

INIS-BR-- 2986

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGETICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA A UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA DE ⁶⁰Co NAS PROTEINAS DO CRISTALINO

DILCILA MARIA LESSA BERNARDES

Dissertação apresentada
como parte dos requisitos
para obtenção do grau de
Mestre em Tecnologia
Nuclear

ORIENTADORA: Dra. NELIDA LUCIA DEL MASTRO

SÃO PAULO

1991

Ao João Cesar

A meu pai

A minha mãe

AGRADECIMENTOS

Agradeço de modo especial à Dra. Nélida Lúcia Del Mastro, pelo relevante papel exercido em minha formação profissional, orientação desta dissertação, ensinamentos, estímulo e amizade.

Os meus agradecimentos se estendem:

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pela possibilidade oferecida de realização deste trabalho;

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela bolsa concedida;

Ao Dr. Byron A. D. Bernardes, por introduzir-me no campo da pesquisa,

A Dra. Bartira Arezzo, pelo constante apoio e incentivo;

A Dra. Adelaide Faljoni Alário, pelas discussões e sugestões durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. L. J. Greene, do Centro Interdepartamental de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), pela colaboração nas análises;

Ao João Cesar, meu marido, pelo carinho, apoio, incentivo e compreensão durante todo tempo dedicado a este trabalho;

A Nanci Passador, pela dedicação dispensada na digitação e montagem desta dissertação;

Aos meus pais e amigos pelo constante apoio e incentivo;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

60

EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co NAS PROTEINAS DO CRISTALINO

DULCILA MARIA LESSA BERNARDES

Com intuito de estudar os efeitos da radiação gama de ^{60}Co nas proteínas do cristalino bovino foi elaborado um sistema "in vitro". Para isso foram utilizadas soluções aquosas de cristalino bovino irradiadas nas doses de 0, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 e 25.000 Gy. Essa exposição à radiação resultou em alterações nas proteínas avaliadas por diferentes métodos. A turbidimetria revelou a formação de agregados que aumentam com a dose de radiação; isso também foi observado através da viscosimetria das amostras e do espectro de absorção na região do ultravioleta. Pelas análises dos aminoácidos e por fluorimetria foi observado que o aminoácido mais afetado foi o triptofano. Foi também observado um aumento de grupos SH livres das amostras, como consequência da irradiação.

Após a padronização do método foi testada a capacidade radiomodificadora da glutatona, do aminoetilisotiocuréia, da mercaptoetilalanina e do dimetil sulfoxido neste sistema. Pelos resultados obtidos observou-se que na presença dessas substâncias o efeito da radiação foi amenizado.

ABSTRACT

EFFECT OF ⁶⁰Co GAMMA RADIATION ON CRYSTALLIN PROTEINS

DULCILA MARIA LESSA BERNARDES

In order to study the effects of ⁶⁰Co gamma radiation on crystallin proteins an in vitro system was set up. For that, aqueous solutions from bovine crystallin were used irradiated with 0, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 and 25,000 Gy. The treatment led to protein alterations determined by different methods. By turbidimetry the formation of aggregates that increased with the radiation dose was revealed. The same observation was done from viscosity data and from the UV spectrum of the samples. From aminoacid analysis and fluorimetry determinations, tryptophan appeared as the most sensitive aminoacid. An increase in the free-SH-groups was also observed.

After the standardization of the method, the radiomodifier capability of glutathione, aminoethylthiourea, mercaptoethylalanine and dimethyl sulfoxide was tested. The results showed that in the presence of those substances the radiation effect was diminished.

I N D I C E

	PÁG.
1 - Introdução	01
2 - Revisão da literatura	
2.1 - Formação da catarata	04
2.2 - Efeito da radiação ionizante em proteínas	08
2.3 - Análises absorciométricas no ultravioleta	13
2.4 - Fluorimetria	15
2.5 - Viscosimetria	17
2.6 - Ação dos radioprotetores	18
3 - Matérias e Métodos	
3.1 - Preparação das amostras	24
3.2 - Irradiação	24
3.3 - Medida da turbidância	25
3.4 - Teste das substâncias radioprotetoras	25
3.5 - Determinação de grupos SH livres	25
3.6 - Determinação do conteúdo protéico	25
3.7 - Espectro de absorção na região U.V.	26

3.8 - Fluorimetria	26
3.9 - Viscosimetria	26
3.10- Aminograma	27
4 - Resultados	
4.1 - Medida da turbidância	28
4.2 - Determinação de grupos SH livres	29
4.3 - Conteúdo protéico	31
4.4 - Espectro de absorção na região U.V.	33
4.5 - Fluorimetria	35
4.6 - Viscosimetria	36
4.7 - Aminograma	38
5 - Discussão	41
6 - Conclusões	49
7 - Bibliografia	50

1- INTRODUÇÃO

Os efeitos biológicos das radiações têm sido objeto de inúmeros estudos. Isto porque a radiação ao incidir em um determinado sistema ou órgão, atinge simultaneamente muitos outros que apresentam maior ou menor sensibilidade. Podem, então, surgir diversos tipos de lesões irreversíveis na maioria das vezes. Na radioterapia de tumores de cabeça e de pescoço, uma das lesões indesejáveis é o aparecimento da catarata, já que é inevitável a irradiação da cavidade ocular.

Na catarata, o cristalino que normalmente é transparente, torna-se opaco. O cristalino, tem duas funções fundamentais: modificar sua forma para alterar o foco da lente num processo acomodativo e servir como filtro da luz ultravioleta.

A perda de transparência do cristalino se deve a modificações oxidativas de suas proteínas, que mostram um aumento gradual dos níveis de agregação, pigmentação e uma diminuição de grupos tióis.

A radiação ionizante provoca alterações na estrutura das suas proteínas, que são detectáveis pelas modificações em suas propriedades químicas e físico químicas. Essas alterações são também observadas na velhice, embora em menor proporção (Spector, 1984). Em geral, é aceito que a opacidade das lentes seja o

último passo de um complexo processo, no qual a oxidação é o fator iniciador predominante.

Em humanos, a dose limiar de radiação para a formação da catarata, parece ser alguns grays, em dose aguda. Doses baixas podem produzir algum dano, mas clinicamente insignificante. Para doses de 2,5 - 6,5 Gy, o período latente gira em torno de 8 anos; em doses de 6,5 - 11,5, é reduzido para 4 anos. Aumentos de doses resultam em menor período latente.

Além de se desenvolver após a radioterapia, pode haver aparecimento de catarata em trabalhadores expostos a nêutrons durante as operações de cyclotrons e também entre os sobreviventes de acidentes com reatores e explosões nucleares (Hall, 1978).

Todos esses fatos demonstram a importância do aprofundamento dos estudos sobre os mecanismos que conduzem à formação da catarata e os fatores que possam influir no seu aparecimento. Para isso é mister o desenvolvimento de métodos "in vivo" utilizando animais de experimentação bem como métodos "in vitro" que permitam caracterizar os fenômenos envolvidos no processo. Nesta última abordagem se baseia a presente dissertação.

O presente trabalho tem como objetivo:

- elaborar um sistema in vitro, que possa ser utilizado para o estudo da formação da catarata induzida pela radiação ionizante;

- analisar os efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co, nas proteínas extraídas do cristalino, utilizando técnicas de espectrofotometria, fluorimetria, viscosimetria e análise de aminoácidos;

-- testar, neste sistema, o potencial radiomodificador de substâncias presentes durante a irradiação.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Etiologia da catarata

A formação da catarata está relacionada a agentes físicos como luz solar, luz ultravioleta, raios X e gama, a doenças como diabete ou arteriosclerose, a agentes químicos como galactose, e a efeitos bioquímicos por deficiências enzimáticas, algumas das quais hereditárias (Ohmori & Nose, 1985). É também consequência quase inevitável do processo de envelhecimento. Prova disto é a comprovação de que 50 % das pessoas com idade acima de 75 anos são portadoras de catarata.

A catarata consiste na opacificação do cristalino, que é uma estrutura transparente situada entre o humor aquoso e o humor vítreo. Tem a forma de lente biconvexa e apresenta grande elasticidade que diminui progressivamente com a idade. O cristalino se constitui de três partes (Junqueira & Carneiro, 1982):

... as fibras do cristalino, que se apresentam sob a forma de elementos prismáticos finos e longos. São células altamente diferentes, derivadas das células originais da lente embrionária. Essas células, perdem seus núcleos e alongam-se consideravelmente. O citoplasma possui poucas organelas, e isso reduz a difusão da luz. As fibras da lente são unidas por desmossomos e se orientam em direção paralela à superfície da lente;

... a cápsula do cristalino, que se apresenta como um

revestimento homogêneo, hialino e mais espesso na face anterior dessa estrutura. É uma formação muito elástica, constituída principalmente por delgadas lamelas de fibras colágenas, fortemente impregnadas por substância glicoprotéica;

o epitélio subcapsular, formado por uma camada única de células epiteliais dispostas na porção anterior da lente. É a partir desse epitélio que se diferenciam as fibras responsáveis pelo aumento gradual da lente durante o processo de crescimento do organismo. Não existe epitélio na face posterior da lente.

Derivado do ectoderma, o cristalino não contém vasos sanguíneos ou nervos; o humor aquoso abastecido de compostos nutritivos é que os transmite para as células epiteliais da lente. O equilíbrio eletrolítico no cristalino, o qual corresponde a baixas concentrações de sódio e cálcio e uma concentração muito alta de potássio (Duncan & Jacobs, 1984), é preservado pelas áreas de junção entre as células (Benediti et al, 1984). As lentes têm também desenvolvido um eficiente sistema para prevenir oxidação de grupos sulfidrilicos, envolvendo a glutatona (Yu, 1977; Reddy et al, 1975).

Durante a diferenciação celular, proteínas permanentes específicas da lente são sintetizadas e altas concentrações citoplasmáticas são obtidas, cerca de 0,2 a 0,4 g/ml. Essa alta concentração produz um índice de refração adequado para a passagem da luz, enquanto que variações na distribuição e concentração dessas proteínas levam a um gradual aumento desse

índice (Delaye & Tardieu, 1988). De acordo com Benedek (1984), a transparência do cristalino se deve provavelmente à concentração apropriada e distribuição dessas proteínas na lente.

Dos trabalhos feitos para elucidar as modificações produzidas pela radiação nas proteínas do cristalino, sabe-se que essas modificações são acompanhadas pela diminuição das proteínas solúveis de baixo peso molecular, pelo aumento das proteínas insolúveis e pela formação de agregados de proteínas com alto peso molecular (Spector et al, 1974; Roy & Spector, 1976; Coghlan & Augusteyn, 1977).

Em cristalinos humanos, os agregados aumentam com a idade e estão presentes em altas concentrações na catarata senil (Jedziniak et al, 1973). A formação de agregados depende, também, da oxidação dos grupos SH das proteínas (Biblin et al, 1980), e do aumento intracelular da concentração de cálcio (High Tower et al, 1983).

Grças ao advento de melhores técnicas de separação para isolamento e caracterização de proteínas, alguns pesquisadores (Spector et al, 1971; Manson & Hines, 1966; Ocken et al, 1977), dividiram as proteínas do cristalino em três classes: alfa, beta e gama cristalino. O efeito da radiação e de outros indutores da catarata, dependerá da distribuição espacial e do micro-ambiente dos aminoácidos sensíveis à oxidação (cisteína, triptofano, tirosina, histidina e metionina) dentro de toda a estrutura do

cristalino. Embora a estrutura secundária das três classes de proteínas do cristalino, seja similar, sendo predominantemente conformação "beta-sheet", diferenças significantes foram encontradas em suas estruturas terciárias e nos micro-ambientes da cisteína e do triptofano (Liang & Chakrabarti, 1982; Andley et al, 1982).

Há fortes indicações de que os mecanismos de formação de catarata induzida pela radiação incluem a formação de radicais livres e conseqüentemente dano oxidativo, tanto quanto modificações na permeabilidade das células do cristalino (Lipman et al, 1988).

A oxidação do cristalino induz "crosslinking" e mudanças conformacionais nas suas proteínas (Borkman et al, 1981; Ziegler & Goosey 1981). Os resultados encontrados por Ziegler & Goosey, 1981), indicam que as espécies ativas de oxigênio (O_2 , O_2 , H_2O_2 e OH), que são geradas nas reações de oxido-redução, podem causar algumas modificações nas lentes, observadas na velhice e na formação da catarata (Dillon, 1984). Além disso, alguns estudos espectroscópicos (Andley & Chylack, 1986), mostram que as proteínas do cristalino sofrem modificações em sua conformação, pela ação dessas espécies, envolvendo resíduos sulfidrilicos e de triptofano.

2.2- Efeito da radiação ionizante em proteínas:

(O padrão geral de desenvolvimento do dano por radiação, em sistemas biológicos, ocorre em 5 estágios (Bacq & Alexander, 1961):

- . a radiação ao passar pelo sistema, deposita energia;
- . parte dessa energia é usada nas alterações químicas de alguns constituintes, e parte é dissipada na forma de calor;
- . a maioria dessas reações podem ser insignificantes, mas algumas delas, chamadas lesões radioquímicas primárias, ocorrem em pontos vitais da célula agindo como foco de desenvolvimento do dano;
- . após um certo período, lesões bioquímicas podem ser observadas;
- . essas lesões bioquímicas levam a lesões biológicas.

A radiação age sobre as proteínas de forma direta ou indireta, causando alterações que podem ser avaliadas por critérios bioquímicos ou físico-químicos.

A ação direta é a interação da radiação com a molécula alvo (proteína), diretamente (Hall, 1976B). Essa interação se dá pela absorção de energia pela molécula, causando excitação ou ionização. Subsequentemente, essas moléculas excitadas ou ionizadas sendo instáveis, tendem a sofrer rearranjos intra e intermoleculares. A última etapa de transferência de energia em moléculas irradiadas é a formação de moléculas estáveis, que

podem levar à perda da atividade biológica da proteína (Braess, 1963).

As alterações podem ocorrer na estrutura primária, pela destruição de aminoácidos. Análises químicas demonstram que os diferentes aminoácidos não são igualmente susceptíveis ao dano por radiação. No caso da soroalbumina, por exemplo, há uma relação linear entre a dose e a percentagem de aminoácidos alterados. Contudo, a susceptibilidade dos diversos aminoácidos, tais como a cisteína, aminoácidos ácidos, triptofano, histidina, prolina, arginina e aminoácidos básicos, é insuficiente para explicar a denaturação (Brosh & Hopwood, 1979).

Podem ocorrer também quebras das ligações - C - N -, produzindo os grupos carbonila e amida, durante a irradiação na presença de oxigênio como consequência da formação de peróxidos; sendo assim o número de grupos carbonila aumenta bem como a destruição de aminoácidos (Alexander & Lett, 1967).

O processo de absorção de energia da radiação pode resultar também em alterações da estrutura secundária da proteína. Isso pode ser observado pelas modificações na reatividade dos aminoácidos da cadeia lateral, que levam a denaturação da proteína (Alexander & Lett, 1967).

O primeiro estágio de denaturação por irradiação de proteínas, produz uma diminuição na constante de sedimentação, sem significar um aumento do peso molecular. Este fato se deve a um relaxamento da molécula, que se torna menos compacta.

Acredita-se que haja quebra de diversas pontes de hidrogênio. Neste estágio, mantém sua solubilidade em água e se torna mais termolábil. Com uma segunda ionização, as moléculas já totalmente abertas começam a formar agregados por "crosslinking" intermoleculares. A molécula não é mais solúvel em água e sim em soluções salinas. Em doses maiores de radiação, se torna insolúvel (Bacq & Alexander, 1961).

A ação indireta sobre as proteínas ocorre através da ação das espécies reativas formadas pela interação da radiação com o solvente (Hall, 1978). Visto ser a água o principal solvente nos sistemas biológicos, ela está envolvida na maioria das reações. Os estudos da ação indireta são realizados em soluções diluídas, onde a probabilidade da ação direta sobre o soluto é pequena (Buxton, 1982).

A ação da radiação sobre as moléculas de água, resulta em excitação, ionização ou superexcitação das moléculas. Na reação primária, são formados os radicais livres hidroxila (OH^\bullet), hidrogênio (H^\bullet), o elétron hidratado ($\bar{e} \text{aq}$) e o superóxido (O_2^\bullet) (Magee & Chatterjee, 1980). Esses processos ocorrem em pequenos volumes, com raio aproximado de 15 Å. A recombinação desses radicais, resulta na formação de H_2 , H_2O_2 e H_3O^+ (Alexander & Lett, 1967; Pryor, 1977). Na presença de oxigênio, $\bar{e} \text{aq}$ e H^\bullet reagem rapidamente, resultando O_2^\bullet e HO_2^\bullet .

A presença de substâncias orgânicas estranhas, geralmente protege a solução de proteínas pois removem

competitivamente os produtos da radiólise da água.

O oxigênio também pode se combinar com radicais da proteína e alterar qualitativamente os produtos radioquímicos formados (Bresler et al, 1978). Na presença de oxigênio, a proteção por compostos sulfidrilicos pode ser prevenida, pois a reação com O_2 ocorre mais facilmente do que o processo de transferência de hidrogênio. Como há formação de moléculas oxidadas, na presença de oxigênio, este tem a propriedade de fixar o dano (Singh & Singh, 1982).

Na ação indireta da radiação, a inativação está exponencialmente relacionada à dose. Como na ação direta, somente um único evento parece ser necessário para inativar a proteína (Alexander & Lett, 1967), havendo frequentemente modificações na sua solubilidade. Na denaturação, os radicais livres produzidos na radiólise da água causam mudanças na forma da molécula de proteína, facilitando conseqüentemente, o processo de agregação, dando origem a estruturas de diferentes pesos moleculares (Barrison, 1987). Esses agregados são produzidos por crosslinking covalente, mas sua natureza química é desconhecida.

A agregação causa modificações na absorção da solução de proteínas, que são observadas a partir de mudanças no espectro de absorção na região ultravioleta. A quantidade de luz absorvida pela solução de proteína será aumentada pela presença de agregados (Barrison, 1987).

Com o aumento da dose de radiação, não só a fração de proteínas denaturadas aumenta, mas também o tamanho dos agregados formados torna-se maior, até atingir um ponto em que a proteína torna-se insolúvel e precipita.

A formação de "crosslinking" afeta o peso molecular da proteína, aumentando-o. Isso pode ser observado pelo aumento da viscosidade com o aumento da dose de radiação.

Os agregados podem ser quebrados pela exposição, durante algumas horas, a ácidos ou álcalis, mas nem uréia nem sais, promovem a dissociação. Isto sugere que as ligações responsáveis pela manutenção dos agregados não são pontes de hidrogênio, e sim ligações covalentes que não são hidrolisadas.

A radiosensibilidade de diferentes aminoácidos em soluções diluídas varia enormemente, mas não mantém relação com a relativa taxa de destruição dos vários resíduos de aminoácidos nas proteínas. Essa radiosensibilidade varia de proteína para proteína, possivelmente por causa de fatores estéricos. Os grupos localizados fora da molécula de proteína, por exemplo, são mais vulneráveis que aqueles no seu interior (Alexander & Lett, 1967).

Um outro fator importante na ação indireta da radiação, é o pH. Da mesma maneira que na ação direta, a influência do pH pode ser entendida como consequência de mudanças na forma e configuração da molécula de proteína, o que conduz a maior exposição dos sítios críticos.

2.3- Análises absorcivoétricas no ultravioleta:

A absorção da energia radiante nas regiões do espectro visível e ultravioleta depende do número e do arranjo dos elétrons nas moléculas ou ions absorventes (Ewing, 1972).

Compostos totalmente saturados não mostram absorção seletiva nas regiões do visível e do ultravioleta. Compostos que contém uma dupla ligação, absorvem fortemente no ultravioleta afastado. As duplas ligações conjugadas produzem absorção em comprimentos de onda maiores. Quanto mais extenso for o sistema conjugado, mais longos serão os comprimentos de onda onde se observa a absorção.

O comprimento de onda de absorção máxima de um composto, fornece um meio de identificar o cromóforo que ele contém. Em geral, os espectros são modificados pela presença de varios grupos atômicos, quando substituem os átomos de hidrogênio nos carbonos do sistema cromóforo. Tais substituintes têm, em geral, o efeito de deslocar as bandas de absorção para comprimentos de onda mais longos e mudar seus valores de absorvância. Os substituintes que produzem esses efeitos são conhecidos como auxócromos (Ewing, 1972).

Em compostos aromáticos, o anel benzênico é o cromóforo mais simples. Dois ou mais anéis em conjugação, como o naftaleno e o difenol, deslocam a absorção para o visível (Donovan, 1969).

O espectro de absorção no ultravioleta e no visível constituem um instrumento na identificação de compostos orgânicos

insaturados e na elucidação de suas estruturas. Uma informação relativa a um composto de estrutura desconhecida pode, algumas vezes, ser obtida através da comparação direta de seu espectro de absorção com os de compostos de estrutura conhecida.

A absorção espectrofotométrica de perturbações nos cromóforos das proteínas tornou-se um método valioso para a determinação de certos aspectos da conformação da proteína nativa e denaturada em solução. Essas perturbações (Donovan, 1969), podem ser divididas em duas classes: aquelas produzidas por outros grupos na proteína, e aquelas produzidas por moléculas ou íons adicionados à solução de proteínas. Quando essas perturbações são observadas, modificações conformacionais na proteína, podem ser detectadas pela medida de rotação óptica, dicroísmo celular, ressonância magnética nuclear ou viscosidade intrínseca (Donovan, 1969).

Frequentemente são notadas diferenças entre a absorção ultravioleta de uma proteína e a absorção calculada para a proteína com base em análises químicas cuidadosamente feitas, dos aminoácidos cromofóricos. Essas diferenças são uma medida das interações inter e intramolecular dos cromóforos com seu ambiente. Quando essas interações são alteradas, são observadas modificações na absorção.

A absorção na região do ultravioleta, de uma proteína, é consequência de seu conteúdo de certos aminoácidos aromáticos, principalmente triptofano e tirosina (Kabat & Mayer, 1967).

As proteínas mostram absorção característica entre 270 e 290 nm, com absorção máxima em 280 nm.

2.4- Fluorescência

A fluorescência é um dos fenômenos pelo qual moléculas excitadas perdem energia. Durante o processo de excitação, a maior parte das moléculas afetadas adquire energia vibracional e também eletrônica. Sua principal tendência é passar para estados vibracionais inferiores através de colisões. Na fluorescência, essa perda de energia cessa em um nível eletrônico excitado, conseqüentemente, as moléculas estarão aptas a voltarem diretamente ao seu estado fundamental pela radiação de um quantum de energia (Ewing, 1972).

A fluorescência ocorre principalmente em duas classes de substâncias: uma grande variedade de minerais e fósforos inorgânicos e compostos orgânicos ou organometálicos que apresentam grande absorção no ultravioleta.

Na fluorescência de proteínas, contribuições significantes no espectro de emissão são dadas pela tirosina e pelo triptofano, que exibem espectros de fluorescência distintos. É bem conhecido que o triptofano domina a fluorescência da proteínas que possuem alguns triptofanos, mas a fluorescência da tirosina é também observada, particularmente naquelas proteínas que não contém triptofano. Segundo alguns autores, a

fluorescência máxima do triptofano varia de proteína para proteína (Chen et al, 1969).

A fluorescência pode ser medida através de dois espectros, um de excitação e um de emissão. O espectro de emissão descreve a distribuição do fóton na fluorescência de uma substância excitada por luz monocromática. Similarmente, o espectro de excitação é obtido pela variação do comprimento de onda de excitação, mantendo-se constante o comprimento de onda de emissão.

A intensidade da fluorescência de moléculas orgânica é marcadamente dependente do tipo de solvente empregado. Isso pode ser atribuído ao fato de que o período de fluorescência seja longo o bastante para que ocorra interação do estado excitado com as moléculas do solvente. Esse efeito do solvente na fluorescência, pode ocorrer se há pontes de hidrogênio, reação química, ou alguma outra interação específica entre o solvente e o soluto (Chen et al, 1969).

As proteínas mostram grandes variações em sua estabilidade. As condições para a integridade estrutural, deve ser estabelecida para cada proteína no que diz respeito variáveis comumente empregadas, tais como pH, temperatura e reagentes denaturantes. A fluorescência não é necessariamente constante naquelas proteínas que parecem ser susceptíveis a modificações dessas variáveis (Chen et al, 1969).

A redução na intensidade da fluorescência é chamada supressão ("quenching"). Esta supressão pode ocorrer simplesmente como resultado da absorção parcial da luz fluorescente por algum componente da solução. Se, a substância em si for responsável por essa absorção, o fenômeno é conhecido como auto-supressão. A supressão também pode ser atribuída à possibilidade de transferência da energia por colisão de moléculas excitadas da substância fluorescente com a molécula do solvente ou de outros solutos, resultando um mecanismo paralelo mas não radiante para voltar ao estado fundamental (Ewing, 1972).

2.5- Viscosimetria

Viscosidade de um fluido é a propriedade pelo qual ele resiste a uma modificação na forma ou no movimento de porções vizinhas da molécula em relação a outras, sendo sua recíproca a fluidez. A viscosidade representa a fricção interna entre as moléculas.

Entre as técnicas físicas usadas para a determinação do tamanho e da forma da proteína, a viscosimetria é a mais simples das medidas, não sendo um método absoluto (Bradbury, 1970).

A viscosidade intrínseca está relacionada ao peso molecular da polímeros pela equação empírica de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K M^a$$

onde K e a são constantes, independentes da concentração e do peso molecular, mas variam com a temperatura e com o solvente usado. Essa equação é muito usada na determinação do peso molecular e o expoente a é dependente da forma e solvatação da macromolécula.

A viscosidade é dependente da temperatura. O efeito observado com o aumento da temperatura pode ser uma diminuição da viscosidade, nenhuma modificação, um aumento da viscosidade ou a ocorrência de um platô (Bradbury, 1970).

A viscosimetria tem sido utilizada em experimentos que envolvem quebra de moléculas grandes em unidades menores, ou naqueles envolvendo reações acompanhadas por agregação. Em alguns estudos, a determinação da viscosidade tem servido no controle da degradação de substâncias biologicamente ativas. A degradação resultante de tratamentos drásticos, resulta numa diminuição acentuada da viscosidade. Quando proteínas nativas são denaturadas por vários tipos de tratamentos, um aumento na viscosidade é observado (Kabat, 1967).

2.6- Ação dos Radioprotetores

Substâncias radioprotetoras são agentes químicos que reduzem ou previnem os efeitos das radiações, quando presentes no sistema durante a irradiação.

As teorias de proteção à radiação podem ser consideradas

tanto a nível molecular como a nível fisiológico-bioquímico, ou seja, mecanismos de proteção envolvendo processos químicos de início rápido e aqueles em que a proteção é resultado de mudanças na bioquímica ou fisiologia da célula. Do ponto de vista da química da radiação, os compostos protetores parecem agir por participação direta em reações de radicais livres.

Os mecanismos de proteção química contra o dano da radiação ionizante, levam em consideração 3 hipóteses: sequestro de radicais ("radical scavenging"), reações de transferência de hidrogénio e formação de dissulfetos mistos (Bianbarresi & Jacobs, 1987).

. Radical Scavenging

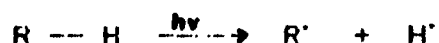
Essa teoria em radioproteção, envolve fundamentalmente o efeito indireto da radiação, ou seja, a interação da radiação ionizante com sistemas biológicos aquosos. Esta teoria se refere à capacidade dos radioprotetores de removerem os produtos altamente reativos da radiólise da água, antes que eles reajam com moléculas biologicamente importantes (Bacq & Goutier, 1967; Fabrikant, 1972).

Esse processo é uma reação de competição entre os radioprotetores e as espécies ativas de oxigénio, pelas moléculas biológicas. O radioprotetor reduz a concentração de radicais livres na solução, protegendo os alvos biológicos (Klayman & Copeland, 1982).

Nos seres vivos, quando moléculas de água são irradiadas, uma grande variedade de radicais são produzidos, entre eles incluem-se o radical hidroxila (OH[•]), o elétron hidratado (e⁻ aq), o radical superóxido (O₂^{•-}) e o radical hidrogênio (H[•]). Desses, o OH[•] e o e⁻ aq são produzidos em concentrações mais altas, e o OH[•] é considerado o mais danoso (Chapman & Reuvers, 1977; Czapski, 1984).

. Doação de hidrogênio

Consiste num processo de reparo rápido, pelo qual um átomo de hidrogênio é perdido da molécula biologicamente importante (Copeland, 1987). Isso se dá pela absorção direta da energia da radiação:



ou via reação indireta com radicais livres:



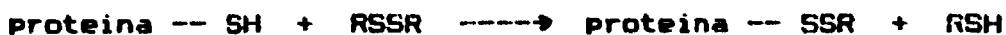
ou por doação de um átomo de hidrogênio por um protetor sulfidrilico (P - H).



. Formação de dissulfetos mistos

Esta teoria só se aplica a radioprotetores contendo enxofre e envolve a formação reversível de ligações dissulfidricas entre os grupos trióis da proteína e do

radioprotetor (Eldjarn & Pihl, 1956). Essas ligações preservam a integridade da proteína, alterando sua radiosensibilidade intrínseca, segundo as equações:



A grande maioria dos agentes radioprotetores são aminotióis. São os mais efetivos radioprotetores conhecidos. Dentre os aminotióis, os mais representativos são a cisteína, a mercaptostilalanina e o aminoetilisotiocureia (Biambarresi & Jacobs, 1987).

Embora a proteção conferida por essas drogas seja significativa, o maior obstáculo para sua utilização em humanos, é a sua estreita faixa terapêutica. Elas protegem somente em doses que são tóxicas para o organismo. Entretanto, essas descobertas contribuíram significativamente para o desenvolvimento de novas substâncias, pois promoveram o entendimento das características estruturais que são necessárias para a proteção pelos aminotióis (Brown, 1967; Brown et al., 1982). Foi determinado que para uma considerável proteção, a substância deva ter um grupo SH livre separado de um grupo amina fortemente básico, por não mais do que 3 átomos de carbono (Grosch & Hopwood, 1979). Atualmente, estão sendo desenvolvidas novas substâncias com essas características, dentre as quais cabe citar os derivados do ácido fosfortióico (Yuhas, 1970; Yuhas et al.,

1980).

Os radicais livres, além de serem formados na radiólise da água, são também produtos de diversos processos fisiológicos, tais como respiração e inflamação (Meneghini, 1987). Por isso, o organismo possui mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de defesa, para neutralizar esses radicais.

Nos sistemas enzimáticos incluem-se as peroxidases, a catalase e a superóxido dismutase.

A glutathione peroxidase, por exemplo, converte H_2O_2 a água via oxidação da glutathione (Lawrence & Burk, 1978) e, da mesma maneira que outras peroxidases, pode também metabolizar hidroperóxidos lipídicos a gorduras não reativas.

A catalase, outra enzima que remove H_2O_2 , catalisa a redução de H_2O_2 a água. Assim, a glutathione peroxidase e a catalase, em conjunto, diminuem a concentração de H_2O_2 que, se não degradada, pode produzir radicais mais potentes (Bianbarresi & Jacobs, 1987).

Essas enzimas, agem em conjunto com a superóxido dismutase, e esse é o meio primário pelo qual o ânion superóxido é eliminado dos sistemas biológicos. A superóxido dismutase catalisa a conversão de O_2^- a H_2O_2 e oxigênio (Ptken, 1978; Brawn & Fridovich, 1980).

Entre os compostos não enzimáticos, incluem-se:

. a glutathiona (L - gama - glutamil - L - cistenil - glicina), que é o principal radioprotetor endógeno pela sua capacidade de desintoxicar o organismo das espécies reativas geradas pela radiação (Meister & Tate, 1976; Meister, 1981).

. as vitaminas A (beta - caroteno), C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), que são scavengers de radicais livres (Davidson et al., 1980; Seifter et al., 1982; Srinivasa et al., 1983).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Preparação da solução protéica

Os cristalinos foram removidos cirurgicamente de olhos bovinos frescos, obtidos em abatedouro. Após serem descapsulados, foram homogeneizados em água bidestilada à 0g C (2 gr cristalino / 5 ml água), em um homogeneizador Potter-Elvehjem, em banho de gelo. A solução foi centrifugada a 13.000 rpm/ 30 minutos, em uma centrifuga refrigerada SORVALL mod. RCB-B à 4g C. Ao sobrenadante foi acrescentado N-etilmaleimide (Sigma) numa concentração final de 10 mM. A solução foi dializada em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,4. Este material foi liofilizado e estocado em dessecador a -18g C.

3.2- Irradiação das amostras

Aliquotas da solução foram submetidas a irradiação de ^{60}Co (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada, Ltda), nas doses de 0, 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 e 25.000 Gy, numa taxa de dose média de 851 Gy / hora, em tubos de vidro. A câmara de irradiação da gammacell) 220 tem dimensões de 15,49cm de diâmetro por 20,47cm de altura. A fonte de ^{60}Co propriamente dita, está localizada no centro da blindagem de chumbo, consistindo de 26 lâpis com 7 pastilhas de cobalto. Isto faz com que a amostra seja irradiada homogeneamente.

3.3- Medida da Turbidância

A medida da turbidância foi realizada em um espectrofotômetro Carl Zeiss mod. PMQ II, num comprimento de onda de 600 nm, em todas as amostras, diluídas 1/100.

3.4- Teste das substâncias radio-modificadoras

Após a padronização do método, foram testadas as seguintes substâncias:

- . glutationa(gama-glutamil-cistenil-glicina) - GSH(Sigma)
- . 2-aminoetilisotiouréia - AET (Sigma)
- . mercaptoetilalanina - MEA (Sigma)
- . dimetil sulfóxido - DMSO (Merk)

Estas substâncias foram acrescentadas, aproximadamente 10 minutos antes da irradiação, numa concentração final de 10 mM.

3.5- Determinação de grupos SH livres

Para determinar grupamentos SH livres que podem se formar durante a irradiação pela quebra de pontes S-S, empregou-se o método de Ellman (1959), onde se usa a cisteína como padrão de dosagem.

3.6- Espectro de absorção na região U.V.

Foi determinado o espectro de absorção entre 240 e 350

na, com o intuito de observar as possíveis alterações estruturais da proteína, após a irradiação. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro Carry, mod. 118, nas amostras diluídas 1/10.

3.7- Determinação do conteúdo protéico

O conteúdo protéico das amostras, foi determinado segundo o método descrito por Lowry e modificado por Miller (1959), utilizando como padrão de dosagem soroalbumina bovina.

3.8- Fluorimetria

Todas as medidas de fluorescência relativa, foram obtidas em um espectrofotômetro de fluorescência Perkin Elmer, mod. MPF-2A, equipado com lâmpada de xenônio de 150W, do Instituto de Química da USP. A excitação foi fixada em 260 nm, e fez-se o espectro de emissão de 290 a 450 nm.

3.9- Viscosimetria

Para medir a viscosidade, utilizou-se um viscosímetro Brookfield de leitura digital, mod. DV-II, spindle SC4-18/13R a 12 rpm, com adaptador para pequenas amostras, com banho termostaticado de -30°C a 130°C Neslab RTE-110 (Neslab Instruments Ltda Newington, USA), calibrado contra fluido padrão de silicone de 5 centipoise (densidade 0,920) e 10 centipoise (densidade 0,940) a 25°C da Brookfield, segundo normas da U.S. National Bureau of Standards.

3.10- Aminograma

A análise de aminoácidos foi realizada no Centro Interdepartamental de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela equipe do Dr. Greene após as seguintes hidrólises:

- . com LiOH 4N para o triptofano, por 24 horas a 110º C.
- . com HCl 6N por 22 horas, à mesma temperatura para os demais aminoácidos.

4- RESULTADOS

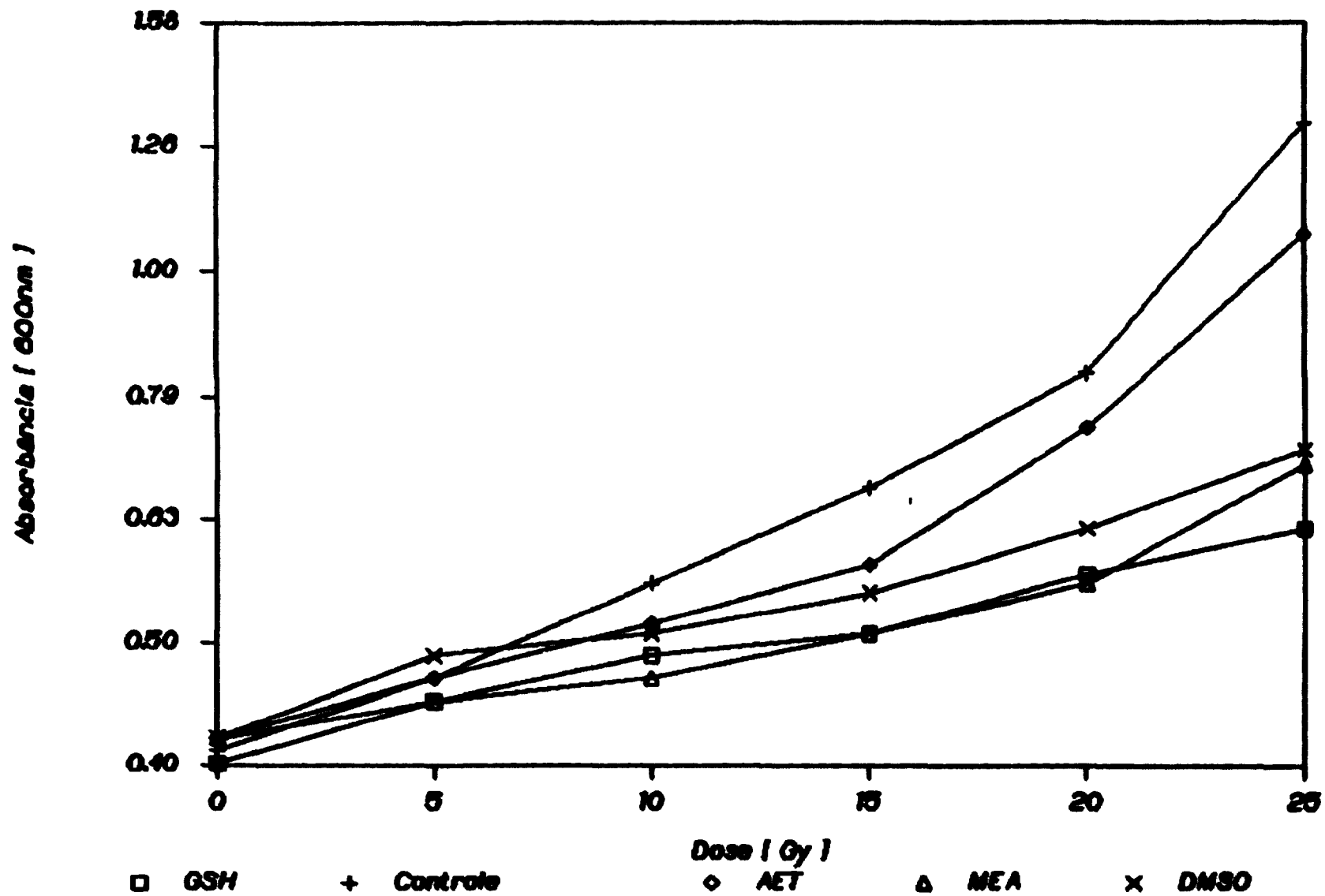
4.1- Medida da Turbidância

Os resultados obtidos na medida da turbidância da fração solúvel das proteínas do cristalino bovino à 600nm, são demonstrados na figura 1.

As amostras de cristalino bovino irradiadas com ⁶⁰Co apresentam um aumento da turbidância com o progressivo aumento da dose de radiação, numa relação aparentemente linear em relação ao controle não irradiado.

Nas amostras em que se acrescentou as substâncias radiomodificadoras, nota-se uma aparente proteção dessas substâncias, em relação ao controle irradiado. A glutathione apresentou um índice de proteção de 65%; a mercaptoetilalanina de 60%; o dimetil sulfoxido de 59%; e o aminoetilisotiocureia de 39%, em relação aos valores de dose de 25.000 Gy.

Figura 1- Medida de turbidância a 600nm



4.2- Grupos SH livres

Imediatamente após a irradiação, foi realizada a determinação de grupos SH livres de todas as amostras pelo método de Ellman (1959), utilizando cisteína como padrão (tabela 1).

Os resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, indicam que nas amostras não irradiadas há ausência desses grupos, sugerindo que, os grupos SH foram eficientemente bloqueados pelo N-etilmaleimide. Com o aumento da dose de radiação, essas pontes são quebradas, e há liberação desses grupos, que aumentam com a dose de radiação. As amostras irradiadas na presença de DMSO, apresentaram um comportamento semelhante.

Nas amostras irradiadas com GSH, AET e MEA, os controles não irradiados possuem alta concentração de grupos SH que sofrem diminuição com o aumento da dose de radiação. Assim, os valores para a dose de 25.000 Gy, ficaram reduzidos 4,8, 3,4 e 2,3 vezes para o MEA, GSH e AET, respectivamente.

Tabela 1- Curva padrão para a determinação de grupos SH livres.

concentração de -3 cisteína (x10 M)	absorvância a 412nm
5,00	4,98 +/- 0,008
2,50	2,12 +/- 0,002
1,67	1,37 +/- 0,006
1,25	1,03 +/- 0,006
1,00	0,70 +/- 0,001
0,83	0,55 +/- 0,004

Tabela 2- Valores de absorvância à 412nm para as amostras de cristalino bovino, segundo o método de Ellman.

Dose (Gy)	Controle	DMSO	ESH	AET	MEA
0	---	---	2,05+/-0,07	1,90+/-0,01	2,05+/-0,07
5	0,32+/-0,01	0,34+/-0,01	1,86+/-0,01	1,79+/-0,02	1,88+/-0,01
10	0,49+/-0,01	0,53+/-0,01	1,32+/-0,01	1,69+/-0,01	1,65+/-0,01
15	0,95+/-0,01	0,74+/-0,04	1,24+/-0,04	1,48+/-0,01	1,31+/-0,01
20	1,17+/-0,03	0,91+/-0,01	0,95+/-0,07	1,23+/-0,01	0,70+/-0,01
25	1,90+/-0,01	1,05+/-0,07	0,60+/-0,01	0,89+/-0,01	0,44+/-0,01

Tabela 3- Concentração final de SH livres, nas amostras de cristalino bovino ($Y=ax+b$, onde $a = 1,04$ e $b = -0,299$)

Dose (Gy)	Controle	DMSO	GSH	AET	MEA
0	---	---	2,26+/-0,3	2,11+/-0,2	2,26+/-0,3
5	0,59+/-0,2	0,61+/-0,2	2,08+/-0,2	2,00+/-0,3	2,09+/-0,2
10	0,76+/-0,3	0,79+/-0,2	1,56+/-0,2	1,91+/-0,2	1,88+/-0,2
15	1,20+/-0,2	0,99+/-0,3	1,48+/-0,4	1,71+/-0,2	1,54+/-0,2
20	1,41+/-0,3	1,16+/-0,2	1,20+/-0,3	1,47+/-0,2	0,96+/-0,2
25	2,11+/-0,2	1,29+/-0,3	0,86+/-0,2	1,14+/-0,2	0,71+/-0,2

4.3- Espectro de absorção na região ultravioleta

Na tabela 4, são apresentados os valores de absorção máxima (280 nm) e mínima (250 nm), das amostras de cristalino bovino.

Observa-se que nas amostras controle, ocorre um aumento da absorção com o aumento da dose de radiação. Na presença das substâncias radiomodificadoras, esta correlação, porém não é mantida.

Tabela 4- Máximos e mínimos no espectro de absorção na região ultravioleta, das amostras de cristalino bovino.

Radiomodificador	Dose (Gy)	Máxima (280 nm)	Minima (250 nm)
controle	0	1,189	0,572
	5.000	1,239	0,616
	10.000	1,357	0,898
	15.000	1,688	0,719
	20.000	1,822	0,907
	25.000	2,000	1,100
DMSO	0	1,617	0,741
	5.000	1,707	0,805
	10.000	1,417	0,691
	15.000	1,808	0,883
	20.000	1,904	0,950
	25.000	1,763	0,944
GSH	0	1,720	0,852
	5.000	1,095	0,539
	10.000	1,400	0,709
	15.000	1,492	0,787
	20.000	1,778	0,943
	25.000	1,712	0,926

(continua)

AET	0	1,665	0,778
	5.000	1,738	0,890
	10.000	1,872	1,040
	15.000	1,992	1,187
	20.000	2,062	1,284
	25.000	2,917	1,764
<hr/>			
MEA	0	1,686	0,794
	5.000	1,407	0,672
	10.000	1,746	0,842
	15.000	1,779	0,886
	20.000	1,898	0,989
	25.000	1,978	1,110
<hr/>			

4.4- Conteúdo protéico

A curva padrão de soroalbumina bovina para a dosagem de proteínas, é apresentada na tabela 5.

Nos resultados apresentados na tabela 6, nota-se que com a irradiação ocorre uma diminuição da concentração de proteínas.

Tabela 5- Curva padrão de soroalbumina bovina para a dosagem de proteínas.

concentração de padrão ($\mu\text{g}/200\text{ml}$)	leitura à 650nm
200	0,806 +/- 0,01
100	0,430 +/- 0,02
50	0,223 +/- 0,01
25	0,119 +/- 0,01
12,5	0,052 +/- 0,02

Tabela 6 - Conteúdo protéico das amostras de cristalino bovino irradiadas ($Y = ax + b$, onde $a = 0,004$ e $b = 0,0172$).

Dose (Gy)	Leitura à 650nm	[prot] ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	0,370 +/- 0,03	441 +/- 3,2
5.000	0,227 +/- 0,03	262 +/- 3,2
10.000	0,175 +/- 0,02	198 +/- 0,7
15.000	0,142 +/- 0,03	156 +/- 3,2
20.000	0,135 +/- 0,02	148 +/- 0,7
25.000	0,119 +/- 0,02	128 +/- 0,7

4.5- Fluorimetria

Os resultados encontrados para a medida de intensidade de fluorescência das proteínas do cristalino bovino irradiadas, são apresentados na tabela 7.

Na amostra controle e nas amostras com DMSO, nota-se que houve um acentuado decréscimo da fluorescência com o aumento da dose de radiação.

As amostras irradiadas com GSH, AET e MEA mostram também um decréscimo da fluorescência com aumento da dose de radiação, mas não tão acentuado quanto nas amostras controle ou com DMSO.

Tabela 7- Medida fluorimétrica das amostra de cristalino bovino.

Excitação: 260nm; Leitura: 340nm.

Dose (Gy)	Controle	DMSO	GSH	AET	MEA
0	82+/-1,4	94+/-0,7	92+/-1,4	93+/-2,8	85+/-0,9
5.000	50+/-1,4	51+/-0,7	73+/-2,8	71+/-0,9	76+/-3,5
10.000	33+/-1,4	38+/-0,9	64+/-0,7	60+/-2,8	64+/-3,0
15.000	21+/-2,1	28+/-0,3	53+/-3,5	56+/-2,7	54+/-2,7
20.000	16+/-0,7	17+/-0,4	47+/-3,6	48+/-0,9	43+/-1,5
25.000	11+/-0,7	12+/-0,3	36+/-0,9	33+/-2,7	34+/-1,1

4.6- Viscosimetria

Nos resultados apresentados na tabela 8, observa-se que nas diferentes temperaturas, a viscosidade da solução de proteína aumentou com o aumento da dose de radiação. Entretanto, com o aumento da temperatura (2,5°C - 20°C), a viscosidade diminuiu (Tabela 9). Nas amostras com as substâncias radiomodificadoras, são observados resultados semelhantes, mas o aumento é menor.

Tabela 8- Valores da viscosidade em centipoise (CPS), a diferentes temperaturas, das amostras de cristalino bovino irradiadas

Radiomod.	Dose	2,5	5	10	15	20
controle	0	2,76	2,45	2,40	2,20	2,00
	5.000	2,86	2,70	2,56	2,35	2,05
	10.000	3,00	2,76	2,58	2,37	2,15
	15.000	3,26	3,11	2,91	2,65	2,30
	20.000	3,36	3,16	3,06	2,70	2,35
	25.000	3,71	3,66	3,36	2,86	2,50
DMSO	0	2,50	2,61	2,45	2,20	1,95
	5.000	2,61	2,70	2,61	2,25	2,05
	10.000	2,76	2,81	2,70	2,35	2,25
	15.000	2,96	2,96	2,76	2,50	2,25
	20.000	2,96	2,99	2,76	2,56	2,30
	25.000	3,06	3,26	2,96	2,65	2,30

(continua)

GS4	0	2,50	2,45	2,40	2,15	2,00
	5.000	2,61	2,50	2,50	2,20	2,05
	10.000	2,61	2,50	2,50	2,20	2,05
	15.000	2,76	2,70	2,61	2,30	2,10
	20.000	2,76	2,70	2,61	2,30	2,10
	25.000	2,86	2,86	2,61	2,40	2,15

AET	0	2,45	2,56	2,35	2,05	1,95
	5.000	2,65	2,65	2,64	2,25	2,00
	10.000	2,81	2,76	2,64	2,30	2,00
	15.000	2,81	2,76	2,65	2,30	2,05
	20.000	2,81	2,76	2,65	2,35	2,05
	25.000	2,86	2,86	2,70	2,40	2,10

MEA	0	2,50	2,61	2,40	2,15	1,95
	5.000	2,56	2,61	2,45	2,20	2,00
	10.000	2,70	2,70	2,56	2,25	2,00
	15.000	2,86	2,70	2,56	2,25	2,05
	20.000	2,85	2,81	2,56	2,25	2,05
	25.000	2,86	2,81	2,61	2,30	2,05

Tabela 9- Diferença na viscosidade das amostras de cristalino bovino, nas diferentes temperaturas, entre 0 e 25.000 Gy.

Temperatura	Controle	DMSO	GSH	AET	MEA
2,5	0,95	0,56	0,36	0,41	0,36
5	1,21	0,65	0,41	0,30	0,20
10	0,96	0,51	0,21	0,35	0,21
15	0,66	0,45	0,25	0,35	0,15
20	0,50	0,35	0,15	0,15	0,10

4.7- Aminograma

Na tabela 10, são mostrados os resultados da análise de aminoácidos das amostras de cristalino bovino irradiadas. Os resultados em micromoles de aminoácidos/ micrograma de amostra mostram que a maioria dos aminoácidos não foi afetada significativamente pela irradiação. Entretanto, os aminoácidos mais afetados foram o triptofano, a metionina, a tirosina, a histidina e a cisteína, quando comparados os dados das amostras irradiadas com 25.000 Gy com os controles (Tabela 11). Os valores calculados desse decréscimo são 90%, 67%, 43%, 33% e 24%, para o triptofano, a metionina, a tirosina, a histidina e a cisteína, respectivamente.

Tabela 11- Aminograma das amostras de cristalino bovino irradiadas.

Aminoácido	controle	5.000	10.000	15.000	20.000	25.000
lisina	0,25	0,25	0,23	0,21	0,20	0,20
histidina	0,21	0,20	0,18	0,17	0,15	0,14
arginina	0,47	0,45	0,44	0,42	0,40	0,40
triptofano	0,20	0,16	0,10	0,07	0,04	0,02
ác. aspártico	0,48	0,47	0,47	0,45	0,43	0,41
treonina	0,17	0,17	0,15	0,14	0,13	0,13
serina	0,42	0,42	0,40	0,39	0,38	0,37
ác. glut.	0,69	0,67	0,65	0,64	0,62	0,60
prolina	0,33	0,33	0,31	0,30	0,29	0,29
glicina	0,42	0,41	0,41	0,39	0,39	0,37
alanina	0,25	0,24	0,24	0,22	0,20	0,20
1/2cistina	ND	ND	0,01	0,03	0,06	0,07
valina	0,30	0,28	0,28	0,27	0,25	0,25
metionina	0,15	0,13	0,12	0,10	0,09	0,05
isoleucina	0,23	0,23	0,22	0,21	0,20	0,20
leucina	0,37	0,35	0,34	0,32	0,31	0,31
tirosina	0,21	0,19	0,17	0,16	0,14	0,11
fenilalanina	0,36	0,35	0,35	0,33	0,31	0,31
ác. cisteico	0,17	0,16	0,15	0,15	0,13	0,13

ND = Não detectável.

Tabela 11- Decréscimo nas concentrações dos aminoácidos das soluções de cristalino bovino.

Aminoácido	Decréscimo (%)
lisina	20
histidina	33
arginina	15
triptofano	90
ác. aspártico	15
treonina	23
serina	12
ác. glut.	13
prolina	12
glicina	12
alanina	20
1/2 cistina	ND
valina	16
metionina	67
isoleucina	13
leucina	16
tirosina	46
fenilalanina	14
ác. cisteico	24

5 - DISCUSSÃO

Neste trabalho, procurou-se analisar os efeitos da radiação gama de ⁶⁰Co nas proteínas do cristalino bovino e estabelecer a capacidade modificadora da GSH, do AET, do MEA e do DMSO em relação a resposta à radiação.

Os resultados obtidos na turbidimetria demonstram que a medida que a radiação ionizante atravessa a solução de proteína, há uma deposição de energia dependente da dose absorvida, manifestado pelo aumento da absorvância. Considera-se que a radiação induz modificações químicas nas estruturas primária e secundária, bem como quebra de ligações peptídicas e dissulfeto e formação de "crosslinking" inter e intra-molecular. Assim, o efeito da radiação assemelha-se à denaturação pelo calor ou por agentes que quebrem pontes de hidrogênio (Alexander & Lett, 1967).

No estudo realizado por Ohmori e Nose (1987), foram analisadas as modificações na turbidez e viscosidade das proteínas de cristalino bovino in vitro após irradiação U.V.. Segundo esses autores, os dados sobre modificação na turbidez em experimentos in vitro são necessários visto que a formação da catarata é acompanhada por um aumento da opacidade das proteínas da lente. As modificações na turbidimetria das proteínas pode ser atribuída ao "crosslinking".

Em nosso trabalho, ao serem acrescentadas as substâncias

radiomodificadoras, nota-se também uma diminuição da turbidez significando que o efeito da radiação foi amenizado.

Essas substâncias testadas em nosso sistema são consideradas "scavengers" de radical hidroxila (OH^\cdot). Esse radical reage com a maioria dos compostos orgânicos e é a maior espécie inativante em sistemas aquosos (Czapski, 1984). Esses "scavengers" têm a capacidade de remover os radicais hidroxila produzidos na radiólise da água antes que eles reajam com moléculas biologicamente importantes. Neste processo há redução da concentração de radicais livres na solução (Giambarresi & Jacob, 1987).

A glutatona (GSH) é o mais importante tiol não proteico endógeno, estando bem distribuída nas células, presentes nas concentrações de 0,5 a 10 $\mu\text{mol/g}$ do peso úmido de vários tecidos animais. Nos cristalinos, está presente numa concentração de 7 - 15 $\mu\text{mol/g}$ do peso úmido da lente. Sua mais importante função é manter incolor o cristalino. Na formação da catarata ocorre uma acentuada diminuição de sua concentração, levando à opacificação da lente, devido ao fato dela ser um potente inibidor das reações foto-oxidativas.

O aminoetilisotiocarbamato (AET) e a mercaptoetilalanina (MEA) são aminotióis, com analogia química com a cisteína, que foi a primeira substância com capacidade radioprotetora encontrada (Giambarresi & Jacobs, 1987). O AET, difere da cisteína por possuir um grupo uréia encobrindo a função SH. Sua eficiência

como radioprotetor vai depender da liberação do grupo SH em pH fisiológico, formando o composto mercaptoetilguanidina, que possui o grupo SH livre (Shapira et al., 1952).

A MEA é a forma descarboxilada da cisteína e é considerada um dos mais potentes radioprotetores. Pela sua eficiência e simplicidade estrutural, foi muito estudada e a muitos anos é protótipo para testes de outros agentes radioprotetores (Bacq, 1957; Giambarresi & Jacob, 1987).

O dimetil sulfoxido (DMSO), foi a única substância testada em nosso sistema, que não pertence ao grupo dos aminotióis. Sua capacidade radioprotetora foi descoberta por acaso, ao ser usado como solvente de substâncias a serem injetadas em camundongos que seriam irradiados (Ashwood - Smith, 1961). Sua capacidade de radioproteção se deve a sua habilidade de inativar radicais livres, particularmente OH[•] (Bridges, 1962).

Os resultados encontrados em nosso sistema, nos permite supor que na ação direta e indireta da radiação na presença das substâncias ensaiadas, houve uma competição capaz de reduzir os radicais livres na solução, principalmente o radical hidroxila, dando origem a moléculas estáveis, como sugerem Alexander & Lett, (1967).

Os resultados obtidos em nosso sistema, na dosagem de grupos SH, pelo método de Ellman (1959), demonstram que os resíduos de

cisteína poderiam estar comprometidos em pontes de dissulfeto, ou que esses resíduos foram bloqueados pelo N-etilmaleimide, no controle não irradiado. Essa substância foi acrescentada antes da irradiação para bloquear os tióis endógenos das proteínas do cristalino. Com a irradiação essas pontes foram quebradas e houve liberação dos grupos SH, que aumentam com a dose de radiação. Nas amostras com DMSO, ocorreu o mesmo fato.

Nas amostras com GSH, AET e MEA, os controles não irradiados apresentaram uma alta concentração de grupos SH, provenientes da substância acrescentada, visto que os tióis endógenos foram bloqueados pelo N-etilmaleimide. Com o aumento da dose de radiação, esses grupos foram oxidados e sua concentração diminuiu. Durante a formação da catarata, as proteínas do cristalino mostram uma diminuição gradual do conteúdo de grupos SH. Isso se deve principalmente à glutatona, que na formação da catarata é oxidada.

Merola & Kinoshita (1957) também observaram que os grupos SH das proteínas do cristalino são normalmente estáveis; entretanto esses grupos tornam-se muito susceptíveis à oxidação após a denaturação da proteína. Fenômeno semelhante pode ocorrer após a irradiação da lente, onde os grupos SH tornam-se expostos e oxidados.

Para avaliar as modificações oxidativas ocorridas em proteínas de cristalino bovino, Siezen et al (1988) determinaram

uma perda substancial dos grupos SH das proteínas em solução, quando incubadas em alta concentração de H₂O₂ juntamente com a sua denaturação.

As soluções de cristalino bovino irradiadas foram sujeitas à dosagem de proteínas. Verificou-se uma perda de 29% do material proteico, quando se considera a maior dose utilizada. Sabendo que na formação da catarata ocorre o aparecimento de agregados proteicos (Spector et al, 1974), é sugerido que essa perda seja resultante da precipitação de algumas proteínas em virtude da agregação (Walker & Borkman, 1988).

Nas amostras irradiadas com GSH, AET e MEA, a determinação do conteúdo proteico foi prejudicada. Isso se deve ao fato de que esse método sofre interferência do nitrogênio dessas substâncias que apresentam o grupo amina (Miller, 1959) e também pela presença de grupos SH livres ou de outros agentes oxidantes (Kabat, 1967). A determinação do conteúdo proteico nas amostras irradiadas com DMSO, também foi prejudicada de maneira semelhante.

A absorção específica na região ultravioleta para várias moléculas, principalmente proteínas, é consequência do conteúdo dos aminoácidos aromáticos, principalmente triptofano e tirosina, proporcionando importantes informações sobre a constituição e estrutura da proteína (Kabat, 1967).

Em proteínas irradiadas em solução a agregação causa modificações no espectro de absorção na região U.V. por causa do

maior número de moléculas difusas à luz. Essa aparente modificação no espectro de absorção de proteínas irradiadas é erroneamente atribuída a modificações químicas nos grupos cromóforos das proteínas (Alexander & Lett, 1967).

Walker & Borkman (1988) em experimentos de crosslinking induzido pela luz ultravioleta de soluções aquosas de gama cristalino bovino, mostraram que no espectro de absorção na região ultravioleta ocorre um aumento da densidade óptica na região entre 250 a 350nm, pelo aumento da turbidez da solução. Não há evidências claras do aparecimento de novos cromóforos após a irradiação U.V..

Nossos resultados mostram um aumento na absorção na região U.V., com aumento da dose de radiação. Isso também corresponde a um aumento da turbidez das amostras. Nas soluções irradiadas com GSH, AET, MEA e DMSO essa correlação não foi observada, provavelmente por introduzir perturbações no sistema (Donovan, 1969).

A fluorescência de proteínas se origina dos aminoácidos aromáticos que absorvem no ultravioleta próximo (Chen et al, 1969). Nas amostras de cristalino bovino, observou-se uma diminuição na fluorescência das proteínas com o aumento da dose de radiação.

A oxidação direta dos resíduos de triptofano altera a estrutura da proteína suficientemente, causando insolubilização e

modificações na estrutura terciária. Esse dano oxidativo é considerado um importante fator nas modificações da lente durante a formação da catarata (Spector, 1984).

Segundo dados da literatura (Torriglia & Zigman, 1988; Walker & Borkman, 1988), o principal alvo da radiação nas proteínas do cristalino são os resíduos de triptofano e seus foto-produtos, que levam a modificações na solubilidade da proteína e inibição da atividade biológica. A radiação pode afetar o peso molecular das proteínas fundamentalmente de duas maneiras: aumentá-lo através da formação de "crosslinking" ou reduzi-lo pela degradação da cadeia. Nos nossos experimentos, este aumento não foi muito acentuado mas indica uma predominância do processo de agregação na solução de proteínas do cristalino. Nas amostras com GSH, AET, MEA e DMSO, ocorreu uma aparente proteção da formação de agregados observadas pelos valores da viscosidade em função da dose de radiação.

Ohmori & Nose (1985), ao examinarem se o "crosslinking" das proteínas do cristalino bovino irradiadas com luz ultravioleta era prevenido pela glutathiona (GSH) realizaram a medida da viscosidade específica das soluções. Pelos resultados, eles observaram que a glutariona protegeu a solução de proteínas. Nossos resultados confirmam esses dados.

Sabe-se também que a viscosidade de proteínas varia com o aumento da temperatura. Em nossas amostras, nas diferentes

temperaturas, observamos um decréscimo na viscosidade em função da temperatura.

Nas proteínas do cristalino, os aminoácidos mais sensíveis à oxidação são a cisteína, o triptofano, a tirosina, a metionina e a histidina, dependendo de sua localização na molécula de proteína (Andley & Clark, 1988).

Em nosso sistema, o decréscimo maior foi no triptofano, metionina, tirosina, histidina e cisteína. Esses resultados sugerem que o resíduo de triptofano é o mais afetado pela radiação, corroborando os dados da absorção no U.V. e aqueles obtidos por fluorimetria.

4- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- É possível a montagem de um sistema para o estudo da formação da catarata "in vitro" induzida pela radiação ionizante, a partir de soluções aquosas de proteínas extraídas do cristalino bovino.
- Os dados de absorção no U.V., análise de aminoácidos, fluorimetria e determinação de grupos SH livres, demonstram o envolvimento fundamental do triptofano, metionina, tirosina, histidina e cisteína na manifestação do efeito da radiação no sistema.
- Os valores encontrados na viscosimetria confirmam aqueles obtidos na turbidimetria das soluções de cristalino, indicando ser a formação de agregados o processo predominante induzido pela radiação.
- É possível utilizar este sistema experimental para estabelecer a capacidade radiomodificadora de substâncias tais como BSH, AET, MEA e DMSO, quando presentes durante a irradiação.

7- BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, P. and LETT, J.T. - Effects of ionizing radiations biological macromolecules. In Comprehensive Biochemistry - Photo - Biology, Ionizing Radiation (edited by M. Florkin and E. H. Stotz) pp. 267 -356, London, 1967.

ANDLEY, U. P. and CLARK, B.A. - Spectroscopic studies on the photooxidation of calf-lens gamma-crystallin. Current Eye Research, 7 (6): 571 - 579, 1988.

ANDLEY, U.P. and CHYLACK, L.T., Jr. - Conformational changes of bovine lens crystallins in a photodynamic system. Photochem. Photobiol., 44: 67 - 74, 1986.

ANDLEY, U.P., LIANG, J. N. and CHAKRABARTI, B. - Spectroscopic investigations of bovine lens crystallins. 2. Fluorescent probes for polar - apolar nature and sulphhydryl group accessibility. Biochemistry, 21: 1853 - 1858, 1982

ASHWOOD - SMITH, M.J. - The radioprotective action of dimethyl sulphoxide and various other sulphoxides. Int. Radiat. Biol., 3: 41 - 48, 1961.

DACQ, Z. M. and ALEXANDER, P. - Fundamentals of Radiobiology. New York, Pergamon Press, 1961.

BACO, Z. M. and GOUTIER, R. - Mechanisms of action of sulfur -
containing radioprotectors. Brookhaven Symp. Biol., 20: 241 -
262, 1967. ==

BENEDEK, G.B. - The molecular basis of cataract formation. In
Human Cataract Formation. pp. 237. Pitman, London, 1984.

BENEDETTI, L., DUNIA, I., RAMAEKERS, F. C. S. and KIBBELAAR, M.
A. - In Molecular and Cellular Biology of the Eye Lens. pp. 137,
New York, 1981.

BORKMAN, R., TASSIN, J. and LERMAN, S. - The rates of
photodestruction of tryptophan residues in human and bovine
ocular lens proteins. Exp. Eye Res., 32: 747 - 754, 1981
==

BRAAMS, R. - A mechanism for the direct action of ionizing
radiations. Nature, 200: 752 - 754, 1963.
====

BRADBURY, J.H. - Viscosity. In Physical Principles and
Techniques of Protein Chemistry (edited by S. J. Leach) part B,
pp. 100. Academic Press, New York and London, 1970.

BRAWN, K. and FRIDOVICH, I. - Superoxide radical and superoxide
dismutase: threat and defense. Acta Physiol. Scand., 492: 9-18,
1980. ==

BRESLER, S.E., NOSKIN, L.A., STEPANOVA, I. M. and KUZOVLEVA,
N.A. - Mechanism of radioprotection of chemical compounds on
"escherichia coli" cells. Mol. Gen. Genet., 163: 75 - 85, 1978.
=====

BROWN, D.O., PITTOCK, J.W. and RUBINSTEIN, J.S. - Early results of the screening program for radioprotectors. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 8: 565 - 570, 1982.
----- =

BROWN, P.E. - Mechanism of action of aminothio radioprotectors. Nature, 213: 363 - 364, 1967.
----- ==

BUXTON, G. V. - Basic radiation chemistry of liquid water. In Study fast processes transient species electron pulse radiolysis. New York, Plenum, pp. 241 - 266, 1982.

CHAPMAN, J.D. and REUVERS, A.P. - The time - scale of radioprotection in mammalian cells. Experientia, 27: 9 - 18.
----- ==
1977.

CHEN, R. F., EDELHOCH, H. and STEINER, R. F. - Fluorescence of Proteins. In Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry (edited by S.J. Leach) parte A, pp. 171. Academic Press, New York and London, 1969.

COGHLAN, S.D. and AUGUSTEYN, R.C. - Changes in the distribution of proteins in the aging human lenses. Exp. Eye Res., 25: 603 - 612, 1977.
----- ==

COPELAND, E.S. - Mechanisms of radioprotection - A review. Photochem. Photobiol., 28: 839 - 844, 1987.
----- ==

CZAPSKI, G. - Reaction of OH. Methods Enzymol., 105: 209 - 215, 1984.
----- ==

DAVIDSON, D. E., GREANAN, M.M. and SEENEY, T. R. - Biological characteristics of some improved radioprotectors. In Radiation Sensitizers: Their Use in the Clinical Management of Cancer (edited by L.W. Brady), pp. 309. Masson, New York, 1980.

DELAYE, M. and TARDJED, A. - Short range order of crystallin proteins accounts for eye lens transparency. Nature, 302: 415 - 417, 1983.

DEVINE, R.T. and CHAPU, R.L. - Low level effects. In Military Radiobiology (edited by J.J. Conklin and R.T. Walter), pp. 379 - 391, 1987.

DILLON, J. - Photoolytic changes in lens proteins. Curr. Eye Res., 3: 145 - 150, 1984.

DUNOVAN, J. W. - Ultraviolet Absorption. In Physical Principles and Techniques of Protein Chemistry. (edited by S. J. Leach) part A, pp. 102. Academic Press, New York and London, 1969.

DUNCAN, G., JACOB, J.J.C. - The lens as a physiochemical system. In The Eye (edited by Davson, H.) pp.159, Academic Press, 1984.

ELDJARN, L. and PIHL, A. - On the mode of action of x-ray protective agents. I. The fixation in vivo of cystamine and cysteamine to proteins. J.Biol. Chem., 225: 499 - 510, 1956.

FLLMAN, G.L. - Tissue sulphydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82: 70 - 77, 1959.
----- ==

EWING, G. W. - Métodos Instrumentais de Análises Químicas (edit. Edgard Blucher Ltda) vol. I, pp. 42, 1972.

FABRIKANT, J.I. - Radiobiology. Year Book Med. Publ. Chicago, Illinois, 1972.

GARRISON, W.M. - Reaction mechanism in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. Chem. Rev., 87: 381 - 398, 1987.
----- ==

GIAMBARRESEI, L. and JACOBBS, A. J. - Radioprotectants. In Military Radiobiology (edited By J.J. Conklin and R. J. Walks), pp. 265. Academic Press, Inc, London, 1987.

GIBLIN, F.J., ZIEGLER, J.S. and KINOSHITA, J.H. - Cross-linking of lens crystallins in a photodynamic system: a process mediated by singlet oxygen. Science, 202: 1278 - 1280, 1980.
----- ==

GROSH, D.S. and HOPWOOD, L.E. - Modifiable and Nonmodifiable Damage, Protective Measures, and Regeneration Processes. In Biological Effects of Radiations. Academic Press, Inc., New York, 1979.

HALL, E. J. - Chemical and Pharmacological Modifiers. In Radiobiology for the radiologist (edited by Harper and Roy), 2ª edição, 1978.

HIGH TOWER, K.R., GIBLIN, F. J. and REDDY, V. N. - Changes in the distribution of lens calcium during development of x-ray cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 24: 1183 - 1193, 1983.
----- ==

JEDZINIAK, J.A., KINOSHITA, J.H., YATES, E. M., HOCKER, L.O. and BENEDEK, G.B. - On the presence and mechanisms of formation of heavy molecular weight aggregates in human normal and cataractous lens. *Exp. Eye Res.*, 15: 185, 1973.
----- ==

JUNGUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. - *Orgãos dos Sentidos. Histologia Básica* (Editora Guanabara Koogan), pp. 497, 1982.

KABAT, E.A. - *Experimental Immunochimistry* (publisher by Charles C. Thomas), pp. 704, 1967.

KLAYMAN, D. L. and COPELAND, E.S. - Radioprotective Agents. In *Kirk - Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (edited by M. Grayson and D. Eckroth), vol. 19, pp. 801. Wiley, New York, 1982.

LAWRENCE, R.A. and BURK, R.F. - Species, tissues and subcellular distribution of non-selenium dependent glutathione peroxidase activity. *J.Nutr.*, 108: 211 - 215, 1978.
----- ==

LIANS, J.N. and CHAKRABARTI, B. - Spectroscopic investigations of bovine lens crystallins. 1. Circular dichroism and intrinsic fluorescence. *Biochemistry*, 21: 1847 - 1852, 1982.
----- ==

LIPMAN, R.M., TRIPATHI, B.J. and TRIPATHI, R.C. - Cataracts induced by microwave and ionizing radiation. Survey of Ophthalmology, 33 (3): 200 - 210, 1988.
=====

MAGEE, J.L. and CHATTERJEE, A. - A spur unfolding model for the radiolysis of the water. Radiat. Phys. Chem., 15: 125 - 132, 1960.
=====

MANSON, C.V. and HINES, M.C. - Alpha, beta and gamma crystallins in the ocular lens of rabbits: preparation and partial characterization. Invest. Ophthalmol., 5: 601, 1966.
=====

MEISTER, A. - Metabolism and functions of glutathione. Trends Biochem. Sci., 6: 231 - 234, 1981.
=====

MEISTER, A. and TATE, S.S. - Glutathione and related gamma glutamyl compounds: Biosynthesis and utilization. Annu. Rev. Biochem., 45: 559 - 604, 1976.
=====

MONEGHINI, R. - Cuidado com os radicais livres. Ciência Hoje, 18 (3): 8 - 10, 1987.
=====

MEROLA, L. O. and KINOSHITA, J.H. - The reactivity of the sulfhydryl groups in normal bovine lens. Amer. J. Ophthalmol., 44: 326, 1957.
=====

MILLER, G.L. - Protein determination for larger number of samples. Anal. Chem., 31: 964, 1959.
=====

DUCKEN, P. R., FU, S. C. J., HART, R., WHITE, J. H., WAGNER, B. J. and LEWIS, K. E. - Characterization of lens proteins. I. Identification of additional soluble fractions in rat lenses. *Exp. Eye Res.*, 24: 355, 1977.
----- ==

OHMORI, S. and NOSE, H. - Physical changes in bovine lens homogenate following ultraviolet irradiation and their prevention by some compounds. *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (6): 2432 - 2437, 1985.
----- ==

FRYOR, W.A. - Free radicals in biology. New York, Academic, vol. 3, 1977.

PTRAN, A. - Radiation protection by superoxide dismutase. *Photochem. Photobiol.*, 28: 765 - 774, 1978.
----- ==

REDDY, V.N., CHAKRAPANI, B., RATHBUN, W.B. and HOUGH, M.M. - Evidence for lens oxoprolinase, an enzyme of the gamma-glutamyl cycle. *Invest. Ophthalmol.*, 14: 228, 1975.
----- ==

ROY, D. and SPECTOR, A. - High molecular weight protein from human lenses. *Exp. Eye Res.*, 22: 273 - 279, 1976.
----- ==

SCIFTER, E., RETTURA, G., PADAWER, J., STRATFORD, F., GOODWIN, P. and LEVENSON, S. M. - Supplemental vitamin A and beta carotene reduce morbidity and mortality in mice subjected to partial or whole body irradiation. First Conference on Radioprotectors and Anticarcinogens, Abstract, pp. 62 - 63, 1982.

SIEZEN, R. J., CUPPIN, C.M., KAFLAN, E.D., DWYER, D. and THOMSON, J. A. - Oxidative modifications to crystallins induced in calf lens in vitro by hydrogen peroxide. Exp. Eye Res., 48: 225 - 235, 1989. ==

SINGH, A. and SINGH, H. - Time - scale and nature of radiation - biological damage: Approaches to radiation protection and post - irradiation therapy. Prog. Biophys. Mol. Biol., 39: 69 - 107, 1982. ==

SHAPIRA, R., DOHERTY, D. G. and BURNETT, W. T. Jr. - Chemical protection against ionizing radiation. Radiat. Res., 7: 22 - 34, 1957. =

SPECTOR, A., FREUND, I., LI, L. and AUGUSTEYN, R.C. - Age - dependense changes in the structure of alpha crystallin. Invest. Ophthalmol., 10: 677 - 696, 1971. ==

SPECTOR, A., LI, L. and SIEGELMAN, S. - Age - dependent changes in the molecular size of human lens proteins and their relationship to light scatter. Invest. Ophthalmol., 13: 795 - 806, 1974. ==

SPECTOR, A. - The search for a solution to senile cataract. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 25: 130 - 146, 1984. ==

SRINIVASAN, V., JACOBS, A. J., SIMPSON, S. A. and WEISS, J. F. - Radioprotection by vitamin E: effects on hepatic enzymes, delayed type hypersensitivity and postirradiation survival of

mice. In Modulation and Mediation of Cancer by Vitamins, pp. 119. Karger, Basel, 1983.

TORRIGLIA, A. and ZIGMAN, S. - The effect of near - UV light on Na-K-ATPase of the rat lens. Current Eye Research, 7 (6): 539 - 548, 1988.

WALKER, M. L. and BURKMAN, R. F. - Light scattering and photocrosslinking in the calf lens crystallins gama - II, III and IV. Exp. Eye Res., 48: 375 - 383, 1989.

YU, N.T. - Raman spectroscopy: a conformational probe in biochemistry. Crit. Rev. Biochem., 4: 229 - 280, 1977.

YUHAS, J. M. - Biological factors affecting the radioprotective efficiency of S - P - (3 - aminopropylamino) ethyl phosphorothioic acid (WR - 2721). LD50 (30) doses. Radiat. Res., 44: 621 - 628, 1970.

YUHAS, J. M., SPELLMAN, J. M. and GULO, F. - The role of WR - 2721 in radiotherapy and/or chemotherapy. In Radiation Sensitizers: Their Use in the Clinical Management of Cancer (edited by L. W. Brady), pp. 303. Masson, New York 1980.

ZIEBLER, J. S. Jr. and GUDSEY, J. D. - Photosensitizers oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens. Photochem. Photobio., 33: 869 - 874, 1981.