**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**Estudo das interações dos produtos de radiólise da
água com a miotoxina do veneno de *Crotalus durissus*
*terrificus***

MURILO CASARE DA SILVA

**Tese apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do Grau de**

Orientadora: Dra.: Nanci do Nascimento

SÃO PAULO

2008

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por renovar as minhas forças a cada momento em que ela me faltava e por sempre me abençoar em todas as tomadas de decisões.

A minha esposa Adeli que por tantas vezes me fez repensar a maneira de ver as coisas e por sempre ter uma palavra de incentivo ou de força para me dar.

Aos meus pais Carmelino e Antonia, que são o meu “alicerce”, por tudo que eles me fizeram. Já que se hoje sou alguma coisa é graças a eles.

Aos meus irmãos Vitor e Danieli e aos meus cunhados Juliana e Átila por todo apoio e por tantas vezes me ajudarem.

Ao meu sobrinho Matheus que certamente serve de incentivo para cada vez mais seguir em frente.

A família da minha esposa, que agora se tornou também minha família por todo apoio e incentivo.

Aos meus amigos Alberto, Janaína, Marcos Junior, Priscila, Rodrigo Mosca, Thiago, Karina, Erika, André, Diego, do departamento de química de proteínas do IPEN que por me aturaram por todo esse tempo e por tanto me animarem em todos os momentos.

Aos amigos Andrés e Daniel Perez, do Instituto de Medicina Tropical que tanto me ajudaram.

Ao Doutor Roberto Fulfaro e à Doutora Mitiko Saiki, os primeiros a me darem oportunidade de ingressar neste Instituto.

Ao Doutor Luis Gonzaga e a Mestre Bianca Zychar, do laboratório de fisiopatologia do Instituto Butantã, por disponibilizarem o laboratório por tantas vezes que necessitei.

Ao Doutor Clovis Nakai e a Mestre Daniela Nardi, por todo auxílio nas análises estruturais e por toda força que me deram.

A Dra Ana Carolina Zeri e ao Doutor Maurício Luis Sforza, do laboratório Síncroton, por toda ajuda nas análises de ressonância nuclear magnética.

Ao Dr. Patrick Jack Spencer por todo apoio e por todos os momentos de conhecimento que me proporcionou.

Ao Doutor Heitor do Instituto de Medicina Tropical, por sempre estar de portas abertas para nos receber.

Aos funcionários do IPEN que certamente tantas vezes limparam e arrumaram a minha bagunça.

A todos os doutores do IPEN que de alguma forma tiveram participação neste trabalho.

A Doutora Nanci do Nascimento que por todo tempo de mestrado e doutorado sempre me deu confiança, autonomia e por tudo que me ajudou durante este tempo todo.

*Dedico este trabalho a minha Avó **Maria Virginia Canaveze Casares** que por todos os seus oitenta e tantos anos, continua me oferecendo o prazer da sua sabedoria e dando exemplos todos os dias de vontade de viver e de superação por tudo que tem passado*

*Dedico este trabalho **aos meus pais, meus irmãos, meu sobrinho e principalmente a minha esposa** que me incentivam todos os dias e que me ajudam nos momentos mais difíceis. Certamente passar tudo que passei só se fosse por vocês. Obrigado por tudo*

**Estudo das interações dos produtos de radiólise da
água com a miotoxina do veneno de *Crotalus durissus*
*terrificus***

MURILO CASARE DA SILVA

RESUMO

A radiação ionizante vem sendo empregada com sucesso na destoxicação de venenos. Neste trabalho a radiação foi utilizada para verificar os efeitos causados pelos produtos de radiólise da água na crotamina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Estes efeitos foram analisados com o uso de algumas substâncias denominadas "scavengers", que competem por espécies reativas específicas impedindo-as de agir na molécula.

Para estudar, então, os possíveis danos estruturais causados às toxinas foram utilizadas as técnicas de dicroísmo circular, fluorescência, análise de ressonância nuclear magnética, análise de aminoácidos e análise de microscopia intravital.

Os resultados obtidos demonstram que a radiação ionizante causa alterações estruturais importante nas estruturas secundárias e terciárias da crotamina. Também foi possível verificar que a toxina depois de irradiada não tem arranjo tridimensional detectável por ressonância nuclear magnética e ainda que o efeito tóxico da molécula é alterado quando a toxina foi irradiada.

INTERACTION STUDY OF WATER RADIOLYSIS PRODUCTS WITH CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS MIOTOXIN.

MURILO CASARE DA SILVA

ABSTRACT

Ionizing radiation has been satisfactorily employed for venoms detoxification. In this report, the radiation was employed to verify the effects caused by the radiolysis products of water on the Crotoamine, toxin purified from *Crotalus durissus terrificus* venom.

These effects were analyzed using some substances called "scavengers", those substances competes for specific reactive species hindering them to act on the toxins molecules.

In order to study the possible structural damages caused on the toxins, circular dichroism, fluorescence, nuclear magnetic resonance, amino acids analysis and intravital microscopy were employed.

Our results indicate that ionizing radiation caused structure alterations, mainly, in secondary and tertiary structure of crotoamine. In the irradiated crotoamine, wasn't possible determinate of tridimensional structure. And the crotoamine toxic effect was removed by ionizing radiation.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Radiação Ionizante	1
1.2 Venenos	7
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Purificação da toxina a partido do veneno total	14
<i>3.1.1 Cromatografia de exclusão molecular</i>	14
<i>3.1.2 Cromatografia em resina de troca iônica</i>	15
3.2 Dosagem de Proteínas	15
<i>3.2.1 Preparação de Reagente Bradford</i>	15
3.3 Cálculos das concentrações relativas entre "scavenger" e espécies reativas formadas durante a irradiação	16
3.4 Cálculo das concentrações dos "scavenger"	16
3.5 Irradiação das amostras	17
3.6 Análise de Dicroísmo Circular	18
<i>3.6.1 Princípios das análises de dicroísmo circular</i>	18
<i>3.6.2 Procedimento para análises de dicroísmo circular</i>	20
3.7 Análise de Fluorescência	20
<i>3.7.1 Princípios da análise de fluorescência</i>	20
<i>3.7.2 Procedimento para análise de fluorescência</i>	22

3.8 Análise de Aminoácido	22
<i>3.8.1 Princípios de Análise de Aminoácido</i>	22
<i>3.8.2 Procedimento para análise de aminoácido</i>	23
3.9 Análise de Microscopia Intravital	23
<i>3.9.1 Princípios da Microscopia Intravital</i>	23
<i>3.9.2 Procedimento para a microscopia intravital</i>	24
3.10 Análise Estatística	25
3.11 Análises de Ressonância Nuclear Magnética	25
<i>3.11.1 Princípios da ressonância nuclear magnética</i>	26
<i>3.11.2 Procedimento para análise de ressonância nuclear magnética</i>	26
4. RESULTADOS	27
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Radiação Ionizante

A ionização é o processo pelo qual um ou mais elétrons são retirados da camada de valência de um átomo ou molécula. O resultado deste processo é a formação de um par de íons negativo e positivo.

Quando um átomo absorve energia um elétron passa de uma camada mais interna para uma mais externa, este processo é denominado excitação. A energia que é absorvida por estes dois processos pode ser transferida para outros átomos e moléculas produzindo espécies altamente reativas, dentre eles os radicais livres (GROSCH & HOOPYWOOD, 1979).

A radiação, por promover desdobramento das moléculas protéicas, as torna mais sensíveis aos outros fatores físico-químicos, tais como mudanças de pH, hidrofobicidade e outros. Além disso, a radiação pode colaborar para a formação de ligações covalentes intermoleculares levando ao surgimento de dímeros, trímeros e outros.

A irradiação de proteínas, em solução aquosa, tem sido estudada por causar mudanças químicas, 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 (NASCIMENTO *et al.* 1996, ROGERO *et al.* 1999) .

Sabe-se que a energia absorvida da radiação ionizante pode inativar materiais biológicos por dois meios:

- **Efeito Direto:** observado quando a ionização é produzida na própria molécula durante a irradiação.

- **Efeito Indireto:** resultado das reações entre moléculas estudadas e os produtos de interação da radiação com a água ou outros solventes.

Quando um composto é irradiado em solução, o efeito indireto se associa ao direto.

Esses efeitos em macromoléculas são potencializados quando o fenômeno ocorre em solução aquosa. Há uma deposição da maior parte da energia da radiação nas moléculas de água, cujo processo é denominado de radiólise da água. As equações abaixo podem elucidar melhor este fenômeno:

Os produtos H_2O^+ e H_2O^- são muito instáveis podendo dissociar-se em:

Os radicais $\text{H}^\cdot$ e $\text{OH}^\cdot$ formados apresentam-se extremamente reativos, como:

A energia depositada na solução não é distribuída de forma homogênea na molécula. Esses produtos primários da radiólise da água reagem com certos grupamentos da molécula provocando danos como se nota abaixo:

Sendo assim, a irradiação da água ou de soluções aquosas consiste em um “ato primário”, produzindo espécies moleculares e radicais livres, os quais possuem alto poder de reação com as moléculas. As principais espécies formadas, acompanhadas de seus respectivos rendimentos para 100 eV de energia absorvida (valor de G), destacam a importância destas espécies reativas:

Sabe-se que as principais espécies reativas causadoras de danos em macromoléculas, radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e elétron aquoso ($\text{e}^-_{\text{aq.}}$), formadas no processo de radiólise da água durante a irradiação em solução, atuam sobre a molécula protéica causando modificações importantes.

O radical hidroxila é destacado por muitos autores como importante responsável por danos às macromoléculas (ADAMS *et al.*, 1972a ; ADAMS & POSENER, 1979; MILLIGAN *et al.*, 1993). Ele reage com a proteína principalmente pela abstração dos hidrogênios do carbono alfa ao grupo carboxílico e de grupos sulfidrilas, além de reagir com anéis aromáticos do triptofano, tirosina e fenilalanina, formando radicais altamente reativos (BUTLER *et al.*, 1984).

Os elétrons aquosos ($\text{e}^-_{\text{aq.}}$) reagem com os hidrogênios dos aminoácidos aromáticos da mesma forma que os radicais hidroxilas, além de promoverem a

desaminação de aminoácidos como a alanina, arginina, glicina, histidina, cisteína, cistina e aromáticos (BUTLER *et al.*, 1984).

A fragmentação da proteína em solução aquosa é afetada pela conformação local dos aminoácidos nas proteínas, acessibilidade para os produtos de radiólise da água e seqüência dos aminoácidos primários (MOON & SONG, 2001).

A albumina bovina vem sendo alvo de vários pesquisadores e apresenta um peso molecular de 66.000 Da. Apresenta uma cadeia peptídica simples, dois resíduos de triptofano, um grupo S-H e mais dezessete grupos S-S (SCHUESSLER & SCHILLING, 1984).

Esta proteína quando irradiada em condições anaeróbias, com baixas doses, forma poucos agregados, porém quando irradiada com doses maiores do que 1200 Gy, observa-se grande agregação. Por outro lado, na presença de oxigênio, a irradiação da albumina não apresenta formação significativa de agregados, mesmo com altas doses.

Isto ocorre em razão de a albumina conter poucos resíduos de triptofano, uma vez que quanto maior a quantidade destes resíduos, maior a oxidação promovida pela radiação. Sendo assim as proteínas com maior quantidade de resíduos de triptofano são mais radiossensíveis e deste modo protegem as ligações peptídicas do ataque dos radicais hidroxilas, inibindo a degradação e, conseqüentemente, a agregação (SCHUESSLER & SCHILLING, 1984).

Evidências também existem no sentido de que o grau de degradação das proteínas oxidadas diminui com o seu envelhecimento. O dano às proteínas pode ser visto como um desvio do “ciclo de vida” normal delas, que são eficientes máquinas de condução aos processos celulares essenciais.

Se alguns desses processos são alterados significativamente, então certamente conseqüências danosas podem ser esperadas. Isto pode ocorrer quando as proteínas são submetidas à ação das espécies reativas do oxigênio (FLOYD *et al.*, 2001).

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, impedindo a ação das mesmas na molécula.

Observa-se que na inativação de algumas proteínas como a albumina bovina e a ovomucóide, quando o N_2O está presente durante a irradiação, o elétron aquoso é rapidamente transformado em radical hidroxila (YANG *et al.*, 1996). Sabe-se ainda que sais inorgânicos, em solução de N_2O saturado, convertem o elétron aquoso em radical hidroxila e este radical reage com o sal para formar o ânion do seu respectivo sal.

O mais versátil radical ânion para o uso em estudos de proteínas é o $(CNS)_2^-$ e o Br_2^- devido à alta seletividade quando reage com outras proteínas (YANG *et al.*, 1996).

Existem outros produtos que podem ser utilizados como “scavengers”, um deles é o ácido ascórbico que consegue reagir com os radicais livres formados na radiólise da água (MOON & SONG, 2001).

Outros compostos orgânicos como os álcoois e as etanoaminas podem ser usados como “scavengers” para radicais hidroxilas.

Quando proteínas são irradiadas, ocorrem alterações químicas como fragmentação, *cross-link*, agregação e oxidação por radicais oxigênicos gerados na radiólise da água. Estas mudanças dependem da natureza química e estado

físico das proteínas, além das condições de irradiação, como fonte, dose, temperatura e outros.

Compostos com radicais sulfidrilas, por serem doadores de hidrogênio, são eficientes “scavengers” de radicais hidroxilas, mesmo em baixas concentrações. Azida sódica, L- histidina, acetato de nitrila, alcoóis metílico, etílico, isopropílico e butílico (MILLIGAN *et al.*, 1993), iodeto de potássio, manitol e etanol, íons tiocianato (ADAMS *et al.*, 1972a; ADAMS *et al.*, 1972b; ADAMS & POSENER, 1979), DL- ditioneitol (DTT), cisteína e álcool butílico terciário mostram-se efetivos radioprotetores, a depender das concentrações e dos sistemas utilizados. Dentre eles, o álcool butílico terciário apresenta algumas vantagens por produzir radicais não reativos e que desaparecem rapidamente do processo.

Foi observado que vários tipos de álcoois podem ser “scavengers” de radicais hidroxilas durante a irradiação com raios gama, protegendo bactérias *Escherichia coli* de danos provavelmente causados por este radical. Quando o álcool foi apenas incubado junto às bactérias e retirado antes da irradiação, notou-se uma radiosensibilidade das culturas, que foi diretamente proporcional à hidrofobicidade dos álcoois utilizados.

Como “scavenger” de elétron aquoso destacam-se o oxigênio, que age convertendo rapidamente em radicais ânions superóxidos os elétrons aquosos e hidrogênios em sua forma ácida e íons nitrato, que se mostram efetivos seqüestradores de elétron aquoso, mas não de radical hidroxila.

Vários fatores interferem na obtenção do efeito final da irradiação de proteínas, a saber: presença de oxigênio, tipo de fonte de radiação, dose e taxa de dose, temperatura de irradiação, tipo de solvente, presença de gases e

radiomodificadores, estado físico, concentração e pH. Desta maneira, o efeito final da irradiação de proteínas e, por conseguinte, de venenos ofídicos pode ser diferente, qualitativa e quantitativamente, de acordo com as condições empregadas (PURANANANDA, 1972). Diversos trabalhos demonstram que a radiação ionizante é uma excelente alternativa nos estudos de destoxicação de venenos e no estudo de alterações estruturais causadas nas moléculas protéicas irradiadas.

FERREIRA JUNIOR (2006) verificou que o veneno *Crotalus durissus terrificus* irradiado pode ser uma alternativa na obtenção de soros antiofídicos usando ovelhas como animais produtores.

CASARE (2003) demonstrou que os elétrons aquosos e os radicais hidroxilas gerados no processo de irradiação de crotoxina e crotamina em solução aquosa estão diretamente envolvidos no processo de erradicar ou diminuir os efeitos tóxicos destas proteínas e também na manutenção da imunogenecidade da crotoxina.

1.2 Venenos

As serpentes peçonhentas causam cerca de 30000 acidentes por ano no Brasil, desses 100 são levados a óbitos. (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2006). Cerca de 85% desses acidentes são causados pelo gênero *Bothrops*. O gênero *Crotalus* tem um alto índice de letalidade que chega a 72% dos casos de acidentados sem o tratamento com o soro anticrotálico e 11% dos casos tratados (ROSENFELD, 1991).

Os venenos ofídicos são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas, peptídeos e, em pequenas proporções, carboidratos, lipídeos,

nucl3eotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos. Os principais componentes tóxicos são as proteínas e as enzimas (MEYER, 1990).

O veneno crotálico tem vários componentes identificados, dentre eles destacam-se: convulxina, giroxina, delta toxina, crotoxina e crotamina.

A convulxina é uma glicoproteína de peso molecular 72 kDa, a toxicidade desta toxina foi estudada em vários modelos animais produzindo, quando inoculada por via intravenosa, os seguintes efeitos: convulsões tônico-clônicas, alterações circulatórias e alterações respiratórias, além de ser um potente ativador e agregador de plaquetas, na ausência de fibrinogênio (VARGAFTIG, *et. al.*, 1980).

A giroxina apresenta peso molecular de 34 kDa e provoca uma síndrome convulsiva muito particular em camundongos, caracterizada por movimentos circulatórios do corpo ao longo do seu eixo longitudinal. A giroxina ainda apresenta atividade coagulante do fibrinogênio no plasma de mamíferos, exercendo assim uma atividade do tipo trombina (ALEXANDRE, *et.al.* 1988).

A delta toxina foi primeiramente estudada por VITAL-BRAZIL (1980) que mencionava que esta toxina apresentava uma ação hemoconcentrante. CAMPOS (2006) isolou e caracterizou esta molécula que possui atividade agregadora de plaquetas e ativadora de fatores de coagulação.

A crotoxina é o principal componente do veneno, representando cerca de 60% do seu peso. Ela é uma beta-neurotoxina que possui alta toxicidade específica e é composta por duas sub-unidades ligadas não covalentemente. (SLOTTA & FRAENKEL-CONRAT, 1938).

A crotamina é um polipeptídeo fortemente básico, peso molecular de 4882 Da, composta por 42 aminoácidos, sem grupos sulfidrilas livres, firmemente

reticulados por três pontes dissulfeto, que lhe confere uma forma compacta. Ela tem alto conteúdo de lisina (9 resíduos), baixo de arginina (2 resíduos) e não possui valina, treonina e alanina (BELTRAN *et al.*, 1985). O N terminal é a tirosina e o C terminal é a glicina (MITAKE, *et. al.* 2001). A estrutura primária da crotamina é a seguinte:

FIGURA 1. Seqüência primária da crotamina com indicação das pontes dissulfeto (BELTRAN *et al.*, 1990).

A última estrutura tridimensional para a crotamina foi publicada por FADEL, *et al.*, 2005, conforme demonstrado abaixo.

FIGURA 2. Estrutura tridimensional das cadeias carbônicas da crotamina.

Esta toxina pode causar contração dos músculos esqueléticos devido a sua ação na membrana de fibras musculares causando um aumento de influxo de sódio. Portanto os efeitos tóxicos da crotamina podem ser explicados devido às alterações cinéticas dos canais de sódio (MATAVEL *et al.* 1998, CASARE, 2003).

FIGURA 3. Efeito causado pela crotamina, quando inoculado i.p.

RIZZI *et al.* (2007) estudaram o mecanismo de ação biológica da crotamina e demonstraram que esta toxina afeta os canais iônicos de maneira indireta, demonstraram ainda que a crotamina age de maneira diferente em músculos “fast” e “slow twitching”, apresentando preferência por inativar o “fast-twitching”.

A constituição do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, devido à presença de crotamina pode ser denominado: crotamina positivo e crotamina negativo. As serpentes que possuem venenos crotamina positivo podem ser encontradas ao oeste do Estado de São Paulo e os crotamina negativo, ao leste do Estado, tendo ainda uma região do estado que é híbrida, coexistindo ambos os tipos de veneno (SCHENBERG, 1959).

A seqüência primária da crotamina exibe alto grau de homologia com miotoxinas (LAURE, 1975). A crotamina possui 7 resíduos de aminoácidos aromáticos: uma tirosina (Tyr-1), duas histidinas (His-5 e His-10), dois triptofanos (Trp-32 e Trp-34) e duas fenilalaninas (Phe-12 e Ph-25). Desses aminoácidos seis

são conservados na família das miotoxinas, exceto pela Phe-25 (ENDO, *et al.* 1989).

TOYAMA *et al.* (2000) isolaram duas isoformas da crotamina denominadas F2 e F3 utilizando uma coluna Sephadex G75 como primeiro passo, posteriormente os pools foram passados em HPLC utilizando uma coluna de fase reversa C-18. Essas isoformas isoladas possuem uma estrutura tridimensional idênticas, diferenciando apenas 1 ou 2 resíduos de aminoácidos. Ambas as isoformas produziram paralisia espásticas em camundongo e a DL50 para as duas forma iguais em 0,5 mg/kg de camundongo. Por outro lado apenas a isoforma F2 afetou a secreção de insulina em ilhota de rato.

TOYAMA *et al.* (2003) estudaram a ação farmacológica e histopatológica destas isoformas chegando a conclusão de que as elas agem no influxo de sódio causando paralisia das fibras musculares que pode progredir para mionecrose. Ainda sugerem que essas isoformas podem agir em canais de cálcio.

A crotamina, devido a sua forma compacta é resistente a variação de temperatura.

A depender das condições as quais a crotamina é submetida, ela pode se auto-associar formando dímeros, trímeros ou ainda n-meros. Condições como o pH por exemplo pode ocasionar este efeito (HAMPE *et al.*, 1977, 1990).

Alguns trabalhos reportam sobre as análises da crotamina por ressonância nuclear magnética (NMR). ENDO *et al.* (1989) analisaram a toxina por esta técnica sugerindo que a crotamina apresenta dois estados estruturais diferentes em solução. Essas estruturas coexistem e podem refletir isômero *cis-trans* dos resíduos de prolina ou pode ocorrer uma dimerização da molécula com uma ponte dissulfeto intermolecular fazendo o link entre as duas sub-unidades.

Conforme já mencionado diversos estudos vem sendo desenvolvidos a fim de demonstrar a efetividade da radiação ionizante em erradicar a toxicidade e manter a imunogenecidade dos venenos ofídicos (NASCIMENTO *et al.* 1996). Para tais estudos venenos totais, ou toxinas isoladas tem sido utilizados. Cabe salientar que a imunologia envolvida neste processo está sendo continuamente bem esclarecida por diversos trabalhos que reportam, por exemplo, os mecanismos os quais a toxina irradiada é melhor reconhecida pelo macrófago quando irradiada (BAPTISTA, 2004, CASARE 2003, CASARE *et al.* 2006).

Por outro lado a parte que concerne os processos químicos que ocorrem com a toxina após a sua irradiação não está bem esclarecida.

A crotamina, como o descrito acima, apresenta-se como uma excelente opção para o entendimento das alterações estruturais causadas pela radiação ionizante nos processos de eliminação ou minimização da toxicidade, bem como o esclarecimento do papel das espécies reativas geradas no processo de irradiação dos venenos e toxinas (MITAKE *et al.* 2001)

2. OBJETIVO

Geral:

Este trabalho visou elucidar as alterações causadas na crotamina antes e após a irradiação na presença ou ausência de substâncias “scavengers”, tendo abordagem os seus aspectos bioquímicos.

Específicos:

Verificar as alterações estruturais causadas na crotamina nativa e irradiada com 2 kGy.

Observar a participação dos dois principais produtos de radiólise da água (radical hidroxila e elétron aquoso) no processo de destoxicação da crotamina em solução.

Avaliar a perda de toxicidade da crotamina nativa ou irradiada na presença ou ausência de substâncias “scavengers”, utilizando o método da microscopia intravital.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados para realização dos experimentos foram de qualidade *pró análise*. A água utilizada para o preparo das soluções foi destilada em aparelho de vidro e depois purificadas em sistema Milli Q.

Os animais utilizados foram camundongos “Swiss” machos com massas corpóreas entre 20 e 30g mantido em biotério, sendo sempre mantidos em gaiolas e meios absorventes (maravalha de pinho) freqüentemente trocadas e com alimentação adequada e água *ad libitum*.

A crotamina utilizada foi extraída do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* que é procedente do Centro de Estudos de Venenos de Animais Peçonhentos (CEVAP- Botucatu).

3.1 Purificação da toxina a partir do veneno total:

3.1.1 Cromatografia de exclusão molecular

Cerca de 150 mg de veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, na forma liofilizada, foram dissolvidos em 2 mL de tampão formiato de amônio 100mM, pH 3. A solução foi centrifugada por 10 minutos a 201 g, o sobrenadante foi aplicado à uma coluna de gel filtração Superdex 75, equilibrada com o tampão de formiato de amônio 100mM pH 3. As frações foram coletadas em coletor automático do sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) com determinação contínua da absorvância em comprimento de onda de 280 nm. As frações que continham os picos principais foram acondicionadas em frascos de vidro, congeladas e liofilizadas para posterior uso nas análises. A técnica utilizada foi a padronizado por MITAKE (2000), com algumas modificações.

3.1.2 Cromatografia em resina de troca iônica

A crotamina, também previamente semi-purificada, foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8 e aplicada em uma resina do tipo Resource S em sistema FPLC, estabilizada no mesmo tampão. Após a adsorção, a crotamina ligada à resina foi retirada com a passagem de um gradiente linear salino de 0 a 2 M de NaCl. A absorvância foi automaticamente verificada em 280 nm. As frações contendo a crotamina foram acondicionadas no mesmo recipiente. Posteriormente a crotamina foi dialisada e a membrana utilizada era da SIGMA[®], de capacidade entre 0 e 2100 Da, congelada, liofilizada e mantida em freezer com temperatura de menos 24° C para ser utilizada posteriormente.

3.2 .Dosagem de Proteínas

Para padronizar as concentrações das proteínas nos testes, deve-se determinar o conteúdo protéico destas amostras. O método utilizado foi aquele padronizado por BRADFORD (1976), cuja reação baseia-se na capacidade das proteínas interferir com a absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 em meio altamente ácido, resultando em modificação proporcional de cor, detectável em 595 nm.

3.2.1 Preparação do Reagente de Bradford

Inicialmente pesou-se cerca de 100 mg de Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250, dissolveu-se este reagente em 50 mL de etanol e adicionaram-se cerca de 100 mL de ácido fosfórico 85%. Esta solução foi levada ao volume final de 1000 mL com água purificada em um sistema Milli Q[®].

Para elaborar a curva padrão de proteína, realizou-se uma pipetagem seriada da albumina humana.

As concentrações em $\mu\text{g/mL}$ foram de 1, 0,5, 0,250, 0,125, 0,0625 e 0,03125 em solução salina e para o “branco” se utilizou apenas solução salina e o reagente anteriormente preparado.

As densidades ópticas foram obtidas em espectrofotômetro, utilizando um comprimento de onda de 595 nm. Os dados obtidos, utilizando as soluções de albumina, possibilitaram a obtenção de uma função linear: $Y = A x + B$, sendo Y- concentração da proteína, x - absorvância à 595 nm, A – coeficiente angular da reta e B constante inicial da reta. A correlação dos resultados foi alta com r^2 de aproximadamente 1.

3.3 Cálculo das concentrações relativas entre “scavenger” e espécies reativas formadas durante a irradiação

Um Gy é o mesmo que $6,6 \times 10^{15}$ eV; em 2000 Gy tem-se $1,32 \times 10^{19}$ eV, produzindo $3,56 \times 10^{17}$ e^-_{aq} e $4,22 \times 10^{17}$ $\text{OH}^\cdot$.

3.4 Cálculo das concentrações dos “scavengers”

Para os cálculos das concentrações dos “scavengers”, levou-se em consideração que a concentração relativa entre os produtos formados e os “scavengers” é igual a 1, ou seja para cada molécula de radical livre formado 1 molécula de “scavenger” atuando no meio (ANDRIANI, 1995)

Desta feita o cálculo das concentrações foi o seguinte:

2000 Gy

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $3,56 \times 10^{17} e^-_{aq.}$; logo a concentração do “scavenger” para elétron aquoso é de 0,60 μ M.

1 mol – $6,02 \times 10^{23}$ moléculas

X mol – $4,22 \times 10^{17} OH^\cdot$; logo a concentração do “scavenger” para radical hidroxila é de 0,70 μ M.

Para assegurar que, realmente, todas as moléculas de radicais foram combatidas pelos “scavengers” utilizou-se a concentração de 1 μ M para ambos os “scavengers”.

3.5 Irradiação da Amostras:

As amostras de crotamina, previamente purificadas, com concentração de 2mg/mL na presença ou não de “scavenger”, foram irradiadas com a dose de 2000 Gy com taxa de dose de 3,21 kGy/h em uma fonte de ^{60}Co Gammacell 220. Os “scavengers” utilizados foram o t-butanol, como “scavenger” de radical hidroxila e o nitrato de sódio como “scavenger” de elétron aquoso.

3.6 Análise de Dicroísmo Circular

A análise de dicroísmo circular permite investigar as alterações na estrutura secundária das proteínas.

3.6.1 Princípios da análise de dicroísmo circular:

O método do dicroísmo circular (CD) é um método físico, que leva em conta a estereoquímica da molécula (CRABEE, 1972). Pode ser aplicada a qualquer composto opticamente ativo que tenha um cromóforo que, no caso dos peptídeos é a ligação amida. Essa espectroscopia utiliza uma luz circularmente polarizada na ausência de um campo magnético e consiste na diferença de absorção entre a luz polarizada para a direita e para a esquerda no momento da interação desta com a molécula.

Em moléculas pequenas, detecta-se a assimetria do carbono quiral e a possível assimetria causada pela ligação a uma macromolécula ou agregado. No caso das macromoléculas, detecta-se a assimetria causada por suas conformações (RODGER & NORDÉN, 1997). Como resultado, tem-se diferente valor de rotação específica $[\alpha]_D^{25}$ e, para que haja tais diferenças, a molécula deve possuir um centro quiral, ou seja, sua imagem não pode ser sobreposta a ela mesma.

Define-se rotação específica $[\alpha]_D^{25}$ como:

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\text{Rotação medida (graus)}}{\text{caminho óptico (cm) x concentração (g/cm}^3\text{)}}$$

Assim, moléculas dextro-rotatórias são positivas (+) e as levo-rotatórias são negativas (-). O símbolo $[\alpha]_D^{25}$ indica que a medida a ser feita pelo polarímetro é a 25°C e a luz emitida corresponde à linha-D do espectro de sódio (589,3 nm).

No caso de proteínas e peptídeos, os cromóforos responsáveis pelo espectro de CD são: a ligação amídica, os resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina, e as pontes dissulfeto.

A estimativa de quantidade de cada estrutura dentro de um espectro de CD pode ser feita baseado em espectros de peptídeos modelo, ou baseado em espectros de CD de proteínas com estrutura secundária conhecida por difração de raio-X (CHEN *et al.*, 1974). Pode-se trabalhar com referências fixas, que são componentes espectrais puros, extraídos de dados espectrais de CD de proteínas com conformação conhecida por dados de difração de raio-X (CHANG *et al.*, 1978). Ou ainda pelo método de referências variáveis, onde se usa todo um conjunto de espectros de CD de proteínas como referência (HENNESSEY & JOHNSON, 1984).

Os resíduos aromáticos das proteínas, assim como as pontes dissulfeto, absorvem no ultravioleta (UV) próximo, que se estende de 250 a 300 nm e também contribuem para o espectro de CD da região do UV distante.

A intensidade de espectro de CD de uma α -hélice é dependente do número de resíduos da cadeia polipeptídica nela envolvida.

Existe uma forma simples de se calcular o conteúdo helicoidal. Essa equação emprega a elipticidade molar residual a 222 nm ($[\theta]_{222}$) e leva em consideração o tamanho da cadeia polipeptídica,

$$[\theta]_H = \theta_H^\infty (1 - k/n)$$

onde $[\theta]_H^\infty$ é o máximo de elipticidade molar residual para uma hélice de tamanho infinito (geralmente se usa o valor de $-39500 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), n é o número total de resíduos, e k uma constante dependente de λ (2,57 a 222 nm) (CHEN *et al.*, 1974). A fração de α -hélice presente na molécula é então obtida a partir da razão entre $[\theta]_{222}$ e $[\theta]_H$ calculado acima e transformado em porcentagem.

3.6.2 Procedimento para análise de dicroísmo circular

As amostras de crotamina nativa e irradiada na presença ou ausência de substâncias “scavengers” (1mg/mL) foram analisadas por dicroísmo circular.

Para esta análise 200 μL de foram colocados em celas circulares de quartzo, com 0,2 mm, de um espectropolarímetro Jasco J-180 com uma variação de comprimento de onda 260-195nm. As análises de dicroísmo circular foram realizadas no laboratório de Biofísica da UNIFESP.

3.7 Análise de Fluorescência

A análise de fluorescência permitiu a análise estrutural da proteína principalmente por aminoácidos aromáticos.

3.7.1 Princípios da análise de fluorescência

A absorção da radiação eletromagnética de um determinado comprimento de onda por um cromóforo faz com que seus elétrons passem do estado eletrônico fundamental para o excitado. A fluorescência ocorre quando esse elétron retorna ao seu local original, emitindo um fóton.

Os espectros de fluorescência para as proteínas dependem ou envolvem somente três tipos de resíduos de aminoácidos ditos aromáticos, ou seja o triptofano, a tirosina e a fenilalanina. A excitação destes resíduos, por radiação ultravioleta leva-os a estados excitados e quando retornam ao estado fundamental emitem fluorescência, por meio de um processo que é composto por duas etapas: a primeira é via dissipação não radioativa (por exemplo: agitação térmica intramolecular) e a segunda, via decaimento radioativo exponencial do fluoróforo, sendo que a proteína apresenta uma emissão fluorescente intrínseca (CHEN *et al.*, 1969).

O tempo de duração das etapas citadas acima é bem distinto. Assim a primeira etapa ocorre rapidamente, possibilitando uma distinção clara entre a radiação de excitação e emissão, já que as energias envolvidas no processo são diferentes.

A primeira etapa traduz uma transferência de energia não radioativa segundo o mecanismo: processo de colisão com outras moléculas, transições diversas sem emissão, reorientação do fluoróforo ou da molécula como um todo, além de é claro das transferências de calor propriamente ditas.

A segunda etapa (decaimento exponencial) engloba os seguintes aspectos: transferência de energia entre os fluoróforos (dependendo da geometria molecular, separação e orientação das moléculas); supressão (“quenching”) com outras moléculas ou íons (dependendo do acesso do fluoróforo na estrutura molecular); cinética de declínio da emissão fluorescente e grau de despolarização da radiação emitida.

Logo, pelo que acaba de ser descrito, existe a possibilidade de distinguirem-se qualitativamente os fluoróforos intrínsecos, embora não possa ser descartada a transferência de energia entre os fluoróforos (CHEN *et al.*, 1969).

3.7.2 Procedimento para análise de fluorescência

As amostras de crotamina, nativas e irradiadas, na presença ou ausência de “scavengers”, foram submetidas à análise das alterações intrínsecas, num espectrofotômetro de fluorescência F2000 da marca Hitachi®.

Foi utilizado o comprimento de onda de excitação do triptofano que é de 275 nm. A concentração das amostras foi de 5 µg/mL. As leituras foram efetuadas contra um “branco” de Tampão fosfato de amônio 50 mM, pH 7,8. As análises de fluorescência foram realizadas no laboratório de Biofísica da UNIFESP.

3.8 Análise de Aminoácido

A análise de aminoácidos permite verificar as possíveis perdas deles em determinadas situações.

3.8.1 Princípios de Análise de Aminoácido

A composição de aminoácido de uma proteína é determinada pela hidrólise das ligações peptídicas e das cadeias polipeptídicas. Quando determinado quantitativamente, os constituintes dos aminoácidos das proteínas liberados são avaliados.

3 O método mais comumente empregado consiste em hidrolisar a proteína, incubando-a, anaerobicamente, com HCl 6 M com temperatura de 110 ° C por 24 horas. Outros ácidos podem ser usados para realizar a hidrólise.

Após a realização da hidrólise, a identificação e quantificação dos aminoácidos são feita com o auxílio de um analisador de aminoácidos. Estes resíduos são separados cromatograficamente e quantificados quando eluídos por uma coluna, em geral de troca iônica, seguido pela detecção com ninidrina ou reagentes fluorescentes.

3.8.2 Procedimento para análise de aminoácido

As amostras de crotamina (2 mg/mL) nativa e irradiada na presença ou ausência de *scavengers* foram submetidas à análise de aminoácidos, em um analisador da marca Hitachi L-8500. As análises de aminoácido foram realizadas no laboratório de Biofísica da UNIFESP.

3.9 Análise de Microscopia Intravital

A microscopia intravital foi utilizada para demonstrar os efeitos tóxicos da crotamina antes e após a irradiação na presença ou ausência de “scavengers”.

3.9.1 Princípios da Microscopia Intravital

A microscopia intravital vem sendo amplamente utilizada para a caracterização de agentes inflamatórios e para pesquisa de novas drogas antiinflamatórias, onde é possível obter informações dos eventos dinâmicos na microvasculatura *in vivo*.

3 Com esta técnica é possível estudar as interações leucócito-endotélio durante o processo inflamatório, observando os eventos celulares de *rolling*, adesão e migração, bem como estudar as alterações de fluxo sanguíneo, que podem causar vaso constrição e vaso dilatação em uma determinada vênula pós-capilar. Os experimentos podem ser realizados em mesentério ou cremaster de camundongos ou ainda em tecidos musculares de rato (GAVIM & CHATTERJEE, 2004).

As alterações nas vênulas podem ser verificadas por meio de um programa computacional que faz as medições em micrometros. Os dados são acondicionados em um computador para posteriormente serem analisados.

3.9.2 Procedimento para a microscopia intravital

Inicialmente, grupos de 5 camundongos “swiss” foram anestesiados com uma solução de 1:2 (Quetamina: Xilazina) que foi diluída em solução salina 0,9% na proporção de 1:3 sendo que os animais receberam uma injeção subcutânea na região dorsal de 0,1 mL para cada 10 g do peso do animal desta solução.

Posteriormente, o músculo cremaster dos camundongos foi exteriorizado e montado sobre uma placa com temperatura controlada (37°C), dotada de uma área transparente, através da qual o leito microvascular pode ser visualizado (BAEZ *et al*, 1973; ZYCHAR, *et al.*, 2008). A preparação foi analisada em um 3microscópio (Zeiss Axioskop) com uma objetiva 10x e acoplado a uma câmera para captação de imagens (JVC TK-C600). As imagens foram transmitidas a um aparelho de televisão e a um computador provido de um programa de

análise de imagens (KONTRON, KS 300). A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução tampão de Ringer-Locke a 37°C.

Dez minutos após a exposição da microcirculação a crotamina, nativa ou irradiada (1µg/10µL), na presença ou ausência de substâncias “scavengers”, as amostras foram aplicadas por gotejamento diretamente no músculo cremaster e as medidas dos diâmetros das vênulas, foram realizadas. Este procedimento se repetiu por três vezes, com tempos de 5, 10 e 15 minutos após a aplicação da crotamina.

3.10 Análise Estatística

Os resultados da microscopia intravital foram expressos como média das diferenças entre os diâmetros dos vasos (micrometro) antes e após a aplicação das amostras, $\pm$ erro padrão da média e analisada estatisticamente pelo ANOVA, seguido pelo teste Tukey. As análises estatísticas foram determinadas com o programa ESTATISTICA e plotadas no programa Excel.

Foram consideradas significantes diferenças com $p < 0,05$.

3.11 Análises de Ressonância Nuclear Magnética

Para verificar as eventuais alterações na estrutura tridimensional da crotamina, foram realizadas análises de ressonância nuclear magnética da toxina nativa, irradiada e irradiada na presença de “scavengers”.

3.11.1 Princípios da ressonância nuclear magnética

A RMN tem sido um poderoso auxiliar para o estudo das estruturas de moléculas complexas, como polímeros e proteínas. Fenômenos de ressonância ocorrem em vários sistemas físicos sempre que um sistema apresentar frequências naturais de vibração, ele pode ser excitado pela ação de um agente externo que esteja em ressonâncias com aquelas vibrações naturais.

O sinal da RMN surge a partir do centro do átomo, ou núcleo. Embora as propriedades químicas de um átomo dependam da estrutura de seus elétrons, as propriedades físicas dependem largamente do seu núcleo, que é responsável por quase a totalidade da massa do átomo. Embora prótons nucleares e elétrons orbitais possuam cargas opostas e de mesma intensidade, a fim de manter neutralidade elétrica do átomo, o número de prótons e nêutrons é freqüentemente desigual.

O hidrogênio é o mais simples, pois ele possui apenas um próton. Ele é o mais importante átomo para a RMN, sobretudo pela sua abundância nos sistemas biológicos, o hidrogênio é altamente magnético, o que o torna extremamente sensível a RMN. Outros núcleos também podem gerar imagens em RM, mas, porém possuem imagens mais pobres comparadas às do Hidrogênio (WÜTHRICH, 2002).

3.11.2 Procedimento para análise de ressonância nuclear magnética

As amostras de crotamina nativa, irradiada e irradiada na presença de substâncias “scavengers”, foram submetidas à análise de RMN. As amostras com concentração de 4 mM, na presença de Deutério, foram colocadas num espectrômetro da marca Varian INOVA-600AS.

4. RESULTADOS

A seguir serão apresentados os resultados da cromatografia do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, repurificação da crotamina, análise de dicroísmo circular, análise de fluorescência, análise de aminoácidos, microscopia intravital. Todos esses experimentos foram realizada com a crotamina nativa e irradiada na presença ou ausência de substâncias “scavengers”.

A análise de ressonância nuclear magnética foi realizada com a crotamina nativa, irradiada e irradiada na presença ou ausência de substâncias “scavengers”.

Cabe ressaltar que para todas as análises foram realizados controles negativos utilizando apenas as substâncias “scavengers”, de modo a garantir que as alterações apresentadas não eram efeitos de tais substâncias.

A 3FIGURA 4 apresenta o perfil cromatográfico para o isolamento da toxina de interesse a partir do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. O pico1 representa a convulxina, o pico 2 a delta-toxina, o pico 3 a giroxina, o pico 4 a crotoxina e o pico 5 representa a crotamina, que foi usada como modelo experimental nesta trabalho.

FIGURA 4. Cromatograma do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* em coluna de exclusão molecular Superdex 75. O tampão para eluição dos picos foi o formiato de amônio 50 mM, pH – 3,0.

Na FIGURA 5 está apresentado o perfil da repurificação da crotamina (pico 5 FIGURA 4) em coluna do tipo Resource S, com gradiente linear de NaCl variando entre 0 e 2 M de NaCl. Este procedimento permitiu a eliminar contaminantes da crotamina.

FIGURA 5. Recromatografia de crotamina em resina de troca iônica do tipo Resource S. Os tampões para a eluição dos picos foi o fosfato de sódio 25 mM pH 7,8 e o mesmo tampão na presença de 2 M de NaCl.

Na FIGURA 6 está apresentado o resultado da análise de dicroísmo circular da crotamina nativa e irradiada na presença ou ausência de substâncias “scavengers”. É possível verificar as alterações sofridas na estrutura secundária em todas as amostras, em praticamente todas as regiões do espectro, quando comparadas com a nativa e um dano mais pronunciado nas amostras e irradiadas sem “scavengers” e na presença de t butanol.

FIGURA 6. Análise de dicroísmo circular da crotamina nativa e irradiada, na presença ou ausência de substâncias “scavengers”. Análise foi feita com 200µL de cada amostra, onde a concentração era de 1mg/mL.

Na FIGURA 7 estão apresentados os resultados das medidas dos diâmetros das vênulas pós-capilares dos camundongos antes e após a aplicação da crotamina nativa e irradiada. Observa-se que a crotamina nativa causou vaso contração. Este fenômeno é invertido quando a amostra aplicada foi a crotamina irradiada, causando vaso dilatação. Também é possível verificar que conforme o tempo de exposição da crotamina na vênula aumentou, a vaso contração também aumentou. No caso das irradiadas há aumento da vasodilatação tempo dependente. Cabe salientar que as diferenças dos vasos foi calculada, sempre, fazendo a diferença entre o diâmetro inicial e o final.

FIGURA 7. Variação de diâmetro das vênulas antes e após receberem crotamina nativa e irradiada na presença ou ausência de substâncias “scavengers”. As concentrações das amostras foram de $1\mu\text{g}/10\mu\text{L}$, aplicadas diretamente no tecido.

Na FIGURA 8 estão apresentados os resultados da análise de fluorescência da crotamina nativa e irradiada na presença ou ausência de “scavengers”. Pode-se observar que o pico na região de 350 nm, onde se localiza o triptofano, diminui sua intensidade na seguinte ordem: nativa com t-butanol, irradiada, nativa na presença de nitrato de sódio, irradiada na presença de nitrato de sódio e irradiada na presença de t-butanol. Este comportamento sugere que já com os “scavengers”, a estrutura terciária é afetada. Quando as amostras são irradiadas com “scavengers” este efeito foi potencializado. Cabe ressaltar que na região de 280 nm aparece o pico do Raman da água.

FIGURA 8. Análise de fluorescência da crotamina nativa e irradiada na presença ou ausência de *scavengers*. Utilizou-se 1mL de cada amostra na concentração de 5 µg/mL.

Na FIGURA 9 está apresentado o espectro da análise de ressonância nuclear magnética da crotamina nativa. A figura mostra que a crotamina na forma nativa apresenta um espectro com picos que possibilitam a determinação da estrutura tridimensional da molécula (entre 9,5 e 7 ppm).

FIGURA 9 Análise de RMN da crotamina nativa. O volume das amostras foi de 1 mL com concentração de 4 mM, pH 4,8.

Na FIGURA 10, está apresentado o espectro de ressonância nuclear magnética da crotamina irradiada na ausência de “scavengers”. É possível observar que na região que determina a possibilidade de obtenção das estruturas tridimensionais, os picos se apresentam largos e com baixa resolução, impossibilitando, portanto, a obtenção de tais estruturas.

FIGURA 10 Análise de RMN da crotamina irradiada na ausência de substância “scavengers”.
O volume das amostras foi de 1 mL com concentração de 4 mM, pH 4,8.

Na FIGURA 11, está apresentado o espectro de ressonância nuclear magnética da crotamina irradiada com NaNO_3 . Verifica-se que, na região que determina a possibilidade de obtenção das estruturas tridimensionais, os picos se apresentam sobrepostos e com baixa resolução, impossibilitando, portanto, a obtenção de tais estruturas.

FIGURA 11 Análise de RMN da crotamina irradiada com NaNO_3 . O volume das amostras foi de 1 mL com concentração de 4 mM, pH 4,8.

Na FIGURA 12, está apresentado o espectro de ressonância nuclear magnética da crotamina irradiada com t-butanol. Verifica-se que, na região que determina a possibilidade de obtenção das estruturas tridimensionais, os picos se apresentam largos, sobrepostos e com baixa resolução, impossibilitando, portanto, a obtenção de tais estruturas.

FIGURA 12 Análise de RMN da crotamina irradiada com t-butanol. O volume das amostras foi de 1 mL com concentração de 4 mM, pH 4,8.

Na FIGURA 13 estão apresentados os resultados da análise de aminoácido da crotamina nativa e irradiada, na presença ou ausência de *scavengers*. Nota-se que a crotamina irradiada mantém seus aminoácidos sem alterações significativas com exceção do triptofano que é alterado no caso da crotamina irradiada.

FIGURA 13 Análise de aminoácidos da crotamina nativa e irradiada, na presença ou ausência de *scavengers*. O volume utilizado das amostras, foi de 1 mL e a hidrólise realizada com 6 M de HCl.

5. DISCUSSÃO

A irradiação de proteínas, em solução aquosa, tem sido estudada por causar mudanças químicas, 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 (GROSCH & HOOPYWOOD, 1979).

Para realizar o estudo da ação dos produtos de radiólise da água em proteínas, foi escolhida a crotamina, toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, em função das suas favoráveis propriedades estruturais associadas ao simples método de fracionamento e purificação.

Diversos trabalhos foram realizados com a crotamina, levando em consideração diferentes ações biológicas (RIZZI *et al.*, 2007), algumas propriedades farmacêuticas (NASCIMENTO *et al.* 2007; HAYASHI *et al.*, 2008) e, no caso deste trabalho, esta toxina foi utilizada como ferramenta para avaliação de danos causados pela radiação ionizante na estrutura da proteína e conseqüentes alterações biológicas (CASARE *et al.* 2006; MITAKE *et al.*, 2001).

Existem diferentes métodos para obtenção de crotamina como o utilizado por MANCIN *et al.* (1998) que utilizaram uma etapa de centrifugação com alta rotação para separar as frações de alta massa molecular e posteriormente a passagem por uma coluna de exclusão molecular.

MITAKE (2000) desenvolveu um método de purificação simples para a crotamina, efetuando apenas dois passos cromatográficos. O primeiro passo foi feito pela eluição do o veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, por uma coluna de exclusão molecular do tipo Sephadex G-10, posteriormente utilizou uma coluna de troca iônica do tipo RESOURCE S.

O método utilizado neste trabalho para o isolamento da crotamina foi baseado no protocolo descrito por MITAKE *et al.* (2001), contudo a separação das frações do veneno total de *Crotalus durissus terrificus* foi feita por meio da cromatografia de exclusão molecular em gel Superdex 75 (FIGURA 4). Este fracionamento baseia-se no tamanho das moléculas dos componentes, onde as moléculas maiores saem primeiras, já que esse gel é composto por micro esferas.

Essas esferas contêm porosidades, as quais permitem apenas a passagem de moléculas pequenas, com isso essas moléculas levam um tempo maior para sair. Esta pré-separação gerou cinco picos onde o primeiro refere-se à convulxina, o segundo, a uma toxina hemoconcentrante, o terceiro, à giroxina, o quarto, à crotoxina e o quinto, à crotamina, o que corrobora os achados de CLISSA, (1997).

Realizou-se então uma segunda etapa de purificação para obtenção da crotamina com alto grau de homogeneidade. Para tal, utilizou-se uma resina de troca iônica do tipo RESOURCE S, promovendo a separação das frações em função das suas cargas.

Neste caso a superfície da resina retém a fração de interesse, que é liberada apenas com a passagem de uma solução que possua íons, com eletronegatividade (aniônica) ou eletropositividade (catiônica), mais potente do que aquela amostra retida na resina.

A FIGURA 5, que apresenta a troca iônica da crotamina, apresenta a efetividade da utilização desta coluna como já mencionado pelo trabalho de (MITAKE, 2000) que também observou a existência de apenas um pico majoritário, no decorrer da passagem do gradiente salino.

Muitos autores destacam a ação da radiação em toxinas. SOUZA-FILHO (1988) demonstrou as primeiras alterações nas propriedades biológicas de toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*. A partir daí buscou-se elucidar as alterações causadas pela radiação ionizante.

Deste modo muitos autores desenvolveram trabalhos para buscar tais explicações. NASCIMENTO (1995) demonstrou a eficácia da radiação ionizante na destoxicação do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*. NASCIMENTO *et al.* (1996) avaliaram a influência da radiação ionizante na crotoxina e verificaram que esta toxina, quando irradiada com a dose de 2 kGy, tinha a sua toxicidade diminuída e sua imunogenecidade melhorada.

Fato também observado por ROGERO *et al.* (1999) que trataram o veneno total de *Crotalus durissus terrificus* com diferentes doses de radiação.

ANDRIANI (1995) verificou a influência das principais espécies reativas, oriundas do processo de irradiação em solução, sobre a crotoxina e relatou que o elétron aquoso seria um possível causador de danos à estrutura da molécula, enquanto que o radical hidroxila estaria envolvido com a perda da atividade enzimática desta molécula.

Para um melhor entendimento das atividades individuais destes produtos de radiólise da água, foram usadas substâncias “scavengers”, que atuam como seqüestradores específicos para cada um destes produtos, evitando que ele se ligue à toxina.

Trabalhou-se com métodos de avaliação estrutural para determinar a influência das espécies reativas geradas na irradiação de crotamina com 2 kGy.

A análise de dicroísmo circular foi feita para avaliar a composição da estrutura secundária de polipeptídeos, da crotamina nativa e irradiada na

presença ou ausência de substâncias “scavengers”. Esta análise demonstrou que a crotamina nativa na presença do “scavenger” t-butanol, que age sobre o radical hidroxila, apresentou alterações discretas em todas as regiões do espectro, quando comparada à crotamina nativa. O mesmo fato foi observado para o caso da crotamina nativa na presença do “scavenger” nitrato de sódio, sugerindo que a presença destes dois “scavengers” não interferem na estrutura secundária da crotamina.

A crotamina irradiada sem “scavenger” demonstrou total destruição da estrutura secundária quando comparada a crotamina nativa. Fato semelhante foi observado por MITAKE (2000) que analisou a crotamina irradiada com 2 kGy. SURUGA *et al.* (2003) irradiou citocromo c, uma proteína do sangue, com diversas doses e verificou a destruição das estruturas secundárias com doses a partir de 2 kGy. CHAPELIER *et al.* (2001) ao irradiar a alfa-lactalbumina com diversas doses verificaram que a estrutura secundária também é muito afetada pela ação da radiação.

No caso da crotamina irradiada com t-butanol a estrutura secundária mostrou-se muito afetada pela radiação. Este fato sugere que o elétron aquoso está diretamente envolvido na alteração da estrutura secundária da molécula, uma vez que, a amostra com t-butanol seqüestra os radicais hidroxilas do meio, deixando apenas os elétrons aquosos agirem. Por outro lado, a crotamina na presença de nitrato de sódio, que seqüestra os elétrons aquosos e deixa os radicais hidroxilas no meio, demonstrou pouca interferência na estrutura secundária, mantendo um perfil semelhante ao da crotamina nativa.

ANDRIANI (1995) verificou a atuação de “scavengers” como o t-butanol e o nitrato de sódio na estrutura da crotoxina e observou que o elétron aquoso estaria envolvido nas alterações estruturais causadas nesta toxina quando irradiadas.

CASARE (2003) aventou a possibilidade dos elétrons aquosos estarem envolvidos com as alterações na estrutura da crotamina.

A atividade tóxica da crotamina, como já mencionada neste trabalho, caracteriza-se pela contração dos músculos esqueléticos, levando à paralisia das patas posteriores de camundongos.

Face a este fato, a avaliação do potencial miotóxico da crotamina, foi realizado por microscopia intravital, que permite observar alterações dos diâmetros das vênulas pós capilares do músculo cremaster de camundongo.

Esta análise demonstrou que a toxina na sua forma nativa sem “scavengers” ocasiona uma importante contração das vênulas pós capilares, com diferença significativa, que são tempo e concentração dependentes, ou seja, quanto maior o tempo de exposição do tecido e quanto maior a concentração da toxina maior a contração.

A crotamina nativa na presença de ambos os “scavengers” também apresentou contração das vênulas pós capilares, tempo e concentração dependentes. Este fato sugere que as substâncias “scavengers” nitrato de sódio e t-butanol não interferem na molécula de forma a causar alterações na sua toxicidade. Corroborando o achado da análise de dicroísmo circular que também não apresentou diferenças quando a crotamina estava na presença exclusivamente dos “scavengers”.

No caso da crotamina irradiada sem “scavengers” e avaliada por microscopia intravital, observou-se que além de não promover contração, ocorreu

ainda um aumento do diâmetro dessas vênulas, o que permite aventar a total perda de atividade tóxica.

Para a toxina irradiada na presença de t-butanol (“scavenger” de radical hidroxila), verifica-se perda da atividade vascular, sendo observada vasodilatação. Neste caso os elétrons aquosos permanecem na solução levando à maior degradação da estrutura da molécula, abolindo o efeito tóxico. Este fato sugere que o elétron aquoso esteja envolvido na degradação da estrutura da toxina, levando à perda da atividade vascular da crotamina.

Avaliando-se a crotamina irradiada na presença de NaNO_3 observa-se que os elétrons aquosos foram removidos do meio, promovendo menor degradação da estrutura da molécula, causando, conseqüentemente, apenas a diminuição do efeito tóxico.

Alguns trabalhos relatam a ação dilatadora de algumas substâncias, verificada por microscopia intravital (ZHU *et al.* 1997, QAMIRANI *et al.* 2006). Adicionalmente, são relatadas ações de venenos e toxinas em vênulas pós capilares de camundongos. LOMONTE *et al.* (1994) verificaram a ação da miotoxina II por microscopia intravital e constataram que esta toxina causa uma importante contração das vênulas pós capilares de camundongos, quando aplicadas por gotejamento direto no tecido. Esses achados corroboram os estudos deste trabalho, porém não há relatos da utilização dos venenos ou toxinas irradiadas utilizando esta técnica.

Na análise de fluorescência (FIGURA 8), observa-se na região do espectro de em 280 nm, picos que representam o “Raman” da água. Esta análise também demonstra que a crotamina irradiada diminui consideravelmente o sinal na região de 350 nm, quando comparada com a crotamina nativa, sugerindo a destruição

de estrutura terciária da molécula, que gera uma maior exposição dos fluoróforos ao solvente, causando a diminuição do sinal observado. Esta degradação da estrutura terciária verificada pelo decréscimo na região do triptofano foi posteriormente confirmada pela análise de aminoácido que demonstra a diminuição na quantidade de triptofanos, principalmente na amostra irradiada.

Esses dados corroboram os dados de MOON & SONG (2001), que analisaram o comportamento da ovalbumina e ovomucoide irradiada e também observaram um decréscimo do importante da fluorescência.

Quando a crotamina foi irradiada na presença do “scavenger” t-butanol houve uma maior exposição dos fluoróforos. Por outro lado, na presença do “scavenger” nitrato de sódio, foi observado, que há uma menor exposição dos fluoróforos e, conseqüentemente menor perda da estrutura terciária.

Na FIGURA 9 está apresentada a análise de ressonância magnética nuclear (RMN) da crotamina nativa. Esta análise permite verificar se houve mudanças na conformação geral da molécula e se é possível a determinação da estrutura tridimensional da molécula. Esta possibilidade pode ser verificada pela análise do sinal do espectro na região entre 9.5 e 7 ppm. Esta região é onde aparecem os sinais dos Hidrogênios ligados a Nitrogênios (H-N).

Quando o espectro demonstra essa região bem definida, deve ser possível verificar um pico para cada H-N da cadeia principal da proteína. Quando a proteína está enovelada, cada H-N está num ambiente químico ligeiramente diferente, e as frequências de ressonância são, portanto, diferentes ocorrendo uma dispersão dos sinais nessa faixa (WÜTHRICH, 2002).

Na FIGURA 10, 11 e 12 estão apresentadas as análises de ressonância magnética nuclear da crotamina irradiada sem “scavengers”, crotamina irradiada

com nitrato de sódio e crotamina irradiada com t-butanol, respectivamente. Estas análises demonstram que, entre 9,5 e 7 ppm, os picos encontram-se alargados (FIGURA 10, 11 e 12) e sobrepostos (FIGURA 11 e 12), características que ocorrem quando não é possível chegar a estruturas tridimensionais concordantes. Isto significa que é possível determinar inúmeras estruturas randomicamente, porém não se consegue chegar a uma possível.

Quando isso ocorre, todos os H-N ficam expostos ao solvente de maneira parecida e os sinais aparecem todos com o mesmo valor de frequência de H, cerca de 8,5 ppm. Desta forma, em uma análise qualitativa da amostra, caso não exista uma boa dispersão de sinais nessa região, é possível verificar que essa molécula não possui uma estrutura fixa (WÜTHRICH, 2002).

Muitos trabalhos reportam o uso da ressonância magnética nuclear para caracterizar proteínas diversas (SOGAMI *et al.*, 1997, ERA, *et al.* 1991). Porém a literatura que reporta o uso deste método para verificar alterações em proteínas irradiadas é extremamente escassa.

As amostras de crotamina nativa e irradiada na presença ou ausência de “scavengers” passaram por análise de aminoácidos. A FIGURA 13 demonstra que não há diferenças na composição dos aminoácidos em todas as amostras com exceção ao triptofano.

Neste caso ocorre diminuição dos picos em todas as amostras, principalmente para a crotamina irradiada sem “scavengers”, isso pode ser inferido à susceptibilidade à ação da radiação apresentada pelos aminoácidos aromáticos (BUTLER *et al.* 1984). Dados semelhantes foram obtidos por SURUGA *et al.* (2003) que verificaram a degradação de aminoácidos do

citocromo c quando irradiado com várias doses. Eles evidenciaram que o triptofano sofre uma brusca queda quando irradiado com 2 kGy.

Estes dados são concordantes com os de MITAKE *et al.* (2001) que analisaram a seqüência de aminoácidos da crotamina irradiada com 2 kGy e não observaram alterações significativas. Alguns autores (XU, *et al.* 2003, MALEKNIA *et al.* 1999) relatam que determinados aminoácidos sofrem oxidação podendo agregar massa e alterar sua estrutura que seria compatível com outros aminoácido, quando submetidos à radiação ionizante de fonte de cobalto ou de raios x. Entretanto estes dados não corroboram os achados neste estudo, onde foi observada a diminuição dos triptofanos, porém sem aumento significativo de quaisquer outros aminoácidos.

Verificando os dados obtidos neste trabalho é possível observar que a crotamina quando irradiada apresenta modificações na estruturas mais externas (secundárias e terciárias), esses dados são concordantes com os trabalhos de MITAKE *et al.* (2001), que analisaram a crotamina nativa e irradiada com 2 kGy e demonstraram que tanto as estruturas secundárias como as terciárias são afetadas pela radiação. CASARE (2003) demonstrou que a crotamina irradiada sofre alterações nas estruturas terciárias verificada por absorção ultravioleta. E ANDRIANI (1995) que demonstrou a participação dos produtos de radiólise nas alterações biológicas da crotoxina, verificando que o elétron aquoso poderia estar envolvido na perda de atividade tóxica e o radical hidroxila poderia estar envolvido na questão imunológica.

Também foi possível verificar pelas análises estruturais (dicroísmo circular, análise de fluorescência, ressonância nuclear magnética e análise de

aminoácidos) que o elétron aquoso está diretamente relacionado com alterações conformacionais e conseqüentemente com a perda da toxicidade da molécula.

Este dado foi confirmado quando a crotamina irradiada na presença de t-butanol foi avaliada por microscopia intravital demonstrando que a atividade tóxica foi totalmente eliminada.

Estes dados são concordantes com diversos trabalhos que avaliaram a perda de toxicidade e melhora de imunogenicidade de toxinas diversas quando irradiada, como o de NASCIMENTO (1995) demonstrou que a crotoxina quando irradiada com 2 kGy tem a sua toxicidade significativamente diminuída e também teve a sua propriedade imunogênica melhorada.

CARDI *et al.* (1999) verificaram que a crotoxina quando irradiada era melhor reconhecida pelos sistema imunológico de camundongos quando comparada com a crotoxina nativa. Os autores demonstraram que este fato pode ser explicado pelo fato da crotoxina irradiada ser oxidada pela radiação e desta forma o reconhecimento do sistema imune é facilitado.

BAPTISTA (2004) analisou os aspectos bioquímicos da bothropstoxina 1 irradiada com 2 kGy e demonstrou que esta toxina quando irradiada sofre perda de toxidade por degradação das suas estruturas e também demonstrou a melhora da imunogenicidade da toxina irradiada e que o tipo de resposta imune é preferencialmente do tipo Th-2.

Assim, as análises biológicas e estruturais realizadas demonstram que a radiação pode alterar as propriedades da crotamina e que a ação dos produtos da radiólise da água pode ser avaliada individualmente, o que possibilitará inúmeras aplicações na busca de novos imunógenos.

6. CONCLUSÕES

- O protocolo empregado para o isolamento das frações permitiu a completa purificação das toxinas.
- O triptofano, da estrutura primária da crotamina, foi o único aminoácido afetado pela radiação.
- As estruturas primárias e secundárias da crotamina nativa não foram alteradas pela presença dos “scavengers”.
- As estruturas secundárias e terciárias foram modificadas quando a crotamina foi irradiada com 2 kGy.
- O elétron aquoso participa, diretamente, das alterações na estrutura secundária e terciária, quando a crotamina foi irradiada com 2 kGy.
- O radical hidroxila teve pouca interferência na estrutura secundária, porém alterou a estrutura terciária da crotamina irradiada com 2 kGy.
- O potencial mitotóxico foi abolido quando a crotamina foi irradiada com 2 kGy.
- O elétron aquoso é o principal responsável pela abolição e inversão da atividade tóxica da crotamina.
- O radical hidroxila tem participação na abolição do potencial mitotóxico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. E. ALDRICH, J.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L. & WILLSON,R.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: reactions of inorganic radical anion with amino acids. **Radiat. Res.**, 49: 178-189, 1972a.
- ADAMS, G.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH,J.L. & WILLSON,R.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: the inactivation of ribonuclease **Radiat. Res.**, 49: 290-299, 1972b.
- ADAMS, G.E.; & POSENER, M.L. Free radical reaction with proteins and enzymes: the inactivation of pepsin. **Int. J. Radiat. Biol.**, 35(6): 497-507, 1979.
- ALEXANDRE, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J.; Giroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, 26: 953 – 960, 1988.
- 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.
- BAEZ, S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. **Microvasc. Res.** 5:, 384-394, 1973.
- BAPTISTA, J.A. **Aspectos da resposta imune frente a antígenos protéicos irradiados com co-60.** (Dissertação – Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2004.

- BELTRAN, J. R.; MASCARENHAS, Y. P.; CRAIEVICH, A. F.; LAURE, C. J. SAXS study of the snake venom toxin α -crotoamine, **Eur. Biophys. J.** 17:, 325 – 329, 1990.
- BELTRAN, J. R.; MASCARENHAS, Y. P. SAXS study of structure and conformation changes of crotoamine. **Biophys. J.** 47, 33: – 35, 1985.
- BRADFORD, M.M – A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248 - 254, 1976.
- BILLANY, M. R.; KHATIB, K.; GORDON, M.; SUGDEN, J.K. Alcohols and ethanolamines as hydroxyl radical scavengers. **Int. J. Pharm.** 137: 143 - 147, 1996.
- BUTLER, J.; LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high-energy radiation on biological system. **Rad. Phys. Chem.**, 24: 273-282, 1984.
- CASARE, M.S. **Influência das principais espécies reativas formadas durante o processo de destoxicação de toxinas por radiação ionizante.** (Dissertação de Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2003.
- CASARE, M.S., SPENCER, P.J.; CAMPOS, L.A., NASCIMENTO, N. Study of gamma-radiation effects on crotoamine and crotoxin. **J. Radioanal. Nuc. Chem.** 269 (3): 571-577, 2006.
- CARDI, B. A. ; NASCIMENTO, N. ; ROGERO, J. R. ; ANDRADE, H. F. . Immunochemical Detection Of Purified Crotoxin From *Crotalus Durissus Terrificus* Venom In The Motor End Plate Of Striated Muscle In Cba/J Mice.. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 25:. 905-908, 1992.

- CHANG, C. C. & TSENG, K. H. Effects of crotonamine, a toxic of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **B. J. Pharmacol.**, 63: 551 – 559, 1978.
- CHAPELIER, A.; DESMADRIL, M.; HOUÉE-LEVIN C. Gamma radiation effects on γ -lactalbumin: structural modifications. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 79: 154–157, 2001.
- CHEN, R. F.; EDELHOCH, H.; STEINER, R. F. Physical principles and techniques of protein chemistry, Part A, Ed. **S. J. Leach, Academic Press**, N.Y. 1969.
- CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotonálico irradiado e estudo de suas propriedades imunológicas.** (Dissertação de Mestrado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1997.
- CZAPSKI, G. On the use of OH $\cdot$ Scavengers in Biological System. **Israel J. Chem.**, 24: 29 – 32, 1984.
- ERA S, KUWATA K, SOGAMI M, KATO K, WATARI H. Circular dichroic and ^1H -NMR studies on the aged form of bovine plasma albumin. **Int. J. Pept. Protein Res.** 38 (3): 260 - 266, 1991.
- ENDO, T.; OYA, M.; OZAWA, H. *et. al.* A proton nuclear magnetic resonance study on the solution structure of crotonamine. **J. Protein. Chem.**, 8: 807-815, 1989.
- FADEL, V.; BETTENDORFF, P.; HERMANN, T.; AZEVEDO JR., W. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T.; WÜTHRICH, K. Automated NMR structure determination of the myotoxin crotonamine from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon** 49: 759 – 767, 2005.
- FERREIRA JR; NASCIMENTO, N. COUTO, R. ALVES, J. B. MEIRA, B. A. BARRAVIEIRA B. Laboratory evaluation of young ovines inoculated with

- natural or ^{60}Co -irradiated *Crotalus durissus terrificus* venom during hyperimmunization process. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** 12: (4), 620-631, 2006.
- FLOYD, R. A.; WEST, M.; HENSLEY, K. Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species. **Experimental Gerontology.**, 36: 619-640, 2001.
- FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Archs. Biochem.**, 60: 64 – 73, 1956.
- GUARNIERI, M.C. **Estudos dos efeitos da radiação gama de ^{60}Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararaca*.** (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1992.
- GROSH, D. S. & HOOPYWOOD, L. E. **Biological effects of radiation.** 2 ed. New York, Academics Press, 1979.
- HAMPE, O. G.; VOZARI-HAMPE, M. M.; GONÇALVES, J.M. Crotoxin conformation: Effects of pH and Temperature. **Toxicon**, 16: 453 - 460, 1977a.
- HAMPE, O. G. Model studies of crotoxin self-association. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 22: 17 - 24, 1990.
- HAMPE, O. G. & GONÇALVES, J.M. Optical rotatory dispersion of crotoxin: EFFECTS DENATURANTS. **POLYMERS**, 17: 638 - 639, 1977B.

- HAYASHI MA, NASCIMENTO FD, KERKIS A, OLIVEIRA V, OLIVEIRA EB, PEREIRA A, RÁDIS-BAPTISTA G, NADER HB, YAMANE T, KERKIS I, TERSARIOL IL. Cytotoxic effects of crostamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, 52: (3) 508 – 517, 2008
- JORGE, M. T.& RIBEIRO, L. A. Acidentes por serpentes peçonhentas no Brasil. **Rev. Ass. Med. Bras.** 36: 66-77, 1990.
- KUME, T.& MATSUDA, T. Changes in structure and antigenic proprieties of proteins by radiation. **Rad. Phys. Chem.** 46 (2): 225 – 231, 1995.
- LAURE, C. J. Die Primar strutur des crostamins. **Hope Seylers z. Physiol. Chem.**, 356: 213 – 215, 1975.
- LOMONTE, B., LUNDGREN, J., JOHANSSON, B., BAGGE, U. The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopy study. **Toxicon**. 32: 41-55, 1994.
- MALEKNIA S, BRENOWITZ, M., CHANCE, M.R. Millisecond radiolytic modification of peptides by synchrotron x-rays identified by mass spectrometry. , **Anal. Chem.**, 71: 3965-3973, 1999.
- MANCIN, A.C.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO S. H.; FAÇA, V. M.; GREENE, L.J.; ZUCCOLOTTO, S.; PELÁ, I. R.; GIGLIO, J. R. The analgesic activity of crostamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus*, (South American Rattlesnaki) venom: A biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, 36, (12): 1927 – 1937, 1998.
- MATAVEL, A. C. S.; FERREIRA-ALVES, D. L.;BEIRÃO, P. S. L. Tension generation and increase in voltage-activated Na⁺ current by crostamine. **Europ., J. Pharmacol.**, 348: 167-173, 1998.

- MEYER, J. Venomous Snakes. In: STOCKER, K. F. **Medical Use of Snake Venom Proteins**. Boca Raton, Boston, 57-65, 1990.
- MILLIGAN, J. R.; AGUILERA, J. A.; WARD, J. F. Variation of single strand break yield with scavenger concentration for the SV 40 minichromosome irradiated in aqueous solutions. **Radiat. Res.** 133(2): 158-162, 1993.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE Estatística anual de casos de intoxicação e envenenamento
(<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinan/animaisp/bases/animaisbr.def>) – ACESSADO EM 08/01/09
- MITAKE, M. B.; COSTA, H.; SPENCER, P. J.; VASSILIEFF, V. S.; ROGERO, J. R. Effects of ^{60}Co gamma radiation on crotoxin. **Brazil. J. Med. Biol. Research.** 34: 1531 – 1538, 2001.
- MITAKE, M. B. **Estudos bioquímicos e farmacológicos das crotoxinas nativa e irradiada com radiação gama ^{60}Co** . (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2000.
- MOON, S. & SONG, K. B. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of ovalbumin and ovomucin and protection by ascorbic acid. **Food Chemistry.** 74: 479 – 483, 2001.
- NASCIMENTO FD, HAYASHI MA, KERKIS A, OLIVEIRA V, OLIVEIRA EB, RÁDIS-BAPTISTA G, NADER HB, YAMANE T, TERSARIOL IL, KERKIS I. Crotoxin mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem.** 282, (29): 21349-21360, 2007
- NASCIMENTO, N. **Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação de crotoxinina**. (Tese – Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1995.

- NASCIMENTO, N. ; SEEBART, C. S. ; FRANCIS, B. ; ROGERO, J. R. ; KAISER, I. I. . Influence Of Ionizing Radiation On Crotoxin: Biochemical And Immunological Aspects. **Toxicon**, 34, (1): 123-131, 1996.
- PURANANANDA, C. Studies on effects of radiations on snake venoms with special aspects on their sterilization. **Vienna, IAEA**, 1972.
- QAMIRANI, E., RAZAVI, H. M., WU, X., DAVIS M. J., KUO, L., HEIN, T.W. Sodium azide dilates coronary arterioles via activation of inward rectifier K₊ channels and Na₊-K₊-ATPase. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 290: 1627-1623, 2006.
- ROGERO, J. R. ; SPENCER, J. P. ; NASCIMENTO, N. ; GUARNIERI, M. C. ; ANDRADE, H. F. . EFFECTS OF GAMMA RADIATION ON SNAKES VENOMS. **Radiat. Phys. Chem.**, Estados Unidos, 52: 665-669, 1998.
- ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos. **Doenças infecciosas e parasitárias, E. Guanabara- Koogan**. Rio de Janeiro, 1991.
- RIZZI CT, CARVALHO-DE-SOUZA JL, SCHIAVON E, CASSOLA AC, WANKE E, TRONCONE LR. Crotonamine inhibits preferentially fast-twitching muscles but is inactive on sodium channels. **Toxicon** 50, (4) : 553 – 562, 2007.
- SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotonamine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science**, 129: 1361 – 1363, 1959a.
- SCHUESSLER, H.; SCHILLING, K. Oxygen effects in the radiolysis of protein II. Bovine serum albumine. **Int. J. Radiat. Biol.** 45, (3) 267 – 281, 1984.

- SOGAMI M, ERA S, KOSEKI T, NAGAI N. Structural characterization of the molten globule and native states of ovalbumin: a ^1H NMR study. **J. Pept. Res.** 50 (6): 465 - 474, 1997.
- SOUZA FILHO, J. N. ; ROGERO, J. R. . Efeitos da Radiação Gama Em Toxina Isolada do Veneno de *Crotalus Durissus Terrificus*. **PUBLICACAO IPEN**, 157, 1988.
- SPENCER, P. J. **Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* irradiado com ^{60}Co** : (Dissertação – Mestrado) Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares. São Paulo, 1995.
- SURUGA, K.; NAGASAWA, N.; YAMADA, S. SATOH, T. KAWACHI, R. NISHIO, T.; KUME, T.; OKU, T. Radiation-induced enhancement of nitric reducing activity of cytochrome c. **J. Agric. Food Chem.** 51: 6835 – 6843, 2003.
- TENO A. M. VIEIRA, C. A. SANTORO, M. M. Interchain disulfide bonds in crotoamine self-association. **J. Biochem.** 107: 821 – 825, 1990.
- TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M.; MARANGONI, S.; BARBOSA, R. L.; CORSO, G.; BOSCHERO, A. C. Biochemical characterization of two crotoamine isoforms isolated by a single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islets. **Biochem. et Biophys. Acta.** 1474: 56 – 60, 2000.
- TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S. NOVELLO, J. C.; LEITE, G. B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crotoamine isoforms F22 and F32. **Toxicon**, 41: 493 - 500, 2003.

- VARGAFTIG, B. B.; JOSEPH, D.; WAL, F.; MARLAS, G.; CHIGNARD, M.; CHEVANCEM, L. G. Convulxin, induced activation of intact and of thrombin degranulated rabbit platelets: specific crossed desensitization with collagen. **Eur. J. Pharmacol.**, 92: 57 – 68, 1983.
- VITAL-BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Ver. Ass. Méd. Brasil**, 26: 212 – 218, 1980.
- VITAL-BRAZIL, O. Pharmacology of crostamine. **Mem. Inst. But.**, 52: 23 – 24, 1990.
- YANG, J.S, KIM, J.H. MATSUHASHI ,S., KUME, T. Changes in biochemical properties of ovomucoid by radiation. **Radiat. Phys. Chem.**, 48:.(6) 731 - 735, 1996.
- XU, G., TAKAMOTO K., CHANCE, M. R. Radiolytic modification of basic amino acid residues in peptides: probes for examining protein-protein interactions. **Anal. Chem.** 75: 6995-7007, 2003.
- ZHU, P., BENY, J. L., FLAMMER, J.. LUSCHER T.F., HAEFLIGER I. Relaxation by Bradykinin in Porcine Ciliary Artery. **Invest. Ophthal. & Visual Sci.** 38: 1761-1767, 1997.
- WÜTHRICH, K. NMR studies of structure and function of biological macromolecules. **Nobel Lecture.** 235-275, 2002.

8. ANEXOS