

VISCOSIMETRIA DE PROTEÍNAS DO CRISTALINO EM SOLUÇÃO SUB
METIDAS À IRRADIAÇÃO DE ^{60}Co

DULCILA MARIA LESSA BERNARDES
NÉLIDA LÚCIA DEL MASTRO
COORD. DE APLICAÇÕES NA ENGENHARIA E INDÚSTRIA
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

RESUMO

Com o intuito de estudar os efeitos da radiação gama de ^{60}Co nas proteínas, utilizou-se uma solução aquosa de cristalino bovino irradiada nas doses de 0 a 25.000Gy. Essa exposição resultou em alterações que foram avaliadas pelas mudanças da viscosidade na presença ou não de modificadores da resposta à radiação: glutatona (GSH), aminoetilisotiocarbato (AET), mercaptoetilalanina (MEA) e dimetil sulfoxido (DMSO). Os resultados da viscosimetria a diferentes temperaturas revelaram ser a formação de agregados, o processo predominante induzido pela radiação.

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 praticamente inevitável a irradiação da cavidade ocular.

Na catarata, o cristalino que normalmente é transparente torna-se opaco. 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 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.

Dos trabalhos realizados para elucidar as modificações produzidas pela radiação nas proteínas do cristalino sabe-se que elas são acompanhadas pela diminuição das proteínas solúveis de baixo peso molecular, pelo aumento das proteínas insolúveis e pela formação de agregados de proteínas de alto peso molecular (Spector et al, 1974; Roy & Spector, 1976; Coghlan & Augusteyn, 1979).

Em cristalinos humanos, os agregados aumentam com a idade 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 (Giblin et al, 1980) e do aumento intracelular da concentração de cálcio (High Tower et al, 1983).

Há fortes indicações de que os mecanismos de formação de catarata induzida pela radiação incluem a formação de radicais livres e consequentemente 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 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 sulfidrilícos e de triptofano.

Nosso trabalho tem por objetivo avaliar as modificações induzidas pela radiação nas proteínas de cristalino bovino utilizando a técnica de viscosimetria. Essas análises foram realizadas em diferentes temperaturas na presença ou não de substâncias radiomodificadoras.

MATERIAIS E MÉTODOS

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

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 25.000Gy, numa taxa de dose média de 851Gy/hora, em tubos de vidro.

As substâncias testadas neste sistema foram: glutatona (GSH), aminoetilisotiouréia (AET), mercaptoetilalanina (MEA) e dimetil sulfoxido (DMSO). Essas substâncias foram acrescentadas aproximadamente 10 minutos antes da irradiação, numa concentração final de 10mM.

Viscosimetria. Para medir a viscosidade utilizou-se um viscosímetro Brookfield de leitura digital, mod. DV-II, spindle SC4-18/13R a 12rpm, com adaptador para pequenas amostras, com banho termostaticado de -30°C a 130°C Neslab RTE-110 (Neslab Instruments Ltda Newington, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho procurou-se analisar os efeitos da radiação gama de ^{60}Co 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 através de viscosimetria

Na denaturação de proteínas pela radiação, 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 (Garrison, 1978). Esses agregados são produzidos por "crosslinking" covalente, mas sua natureza química é desconhecida.

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

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 a 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).

Pelos resultados apresentados na figura 1 observa-se que nas diferentes temperaturas, a viscosidade da amostra controle aumenta com o aumento da dose de radiação.

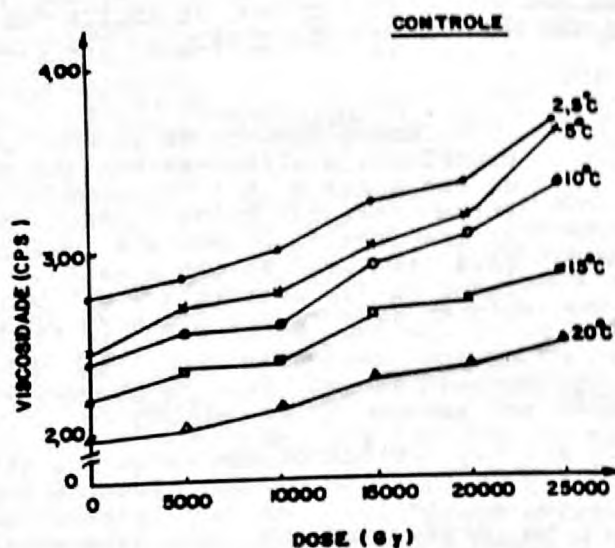


Figura 1 - Viscosidade (CPS) das amostras controle de cristalino bovino irradiadas em diferentes temperaturas.

As substâncias testadas em nosso sistema são consideradas "scavengers" de radicais hidroxila (OH \cdot). Esse radical reage com a maioria dos compostos orgânicos e é a maior espécie inativante em sistemas aquosos (Czapski, 1984). Os "scavengers" utilizados 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 endógeno, estando bem distribuída nas células, presentes nas concentrações de 0,5 a 10 micromol/g do peso úmido de vários tecidos animais. Nos cristalinos está presente numa concentração de 7 a 15 micromol/g de 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 (Meister, 1981).

Em nosso sistema pode-se observar que na amostra de cristalino bovino com GSH (figura 2) ocorre uma aparente proteção da formação de agregados observada pelos valores da viscosidade em função da dose de radiação.

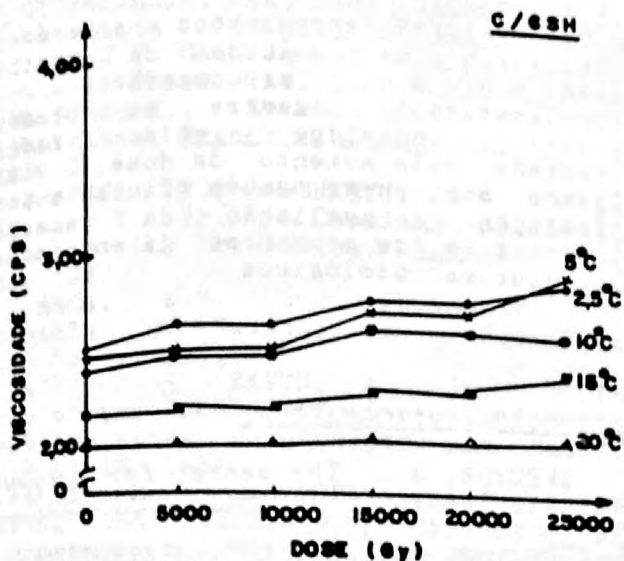


Figura 2 - Viscosidade (CPS) das amostras de cristalino bovino irradiadas na presença de glutatona em diferentes temperaturas.

O aminoetilisotiouréia (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, 1957).

Na figura 3 observa-se que na solução de proteína com AET a formação de agregados foi aparentemente protegida, isto é, houve inibição na formação de agregados de maior peso molecular.

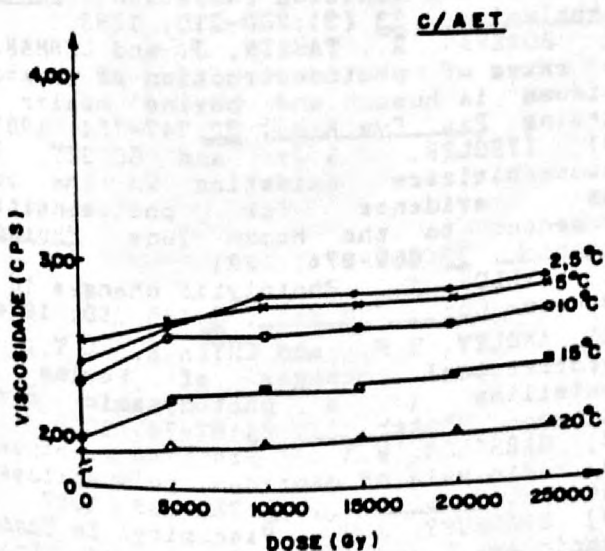


Figura 3 - Viscosidade (CPS) das amostras de cristalino bovino irradiadas na presença de aminoetilisotiouréia em diferentes temperaturas.

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 faz muitos anos é protótipo para testes de outros agentes radioprotetores (Bacq & Alexander, 1961; Giambarresi & Jacob, 1987).

A viscosidade das amostras de cristalino bovino com MEA (figura 4) demonstra que essa substância aparentemente protegeu a solução de proteína da formação de agregados.

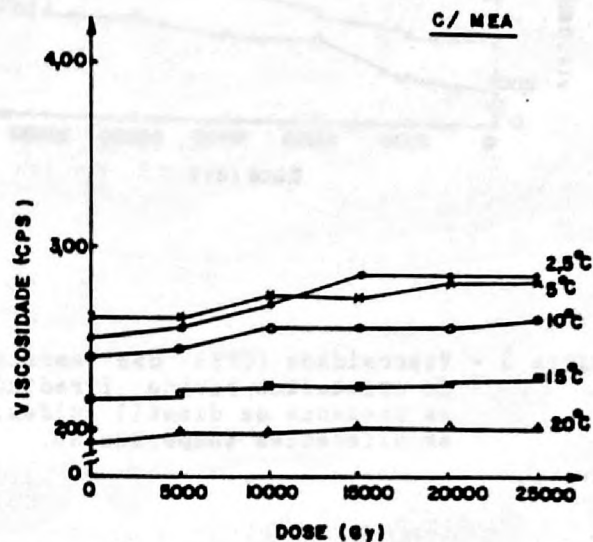


Figura 4 - Viscosidade (CPS) das amostras de cristalino bovino irradiadas na presença de mercaptoetilalanina em diferentes temperaturas.

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 irradiadas. Sua capacidade de radioproteção se deve a sua habilidade de inativar radicais livres, particularmente o OH \cdot . (Ashwood-Smith, 1961).

Na figura 5 observa-se que o DMSO protegeu a solução de proteína da formação de agregados.

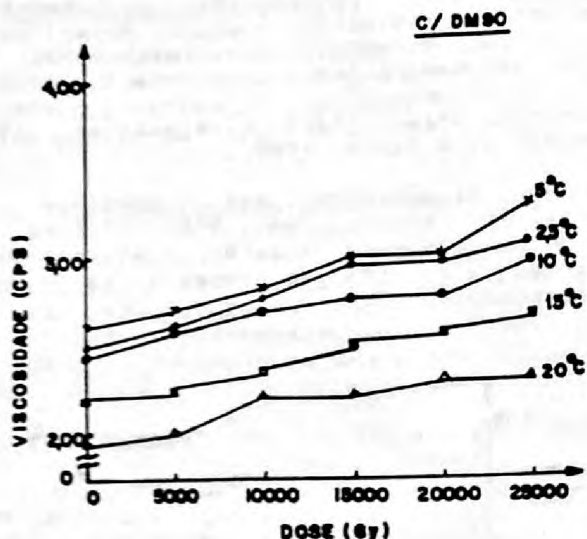


Figura 5 - Viscosidade (CPS) das amostras de cristalino bovino irradiadas na presença de dimetil sulfóxido em diferentes temperaturas.

Sabe-se que a viscosidade de proteínas varia com a temperatura. Em nossas amostras, nas diferentes temperaturas observamos um decréscimo na viscosidade em função da temperatura (tabela 1).

Tabela 1 - Diferença na viscosidade das amostras de cristalino bovino, nas diferentes temperaturas, entre 0 e 25.000Gy.

Temperatura	Controle	GHS	AET	MEA	DMSO
2.5	0,95	0,36	0,41	0,36	0,56
5	2,21	0,41	0,30	0,20	0,65
10	0,96	0,21	0,35	0,21	0,51
15	0,66	0,25	0,35	0,15	0,45
20	0,50	0,15	0,15	0,10	0,35

Segundo dados da literatura (Walker & Borkman, 1980) 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.

Os valores encontrados através da viscosimetria das soluções de cristalino indicam a predominância da radiopolimerização dentre os processos possíveis induzidos pela radiação manifestada pelo aumento da dose. O sistema utilizado mostrou-se também eficiente para a manifestação e avaliação da capacidade radioprotetora de compostos já ensaiados em outros sistemas biológicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] SPECTOR, A., The search for a solution to senile cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25:130-146, 1984.
- [2] SPECTOR, A., LI, L. and SIEGELMAN, S., Age - dependent changes in the molecular size of human lens protein and their relationship to light scatter. *Invest. Ophthalmol.*, 13:795-806, 1974.
- [3] ROY, D. and SPECTOR, A., High molecular weight protein from human lenses. *Exp. Eye Res.*, 22:273-279, 1976.
- [4] 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.
- [5] JEDZINIAK, J.A., KIMOSHITA, J.H., E.M., HOCKER, L.D. and BENEDEK, G.B., On the presence and mechanism of formation of heavy molecular weight aggregates in human normal and cataractous lens. *Exp. Eye Res.*, 15:185, 1973.
- [6] GIBLIN, F.J., ZIEGLER, J.S. and KIMOSHITA, J.H., Cross-linking of lens crystallins in a photodynamic system: a process mediated by singlet oxygen. *Science*, 208:1278-1280, 1980.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] BORKMAN, R., TASSIN, J. and LERMAN, S., The rates of photodestruction of tryptophan residues in human and bovine ocular lens proteins. *Exp. Eye Res.*, 22:747-754, 1981.
- [10] ZIEGLER, J.S.Jr. and GOOSEY, J.D., Photosensitizers oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens. *Photochem. Photobiol.*, 33:869-874, 1981.
- [11] DILLON, J., Photolytic changes in lens proteins. *Curr. Eye Res.*, 3:145-150, 1984.
- [12] ANDLEY, U.P. and CHYLACK, L.T., Jr., Conformational changes of bovine lens crystallins in a photodynamic system. *Photochem. Photobiol.*, 44:67-74, 1986.
- [13] GARRISON, W.M., Reaction mechanism in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. *Chem. Rev.*, 27:381-398, 1987.
- [14] 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.
- [15] KABAT, E.A., Experimental Immunochimistry (publisher by Charles C. Thomas), pp. 704, 1967.
- [16] CZAPSKI, G., Reaction of OH[•]. *Methods Enzymol.*, 105:209-215, 1984.

- [17] GIAMBARRESEI, L. and JACOBS, A.J., Radioprotectants. In Military Radiobiology (edited by J.J. Conklin and R.J. Walks), pp. 265. Academic Press, Inc. London, 1987.
- [18] MEISTER, A., Metabolism and functions of glutathione. Trends Biochem. Sci., 6:231-234, 1981.
- [19] SHAPIRA, R., DOHERTY, D. G. and BURNETT, W. T. Jr., Chemical protection against ionizing radiation. Radiat. Res., 7:22-34, 1957.
- [20] BACQ, Z.M. and ALEXANDER, P., Fundamentals of Radiobiology. New York, Pergamon Press, 1961.
- [21] ASHWOOD - SMITH, m. J., The radioprotective action of dimethyl sulphoxide and various other sulphoxides. Int. Radiat. Biol., 3:41-48, 1961.
- [22] WALKER, M. I. and BORKMAN, r.F., Light scattering and photocrosslinking in the calf lens crystallins gama - II, III and IV. Exp. Eye Res., 48:375-383, 1989.

SUMMARY

In order to study ^{60}Co radiation effects on proteins, an aqueous solution of bovine crystallins was irradiated with doses from 0 to 25,000 Gy. Changes in viscosity were followed whether in the presence or absence of radiation response modifiers: glutathione (GSH), aminoethylisothiouria (AET), mercaptoethylalanine (MEA) e dimethyl sulfoxide (DMSO). Viscosity data at different temperature revealed that aggregate formation was the predominant process induced by radiation. The results showed also that in presence of those substances the radiation effects was diminished.