin, ⁶⁰Co gamma radiation, Circular Dichroism, Infrared Spectroscopy.

INTRODUÇÃO

A crotoxina, objeto deste estudo, é o principal componente tóxico do veneno da *Crotalus durissus terrificus*, representando cerca de 70% do seu peso total. É uma neurotoxina e como tal, exerce sua ação fisiopatológica por inibir a

transmissão neuromuscular, bloqueando a liberação de acetilcolina [1]. Em adição aos seus efeitos pré-sinápticos, a crotoxina também age de forma pós-sináptica bloqueando a resposta à acetilcolina através da estabilização do receptor colinérgico em um estado conformacional inativo [2-5].

A crotoxina é formada por duas subunidades diferentes: a fosfolipase A₂ uma subunidade básica, com peso molecular de 14,3 kDa e pI = 8,9; e a crotapotina, ácida, 9,2 kDa e pI = 3,8. [6]. O efeito tóxico da crotoxina ocorre a partir de um comportamento sinérgico entre as duas subunidades.

Estudos com proteínas submetidas à ação da radiação gama têm demonstrado a eficiência do método como ferramenta na destoxicação do veneno e no aprimoramento de imunógenos, somado à vantagem de não adicionar novas moléculas à amostra durante o processo, como ocorre no caso do uso de agentes químicos [7,8]. Adicionalmente, observa-se ainda a melhoria da antigenicidade de grande parte das toxinas submetidas aos efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co [9-11].

Os efeitos da radiação ionizante podem ocorrer diretamente sobre a molécula irradiada, ou indireto, onde a radiação interage com as moléculas de água presentes no meio onde está dissolvida a amostra. Neste caso, são formados os produtos da radiólise da água (OH•, H•, elétron aquoso e outros), que correspondem a cerca de 70% do efeito biológico produzido pelas radiações. Destruição de aminoácidos, rompimento de cadeias peptídicas, alterações de ligações (H-H e S-S) intramoleculares e reorganização da molécula protéica por agregação, são algumas das alterações estruturais que podem ocorrer, levando às mudanças nas propriedades biológicas (enzimáticas, farmacológicas e imunológicas) das proteínas [12,13].

Embora alguns estudos já tenham esclarecido alterações biológicas e imunoquímicas de toxinas submetidas à radiação ionizante, ainda permanecem dúvidas em relação às mudanças na estrutura conformacional da proteína e conseqüentemente como isto poderá acarretar a diminuição da toxicidade da mesma.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a caracterização estrutural da crotoxina, por meio de duas técnicas: Dicroísmo Circular (CD) e Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).

MATERIAL E MÉTODOS

Veneno: O veneno de *C.d.terrificus* foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudo

de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP- UNESP- Botucatu.

Isolamento da toxina: O veneno total foi dissolvido em tampão formiato de amônio, 100 mM, pH 3,0 e fracionado em coluna de exclusão molecular Superdex G-75. A fração correspondente à crotoxina foi coletada, liofilizada e ressuspensa em 3,0 mL de tampão Tris/HCl, 50 mM, pH 8,2 (tampão A) e aplicada em uma coluna de troca aniônica do tipo Mono Q. A crotoxina adsorvida à coluna foi eluída em um gradiente linear de NaCl, de 0 a 1 M, em tampão idêntico ao A, exceto pela adição do sal (NaCl). As frações correspondentes à crotoxina foram coletadas e dialisadas exaustivamente contra água em membrana apropriada. Em seguida a crotoxina foi liofilizada e mantida em freezer – 20 °C.

Irradiação da toxina: A crotoxina em solução salina, na concentração de 2 mg/mL, foi irradiada com raios gama provenientes de uma fonte de ⁶⁰Co (*GammaCell 220, da Atomic Energy of Canada Limited*), a temperatura ambiente e na presença de oxigênio atmosférico. A dose total foi de 2 kGy e a taxa de dose, de 2,09 kGy/h.

Dicroísmo Circular: Para esta análise 500 µL das amostras foram colocadas em celas de quartzo, com 0,1 mm e houve uma variação de comprimento de onda de 195 a 250 nm. A temperatura durante todo o experimento foi mantida em 20 °C.

Espectroscopia de Infravermelho: As amostras de crotoxina, na forma nativa e irradiada, foram analisadas usando a seguinte configuração: intervalo espectral de 650 a 2 000 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e 120 scans. Os espectros obtidos foram corrigidos na linha base e normalizados em relação à área da banda de amida I para minimizar a variação da homogeneidade das amostras. A porcentagem de cada área das bandas foi calculada com base na literatura.

RESULTADOS

A **Figura 1** ilustra o perfil da crotoxina nativa (curva vermelha) e irradiada (curva azul) obtido por CD. Podem ser observadas alterações na estrutura secundária da proteína após irradiação nas seguintes regiões: região de

transição de folha β que compreende o intervalo entre 195 e 200 nm e o comprimento de onda próximo a 216 nm; e as regiões de $\sim 208 - 210$ nm e ~ 222 nm que caracterizam transições da estrutura α -hélice. Os intervalos correspondentes à região de folha β podem apresentar imprecisões devido a própria natureza

desta estrutura. Assim, as análises de CD são mais sensíveis para a região de α -hélice.

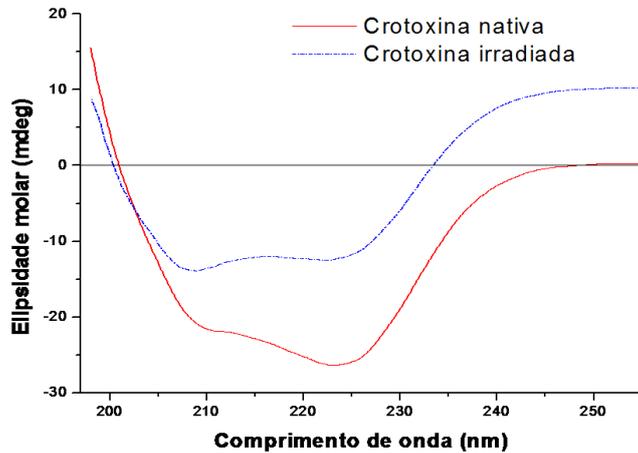


Figura 1: CD da crotoxina nos estados nativo e irradiado. As amostras, na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, encontravam-se em tampão fosfato, 25 mM, pH 7,2.

Na **Figura 2** observa-se a diferença entre os espectros da crotoxina nativa (vermelha) e irradiada (azul) na região

destacada, que representa as áreas das bandas das amidas I e II, regiões importantes neste tipo de análise.

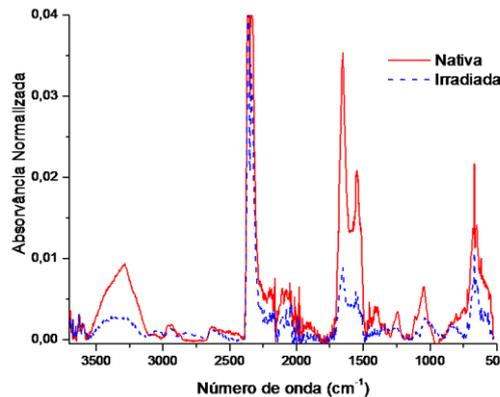


Figura 2: Espectro de ATR-FTIR da crotoxina nativa (curva vermelha) e irradiado (curva azul).

A **Figura 3** ilustra o espectro de ATR-FTIR da região da banda da amida I, de maneira ampliada, para a crotoxina nativa (curva vermelha) e para a irradiada (curva azul). Pode-se visualizar que a

proteína irradiada possui aumento da intensidade de alguns picos, porém não houve um significativo deslocamento dos picos.

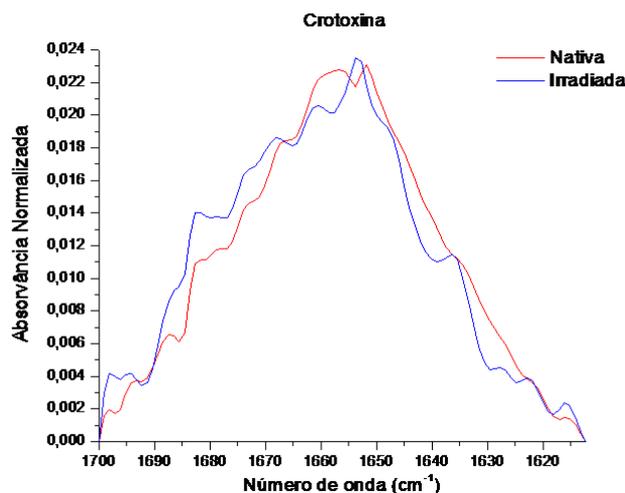


Figure 3: Espectro da região da banda da amida I, obtido por ATR-FTIR, da crotoxina no estado nativo (curva vermelha) e irradiado (curva azul).

A **Figura 4** ilustra o histograma obtido a partir das frações que correspondem à estrutura secundária da crotoxina, evidenciando que a proteína nativa tem uma maior quantidade de α -hélice.

Após o processo de irradiação, há a diminuição de β -turns, aumento de folha β e uma redução significativa de α -hélice.

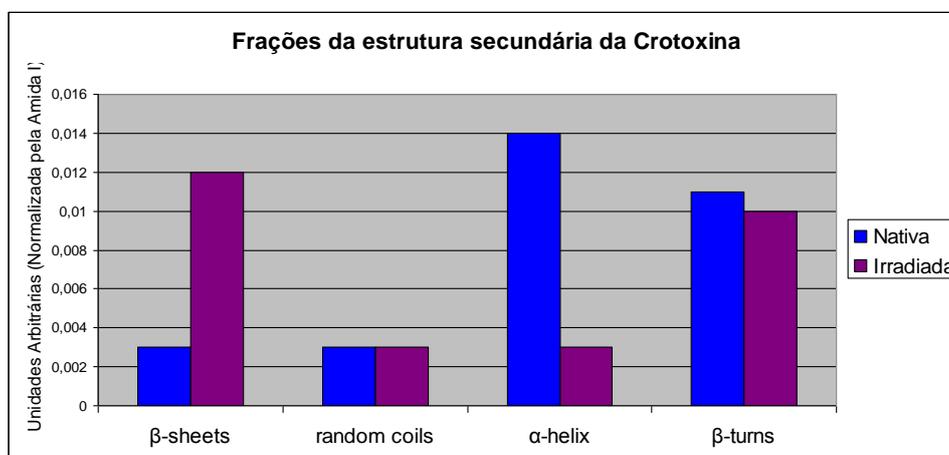


Figura 4: Histograma das frações da estrutura secundária da crotoxina, comparando as quantidades estruturais encontradas na amostra nativa (azul) e irradiada (roxa).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A determinação da conformação estrutural pode promover um sólido entendimento da função biológica da proteína [14]. Considerando que as alterações observadas em toxinas irradiadas, como a diminuição da toxicidade e a manutenção de propriedades

imunológicas, apresentam-se como consequências de alterações conformacionais, o entendimento das mudanças estruturais nas proteínas irradiadas poderia esclarecer como tais processos modificam as funções biológicas e imunológicas das toxinas de venenos.

Sabe-se que quando a estrutura nativa de uma proteína, contendo regiões de α -hélice e folha β , é desnaturada, as

proporções entre tais regiões encontradas inicialmente, são alterada.

O resultado do CD, referente ao perfil da estrutura nativa corrobora os achados de Aird e cols. (1989) [15] que analisou de forma comparativa a crotoxina e suas subunidades em 4 venenos do gênero *Crotalus*. Foi possível verificar uma nítida diferença entre os espectros da toxina nativa e após irradiação. A região de 222 nm, característica de α -hélice, por meio de equações propostas por Goormaghtigh e cols. (2009) [16], representou cerca de 78,5% do espectro total para a crotoxina nativa. A mesma análise foi realizada para a crotoxina irradiada, e o valor obtido foi aproximadamente 40%, comprovando, portanto, uma significativa diminuição da estrutura de α -hélice da amostra irradiada em comparação à toxina nativa.

A existência de isoformas da crotoxina e o fato de que estas isoformas coexistem, muitas vezes, no veneno de uma única serpente, pode dificultar a determinação da estrutura secundária considerando que neste estudo não foi realizado o isolamento de uma isoforma específica.

O desenvolvimento do método Transformada de Fourier (FTIR) ampliou a aquisição de dados no IR, cujo sinal medido resulta da intensidade de absorção da radiação IR pela amostra.

Dentre as nove bandas características de vibração do FTIR, a banda da amida I é extremamente usual para a análise da composição estrutural e mudanças conformacionais na estrutura secundária das proteínas, uma vez que apresenta alta sensibilidade a pequenas variações na geometria molecular.

Foi possível observar ainda que a região entre 3500 e 3200 cm^{-1} também se destacou com relação à diferença espectral na curva das amostras nativa e irradiada. Embora tal intervalo não seja significativo no estudo da estrutura secundária, é importante considerar que a região de $\sim 3500 \text{ cm}^{-1}$ corresponde à ligações O-H de grupos hidroxil e a região de $\sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ corresponde à ligações N-H do grupamento amida [17]. Estes compostos possuem grupos -OH e -NH capazes de formar uma forte rede de ligações intermoleculares. É isto que origina a estrutura terciária das proteínas, isto é, a sua forma característica de orientação espacial. Assim, os espectros de FTIR sugerem que a estrutura terciária da crotoxina sofreu alterações,

uma vez que se verificou uma menor absorvância na curva da amostra irradiada em relação à toxina nativa.

Foi possível observar que o espectro da crotoxina, antes da irradiação, mostrou uma curva com suaves picos ao longo da região da amida I. Após a irradiação, houve o surgimento de picos bem definidos, antes não identificados. Possivelmente estes picos existiam no espectro, porém apareciam de forma discreta.

Os resultados ainda mostram que a estrutura α -hélice (45,2%) prevalece em relação às demais. Além disso, também se verificou a presença em grande parte de β -turns (35,5%). Após a irradiação ocorreu um grande aumento da folha β (de 9,7% para 42,85%) e uma consequente diminuição de α -hélice (10,7%), sendo que a estrutura randômica e β -turns não tiveram variação significativa. Cabe dizer ainda, que as quantidades estruturais obtidas por FTIR para a crotoxina, estão bem próximas dos valores apresentados por Hanley (1979) [18], Aird e cols. (1989) [15] e pelo banco de dados (PDB) [19].

A baixa resolução dos resultados obtidos nas técnicas de CD e ATR-FTIR claramente não promovem uma informação estrutural detalhada, entretanto, eles podem ajudar a construir o espaço existente entre a sequência de aminoácidos e a função da proteína, uma vez que promovem indícios sobre a conformação estrutural que a proteína pode adotar. Em adição, muitas destas técnicas são rápidas e requerem uma pequena quantidade de amostra, fatores de grande importância em diversos casos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Butantan, ao CEVAP, ao Centro de Lasers e Aplicações (CLA) e Tecnologia das Radiações (CTR).

REFERENCIAS

- [1] HORTNAGEL, H. & HANIN, J. **Toxins affecting the cholinergic system**. 1992. In. Selective neurotoxicity. Herken, H.; Hucho, F. (Eds.). Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 293-332.
- [2] VITAL BRAZIL, O. & EXCELL, B.J. Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus Durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog

- neuromuscular junction. **J. Physiol.**, v. 212, p. 34-35, 1971.
- [3] VITAL BRAZIL, O.; FRANCESCHI, J.P.; WAISBICH, E.P. Pharmacology of crystalline crotoxin. I. Toxicity. **Mem. Inst. Butantan**, v. 32, p. 973, 1966.
- [4] HANLEY, M. Crotoxin effects on *Torpedo californica* cholinergic excitable vesicles and the role of its phospholipase A activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 82, p. 392-401, 1978.
- [5] BON, C.; CHANGEUX, J.F.; JENG, T.W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, v. 99, p. 471-81, 1979.
- [6] FAURE, G. & BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and their biological activities. **Biochem.**, v. 27, p. 730-738, 1988.
- [7] GRASSET, E. Anavenoms and their use in the preparation of antivenoms sera. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 38, p. 463-488, 1945.
- [8] GUIDOLIN R.; DIAS DA SILVA W.; HIGASHI H.G.; CARICATI C.P.; LIMA M.L.S.R.; MORAIS J.F.; PINTO J.R.; MARCELINO J.R. Hiperimunização de cavalos soroprodutores com venenos botrópico e crotálico tratados por glutaraldeído. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 85-90, 1989.
- [9] OKONOGI, T.; HATTORI, Z.; OGIJO, A.; MITSUI, S. Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. **Toxicon**, v. 17, p. 524-527, 1979.
- [10] PINHO, J.R.R.; CARDI, B.A.; ANDRADE Jr., H.F.; BARR, P.J.; BATHURST, I.C.; VICENTE, E.J.; SCHENBERG, A.C. Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. **Int. J. Leprosy**, v. 63(3), p. 381-390, 1995.
- [11] NASCIMENTO, N.; SEEBART, C.S.; FRANCIS, B.; ROGERO, J.R.; KAISER, I.I. Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, v. 34(1), p. 123-131, 1996.
- [12] MICHAELS, H.B.; HUNT, J.W. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. **Radiat. Res.**, v. 74, p. 23-34, 1978.
- [13] GARRISON, W.M. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. **Chem. Rev.**, v. 87, p. 381-398, 1987.
- [14] PELTRON, J.T. & MCLEAN, L.R. Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure. **Anal. Biochem.**, v. 227, p. 167-176, 2000.
- [15] AIRD, S.D.; STEADMAN, B.L.; MIDDLEAUGH, C.R.; KAISER, I.I. Comparative spectroscopic studies of four crotoxin homologs and their subunits. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 997, p. 211-218, 1989.
- [16] GOOMAGHTIGH, E.; RÉGIS, G.; AUDREY, B.; ANDRÉA, G.; VINCENT, R. Protein secondary structure content in solution, films and tissues: Redundancy and complementary of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1794, p. 1332-1343, 2009.
- [17] BEEKES, M.; LASCH, P.; NAUMANN, D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. **Vet. Microbiol.**, v. 123(4), p. 305-319, 2007.
- [18] HANLEY, M.R. Conformation of the Neurotoxin Crotoxin Complex and Its Subunits. **Biochemistry**, v. 18(9), p. 1681-1688, 1979.
- [19] PROTEIN DATA BANK. Banco de dados. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 10 jan. 2010.