

22 a 27 de abril de 1990

## ANAIS - PROCEEDINGS

ALTERAÇÕES NA OPACIDADE DE PROTEÍNAS DO CRISTALINO BOVINO IRRADIADAS COM  $^{60}\text{Co}$  "IN VITRO" NA PRESENÇA DE COMPOSTOS SULFONADOS

Dulcila Maria Lessa Bernardes  
Nélida Lúcia Del Mastro

Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas  
Divisão de Radiobiologia  
Comissão Nacional de Energia Nuclear-IPEN-CNEN/SP

## SUMÁRIO

Compostos sulfidrílicos com uma forte função básica separada do grupo SH por não mais do que 3 átomos de carbono, como o aminoethylisothiouréia (AET) e mercaptoethylalanina (MEA), são excepcionalmente efetivos em competir com radicais livres produzidos pela radiólise da água. De maneira similar, o dimethyl sulfóxido (DMSO) é também efetivo na remoção de radicais hidroxila. No presente trabalho foram utilizadas soluções aquosas de cristalinos removidos cirurgicamente de olhos bovinos. Os cristalinos foram homogeneizados, a suspensão centrifugada e o sobrenadante dialisado. Uma série de soluções preparadas a partir do sobrenadante foram irradiadas com  $^{60}\text{Co}$  em diferentes doses de 5,000 a 25,000 Gy, na presença de 10 mM de AET, MEA e DMSO. O grau de opacificação foi lido espectrofotometricamente à 600 nm. Os resultados mostraram uma diminuição do aumento da opacificação produzida pela radiação na presença desses "scavengers" de radicais livres, mostrando uma ação radioprotetora deles à nível molecular, que pode ser medida por esse método que imita a formação de catarata nas lentes dos olhos.

## ABSTRACT

Sulfydric compounds with a strong basic function separated from the SH group by no more than three C atoms, as aminoethylisothiouréia (AET) and mercaptoethylalanine (MEA) are exceptionally effective in competing with free radicals produced by water radiolysis. In a similar way, dimethylsulfoxide (DMSO) is also effective in the removal of hydroxyl radicals.

In the present work, aqueous solutions of crystallins removed surgically from bovine eyes were used. Crystallins were homogenized, the suspension centrifuged and the supernatant dialyzed. From the dialyzed supernatant a serie of solutions was prepared that was  $^{60}\text{Co}$  irradiated with different doses from 5,000 to 25,000 Gy in the presence of 10 mM AET, MEA and DMSO. The degree of opacification was read spectrophotometrically at 600 nm. The results pointed out a decrease of the increment of opacity produced by the radiation in the presence of those free radical scavengers, showing a radioprotective action of them at the molecular level, that can be measured by this method that mimics the catarat formation in eye lens.

## INTRODUÇÃO

Um dos efeitos colaterais da radioterapia de tumores de cabeça e pescoço, é a formação da catarata, pela inevitável irradiação da cavidade ocular. A catarata consiste na opacificação do cristalino, que é constituído de fibras de proteínas. Sua formação está relacionada a agentes físicos como luz solar, luz ultravioleta, raios-X e gama; a agentes químicos como galactose, naftaleno e glucocorticóides; e a efeitos bioquímicos como deficiências enzimáticas, algumas das quais são hereditárias (Augusteyn, 1981). É também consequência inexorável do processo de envelhecimento, tanto é assim que 50% das pessoas com idade acima de 75 anos, são portadoras de catarata. Na fase de formação da catarata, as proteínas do cristalino se desnaturam imediatamente abaixo da cápsula que recobre o cristalino; mais tarde, essas proteínas se coagulam para formar áreas opacas no lugar das fibras normais; em estágios mais avançados, o cálcio é frequentemente depositado nas proteínas coaguladas, aumentando ainda mais a opacidade (Guyton, 1976).

Muitos trabalhos têm sido feitos para elucidar as modificações nas proteínas do cristalino, produzidas pela radiação. Essas modificações são acompanhadas pela diminuição das proteínas solúveis com baixo peso molecular, pelo aumento das proteínas insolúveis e pela formação de agregados de proteínas com baixo peso molecular (Coghan e Augusteyn, 1977 ; Roy e Spector, 1976).

Em cristalinos humanos, os agregados de proteínas aumentam com a idade e estão presentes em altas concentrações na catarata senil (Jedzniak, Kinoshita, Yates, Hoker e Benedeck, 1975). A formação de agregados depende, também, da oxidação dos grupos -SH das proteínas do cristalino e do aumento intracelular da concentração de cálcio (High Tower, Giblin e Reddy, 1983).

Em radiobiologia, os estudos de maior interesse são aqueles que visam encontrar substâncias radioprotetoras. Essas substâncias devem estar presentes no momento da irradiação, para reduzir os efeitos da radiação nas moléculas (Straube e Patt, 1963). Os radioprotetores mais estudados são os aminotióis. Como grupo, eles são a classe mais efetiva de radioprotetores, muitos deles análogos químicos da cisteína e da mercaptoethylalanina (MEA) (Giambarresi e Jacobs, 1987).

O objetivo do presente trabalho, é mostrar a utilização de um sistema "in vitro", desenvolvido anteriormente por Bernardes e Del Mastro (1987). Este consiste na irradiação gama de  $^{60}\text{Co}$  de soluções aquosas preparadas a partir de cristalinos bovinos, como método de avaliação da capacidade radioprotetora de diversos agentes, baseado no trabalho de Ohmori e Nose (1985) no qual é utilizada a irradiação ultravioleta como agente cataratogênico.

As substâncias escolhidas para este estudo são agentes capazes do aprisionamento de radicais hidroxila ("OH $\cdot$  scavengers") que é considerado uma das espécies produzidas pela radiólise da água, mais nocivas aos sistemas biológicos (Buettnet,

1985; Czapsiki, 1984; Youngman, 1984).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Obtenção dos Cristalinos

Os cristalinos foram removidos cirurgicamente de olhos bovinos frescos, obtidos em abatedouro. Após a remoção, foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até a hora de sua utilização.

### Preparação da Solução Protéica

Após descongelar, os cristalinos foram descapsulados e cortados em pequenos pedaços, para facilitar a homogeneização.

Duas gramas desses cristalinos foram homogeneizados em 5 ml de água bidestilada a  $0^{\circ}\text{C}$ , em homogeneizador Potter - Elvehjem, durante no mínimo 30 minutos, em banho de gelo.

A solução foi centrifugada à  $20.000 \times g$  durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada.

Foi acrescentado ao sobrenadante N-etilmaleimide (Fluka, AG) numa concentração de 10 mM. A solução foi dialisada em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4), durante 18 horas.

Essa solução dialisada foi utilizada em diferentes experimentos:

- 1 $^{\circ}$  - foi irradiada logo após a diálise;
- 2 $^{\circ}$  - antes da irradiação, foram acrescentadas as seguintes substâncias numa concentração de 10 mM:
  - . 2-aminoetilisotiourêia      AET (Sigma)
  - . mercaptoetilalanina      MEA (Sigma)
  - . dimetil sulfóxido      DMSO (Merck)

### Irradiação das Amostras

Alíquotas do dialisado foram colocadas em tubos, aproximadamente 3 ml/tubo, para irradiar. A fonte utilizada na irradiação foi uma Gamma Cell 220, em doses respectivas de 0,5.000, 10.000, 15.000, 20.000 e 25.000 Gy.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A leitura espectrofotométrica das soluções protéicas preparadas a partir dos cristalinos bovinos, foi realizada à  $600 \text{ nm}$  2 a 3 horas após a irradiação.

Antes da irradiação, foi acrescentado à solução N-etilmaleimide numa concentração de 10 mM. Essa concentração foi a exigida para bloquear os grupamentos SH das proteínas do cristalino, segundo Ellman e Lysko (1967), já que esta substância possui a capacidade de formar ligações covalentes com a proteína, através da ligação com os grupos SH (Harris, 1988).

Na figura 1, tem-se uma curva típica da variação da opacidade das amostras em função da dose de radiação gama. Observamos que as amostras irradiadas tornam-se mais opacas à medida que a dose de irradiação aumenta. Isso se deve ao fato de que a radiação ao interagir direta ou indiretamente com as proteínas

do cristalino, torna-as mais susceptíveis à formação de ligações cruzadas ("cross-linking") inter e intra cadeias e a outras mudanças observadas também durante a formação da catarata (Andley, 1987).

As substâncias radiomodificadoras utilizadas AET, MEA e DMSO são consideradas radioprotetores verdadeiros. Na Fig.2, vemos que em nosso sistema, o efeito da radiação gama foi amenizado, quando essas substâncias estavam presentes durante a irradiação.

O AET e o MEA são aminotióis, substâncias com analogia química com a cisteína. Como grupo, os aminotióis são a classe mais efetiva de radioprotetores (Giambarresi e Jacobs, 1987). O aminoetilisotiouréia (AET) difere da cisteína pois possui um grupo uréia encobrendo a função SH. Sua eficiência depende de sua capacidade de rearranjo em pH fisiológico para formar o composto mercaptoetilguanidina (MEG), com o grupo SH livre (Shapira, Doherty e Burnett, 1957). Esse processo é chamado transguanilação.

A mercaptoetilalanina (MEA) é a forma descarboxilada da cisteína. É considerado um dos mais potentes radioprotetores. Pela sua eficiência e simplicidade estrutural, o MEA foi muito estudado e por muitos anos serviu como protótipo no teste de outros agentes radioprotetores (Bacq et al, 1951).

A ação radioprotetora do dimetil sulfoxido (DMSO) foi descoberta por acaso, por Ashwood-Smith (1961). Essa substância ao ser usada como solvente de drogas a serem injetadas em camundongos que seriam irradiados, apresentou uma ação radioprotetora. O DMSO possui propriedades anti-inflamatórias.

É fato conhecido que na radiólise da água, são produzidos os radicais livres  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}^\bullet$ ,  $\text{HO}_2^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , sendo  $\text{OH}^\bullet$  o mais reativo (Klayman e Copeland, 1982; Chapman e Reuvers, 1977).

As substâncias testadas em nosso sistema, AET, MEA e DMSO, são consideradas "scavengers" de radical hidroxila. O principal mecanismo de proteção supõe-se que seja a competição entre as moléculas protéicas alvo e os "scavengers", pelos radicais livres produzidos na solução (Giambarresi e Jacobs, 1987).

O radical hidroxila interagindo com as proteínas afeta a estrutura primária destas. Ele é adicionado ao núcleo aromático da tirosina, fenilalanina e triptofano, a velocidades controladas pela difusão ( $K = 4,6 \times 10^9 - 2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). A abstração de átomos de hidrogênio das ligações S-H é também muito rápida ( $K \sim 1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Consequentemente, é sugerido que os radicais  $\text{OH}^\bullet$  seriam eficientes inativadores de proteínas cujos resíduos essenciais fossem aminoácidos aromáticos ou grupos tióis. Entretanto, a adição a núcleos aromáticos ou a abstração de hidrogênio dos grupos S-H competem com a abstração de H das ligações C-H, que tem uma velocidade de reação  $K \sim 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Com base na abundância relativa de aminoácidos aromáticos, grupos S-H e ligações C-H nas proteínas, pode ser concluído que os radicais  $\text{OH}^\bullet$  reagiriam predominantemente com as ligações C-H, ou seja, considerando a alta reatividade do  $\text{OH}^\bullet$ , a molécula protéica como um todo seria afetada pela radiação.

No presente trabalho, é mostrada essa interação, mesmo sem elucidar qual processo seria o responsável pelo aumento da opacidade e, cabe supor, aumento do peso molecular das proteínas. O método descrito mostra-se contudo uma boa ferramenta para a determinação de competência radiomodificadora.

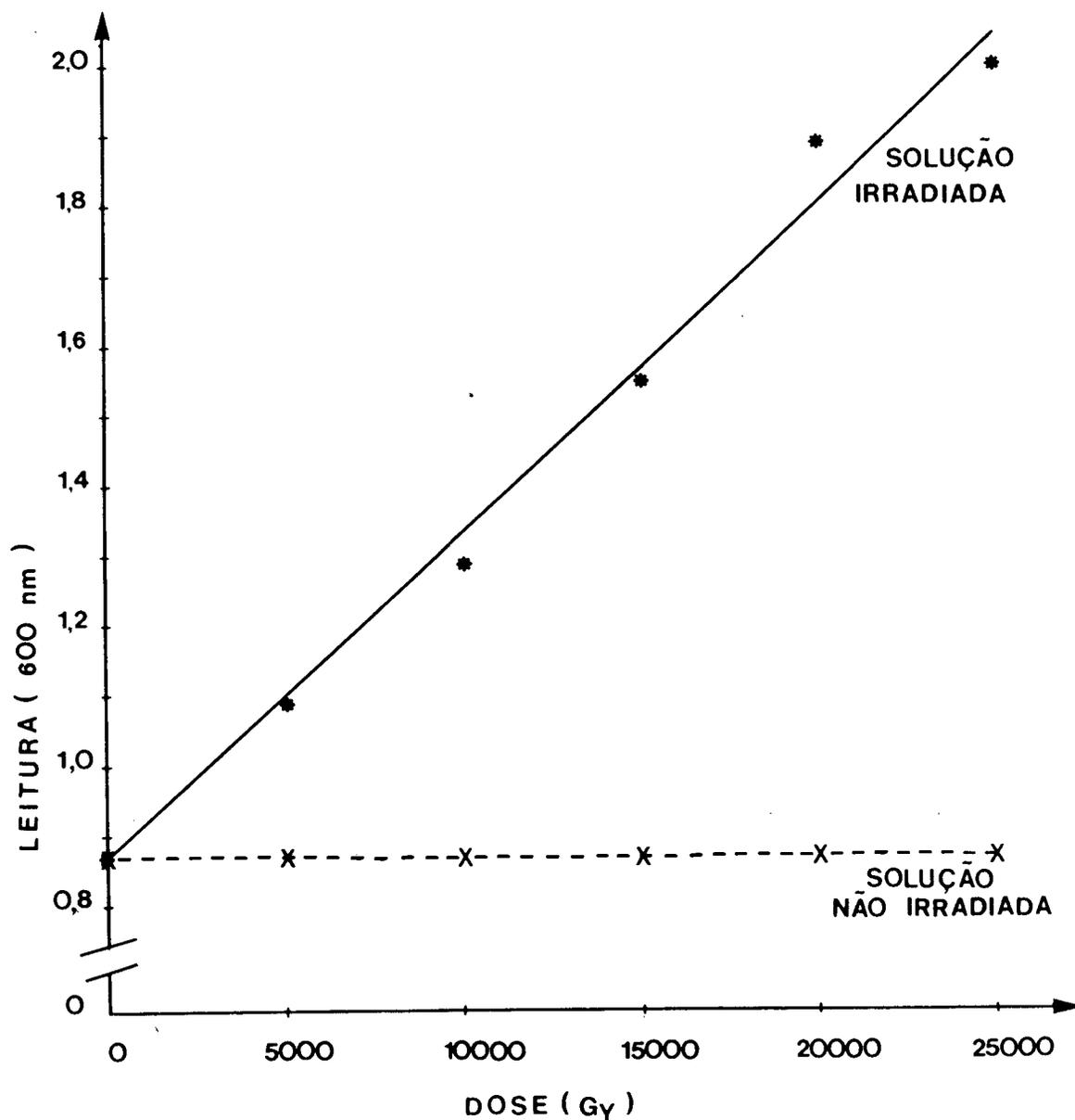
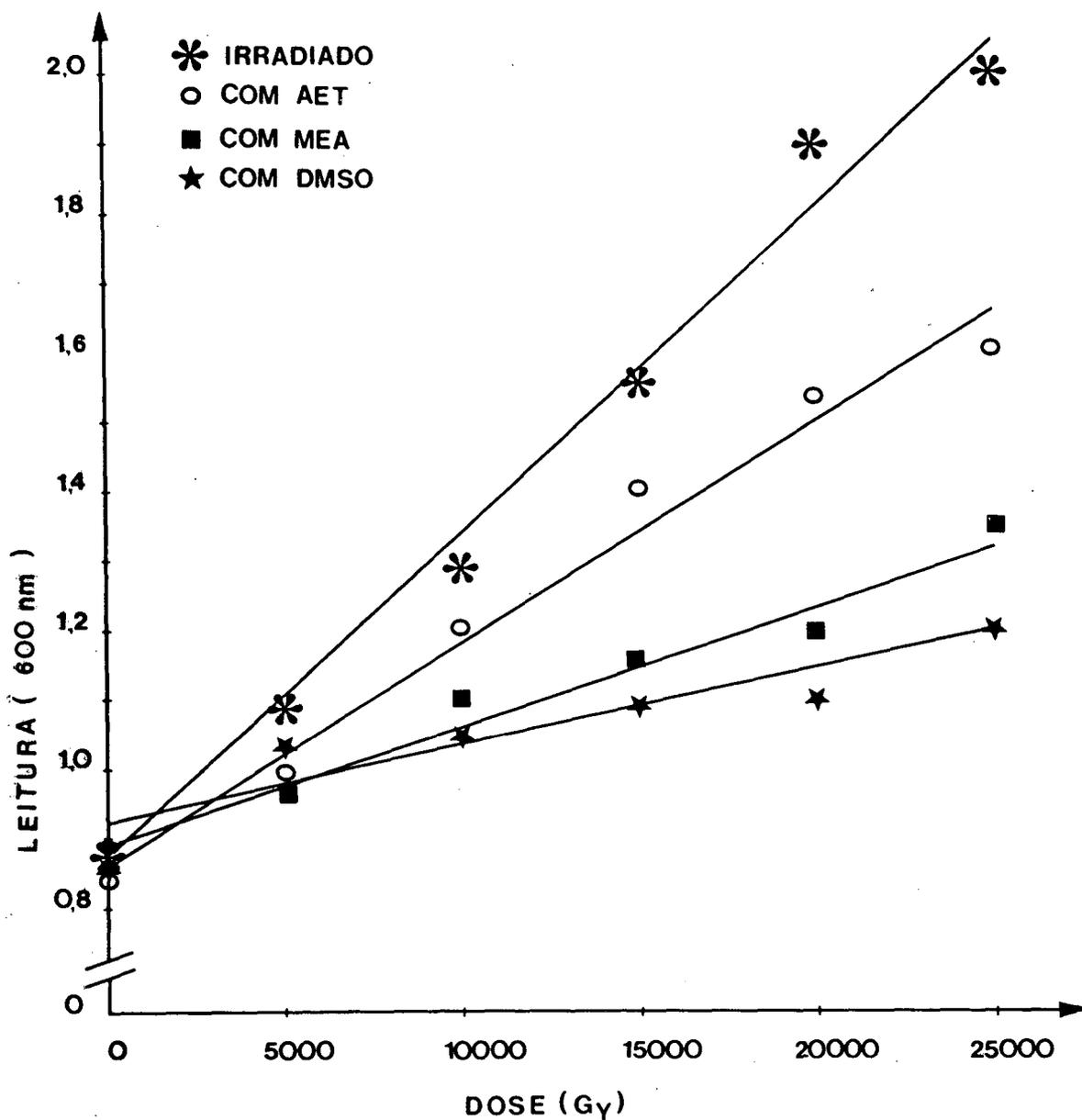


FIG. 1 - Curva típica da variação da opacidade de soluções de proteínas de cristalino bovino em função da dose de irradiação de  $^{60}\text{Co}$ .



**FIG.2** - Efeito radiomodificador de compostos "scavengers" de  $\text{OH}^\bullet$  medido pela alteração na curva de incremento da opacidade da solução proteica em função da dose de radiação de  $^{60}\text{Co}$ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ANDLEY, U.P. Photodamage to the eye. Photochemistry and Photobiology, 46(6):1057-1066, 1987.
- 2 - ASHWOOD-SMITH, M.J. The radioprotective action of dimethyl and various other sulphoxides. Int. J. Radiat. Biol., 3: 41-48, 1961.
- 3 - AUGUSTEIN, R.C. Mechanisms of cataract formation in human lens (G.DUNCAN, ed.), pp. 71-115. Academic Press, Inc., London, 1981.
- 4 - BACQ, Z.M., HERVÉ, A. LECONTE, J.FISCHER, P., BALVIER, J. DECHAMPS, G., LE BIHAN, H. and RAYET, P. Protection contre le rayonnement x par la mercaptoethylamina. Arch.Int. Physiol., 59:442, 1951.
- 5 - BERNARDES, D.M.L. e DEL MASTRO, N.L. Efeito da radiação gama nas proteínas do cristalino bovino "in vitro". Publicação IPEN 156. Julho, 1988.
- 6 - BUETTNER, G.R. Spin trapping of hydroxyl radical. In: Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (R.A. Greenwals, ed.), pp. 151-155. CRC Press., Boca Roton, Fl., 1985.
- 7 - CHAPMAN. J.D. and REUVERS, A.P. The time-scale of radio - protection in mammalian cells. Experientia, Suppl. 27:9-18, 1977.
- 8 - COGHLAN, S.D. and AUGUSTEIN; R.C. Changes in the distribution of proteins in the aging human lenses. Exp. Eye Res., 25:603-612, 1977.
- 9 - CUDINA, I. and JOVANOVIC, S.V. Free radical inactivation of trypsin. Radiat. Phys. Chem., 32 (3):497-501, 1988.
- 10 - CZAPSIKI, G. Reaction of OH<sup>•</sup>. Methods Enzymol., 105:209-215, 1984.
- 11 - ELLMAN, G.L. LYSKO, H. Disulfide and sulphydryl compounds in TCA extracts of human blood plasma. J. Lab. & Clin. Med. 70 (3):518-526, 1967.
- 12 - GIAMBARRESI, L. and JACOBS, A.J. Radioprotectants. In: Military Radiobiology (J.CONKLIN and R.I. WALKER, eds.), pp. 265-296. Academic Press., Inc., London, 1987.
- 13 - HARRIS, J.W. - Cellular thiols in radiation and drug response: use specific reagents-Radioprotectores and carcinogens (O.F. Nygaard and M. Simic, eds.) Academic Press, New York. 1988.

- 14 - 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.
- 15 - JEDZENIAK, J.A., KINOSHITA, J.H. YATES, E.M., HOCKER, L.O. and BENEDECK, G.B. The concentration and localization of heavy molecular weight aggregates in aging normal and cataractous lenses. Exp. Eyes., 20:367-369, 1975.
- 16 - KLAYMAN, D.L. and COPELAND, E.S. Radioprotective Agents. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology (M.Grayson and D. Eckroth, eds.), 3rd. ed., vol. 19, pp. 801-832. Willey, New York, 1982.
- 17 - 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.
- 18 - ROY, D. and SPECTOR, A. High molecular weigh protein human lenses. Exp. Eye Res., 22:273-279, 1976.
- 19 - SHAPIRA, R., DOHERTY, D.G. and BURNETT, W.T. Jr. Chemical protection against ionizing radiation. III. Mercaptoalkylguanidines and related isothiuronium compounds with protective activity. Radiat. Res., 7: 22-34, 1957.
- 20 - STRAUBE, R.L. and PATT, H.M. Chemical protection against ionizing radiation. Annu. Rev. Pharmacol., 3: 293-306, 1963.
- 21 - YOUNGMAN, R.J. Oxygen activation: is the hydroxyl radical always biologically relevant? Trends Biochem. Sci., 9: 280-283, 1984.