

BR 818759

ISSN 0101-3084

CNEN/SP

ipen *Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares*

**EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NAS PROTEÍNAS DE CRISTALINO
BOVINO "IN VITRO"**

Dulcila Maria Lessa Bernardes e Néida Lucia del Mastro

PUBLICAÇÃO IPEN 156

JULHO/1988

SÃO PAULO

**EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NAS PROTEÍNAS DE CRISTALINO BOVINO
"IN VITRO"**

Dulcila Maria Lessa Bernardes e Nélida Lucia del Mastro

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C 11.00

BIOLOGICAL RADIATION EFFECTS

CATARACTS

CRYSTALLINE LENS

GAMMA RADIATION

PROTEINS

TURBIDITY

IPEN - Doc - 3028

Aprovado para publicação em 25.09.87

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA NAS PROTEÍNAS DE CRISTALINO BOVINO "IN VITRO"

Dulcila Maria Lessa Bernardes & Nélida Lucia del Mastro

RESUMO

A radiosensibilidade das lentes oculares manifestada pela formação de cataratas, tem sido de considerável interesse para pesquisadores no estudo dos efeitos biológicos das radiações. A formação da catarata se dá por diferentes causas, e também pelo processo normal de envelhecimento. Neste trabalho o objetivo é desenvolver um sistema "in vitro", análogo à formação da catarata. É usada uma solução aquosa de cristalino bovino. Os cristalinos após remoção cirúrgica são homogeneizados mecânicamente e por ultrassom. Esta suspensão é centrifugada e o sobrenadante é dializado e irradiado com diferentes doses de ^{60}Co . A leitura do grau de opacificação é feita por espectrofotometria.

EFFECT OF GAMMA IRRADIATION ON IN VITRO BOVINE LENS PROTEINS

ABSTRACT

The radiosensitivity of the ocular lens manifested by cataract formation has been of considerable interest in the study on the biological effects of radiations. Cataract can be produced by different causes and also for the normal process of ageing. The aim of this work was to develop an in vitro system similar to in vivo cataract formation. It was used an aqueous solution of bovine lenses. The lenses after surgical removal mechanical and ultrasonic disrupted. The suspension was centrifuged and the supernatant was dialyzed and irradiated with different doses of ^{60}Co radiation. The opacification extent was measured in an spectrophotometer.

INTRODUÇÃO

Os efeitos biológicos das radiações têm sido objeto de muitos estudos, pois ao mesmo tempo em que são úteis na preservação de vida, podem causar danos que muitas vezes são irreversíveis. Isto se deve ao fato de que a radiação incidindo em um determinado sistema, atinge simultaneamente diver-

so outros que apresentam uma maior ou menor sensibilidade, podendo surgir diversos tipos de lesões. Uma dessas lesões é a catarata.

A formação da catarata se dá por diversos fatores, como por exemplo, por agentes físicos tais como luz UV, luz solar, raios-X e gama; agentes químicos como galactose, naftaleno e glucocorticóides; e por efeitos bioquímicos como deficiências enzimáticas, algumas das quais são hereditárias (1). É também consequência inexorável do processo de envelhecimento, tanto é assim, que 50% das pessoas com idade acima de 75 anos são portadoras deste mal.

Alguns trabalhos têm sido feitos para elucidar as modificações nas proteínas do cristalino, produzidas pelas radiações. As modificações são acompanhadas pela diminuição das proteínas solúveis com baixo peso molecular, um aumento das proteínas insolúveis é a formação de agregados de proteínas com alto peso molecular (4,18-20).

A formação de agregados de proteínas depende da oxidação dos grupos -SH dos cristalinos (7,8) ou do aumento da concentração intracelular de cálcio (10).

Estes estudos analisam a eficácia relativa biológica da radiação de diferentes LET (11,21), o efeito de uma única dose e fracionamento de doses de radiação (12). Também foi estudada a proteção do cristalino in vivo por substâncias químicas (9), e o efeito das espécies e do fator idade no desenvolvimento da catarata (2,13-14,21). Alguns experimentos sugerem certa diferença na radiosensibilidade entre cristalinos de animais jovens e adultos (6).

Este trabalho tem por objetivo estabelecer a curva dose-resposta do efeito da radiação gama de ^{60}Co , medindo a turbidância de soluções aquosas de proteínas de cristalino bovino. Esta metodologia será utilizada posteriormente para o desenvolvimento da padronização in vitro da capacidade radioprotetora ou radiosensibilizadora de substâncias presentes durante a irradiação.

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°C , até a hora de sua utilização.

- Preparação da solução protéica de cristalino:

Os cristalinos foram descapsulados e cortados em pequenos pedaços. Duas gramas desses cristalinos (cada um pesando aproximadamente 1 gr) foram homogeneizados em 5 ml de água a 0°C , em um homogeneizador Potter - Elvehjem, du

rante no mínimo 30 minutos em banho de gelo. A homogeneização foi feita, até que se obtivesse uma solução bem homogênea.

Esta solução foi centrifugada à 20.000 g durante 30 minutos, em centrífuga refrigerada. Foi adicionado ao sobrenadante N- e thymaleimide à uma concentração de 10 mM. Esta concentração foi o mínimo requerido para "mascarar" os grupos - SH, segundo o método de Ellman e Lysko (5).

Foi realizada a diálise desta solução em tampão fosfato de potássio 0.1 M, pH 7.4, durante 18 horas.

- Irradiação das Amostras

Alíquotas do dializado foram colocadas em tubos, aproximadamente 2 ml/tubo. A fonte utilizada na irradiação foi uma gamma Cell 220, com taxa de dose média de 1.14×10^3 Gy/h, em doses respectivas de 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 e 6000 Gy, sendo cada amostra irradiada em duplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A turbidância das soluções irradiadas foi medida à 600 nm (17). A figura 1 mostra que a turbidância das soluções irradiadas aumentou com o aumento da dose de radiação, enquanto que a amostra controle continuou clara, não se alterando. Contudo este aumento não é muito pronunciado até a dose ensaiada.

Paralelamente a isto, foi feito um estudo em que os cristalinos intactos foram irradiados nas doses acima citadas. Notou-se que, à medida em que as doses de irradiação foram aumentando, as lentes ficavam mais opacas e sua viscosidade aparente aumentava. Entretanto, após o fracionamento, não houve diferenças nas leituras espectrofotométricas.

Durante a formação da catarata, as proteínas do cristalino humano, em geral, mostram um aumento gradual dos níveis de agregação, pigmentação e fluorescência, e diminuição dos grupos - SH. Acredita-se que o aumento da opacidade das lentes oculares, seja produzido por um processo oxidativo, através da polimerização e/ou formação de ligações covalentes inter e intracadeias das moléculas de proteína. Este fenômeno tem sido mostrado também como causado ou acelerado por reações fotoquímicas em muitos experimentos "in vitro".

Trabalhos na literatura (3,16) mostram os resultados obtidos em experiências de irradiação "in vivo" em animais e em clínicas em pacientes submetidos à radioterapia de pescoço e crânio. Chamamos a atenção à enorme diferença de dose de radiação requerida para produzir efetivos visíveis quan-

do da irradiação "in vivo" e "in vitro". Com doses de 200 - 1150 rad(13) em pacientes em radioterapia, houve desenvolvimento da catarata, após a ir - radiação. No nosso caso, as doses utilizadas, 20.000 vezes superiores, mos - tram-se muito baixas para apresentar uma curva dose-resposta pronunciada , devendo futuramente continuar o desenvolvimento desta metodologia, em fai - xas mais altas de doses, onde as mudanças estruturais das moléculas protéi - cas possam ser melhor evidenciadas, mediante espectrofotometria.

Nosso trabalho descreve uma metodologia que pode ser de grande utilida - de para analisar os efeitos biológicos das radiações, ao nível das lentes o - culares e para a implementação de técnicas in vitro para o estudo da radios - sensibilidade de substâncias endógenas e produtos naturais.

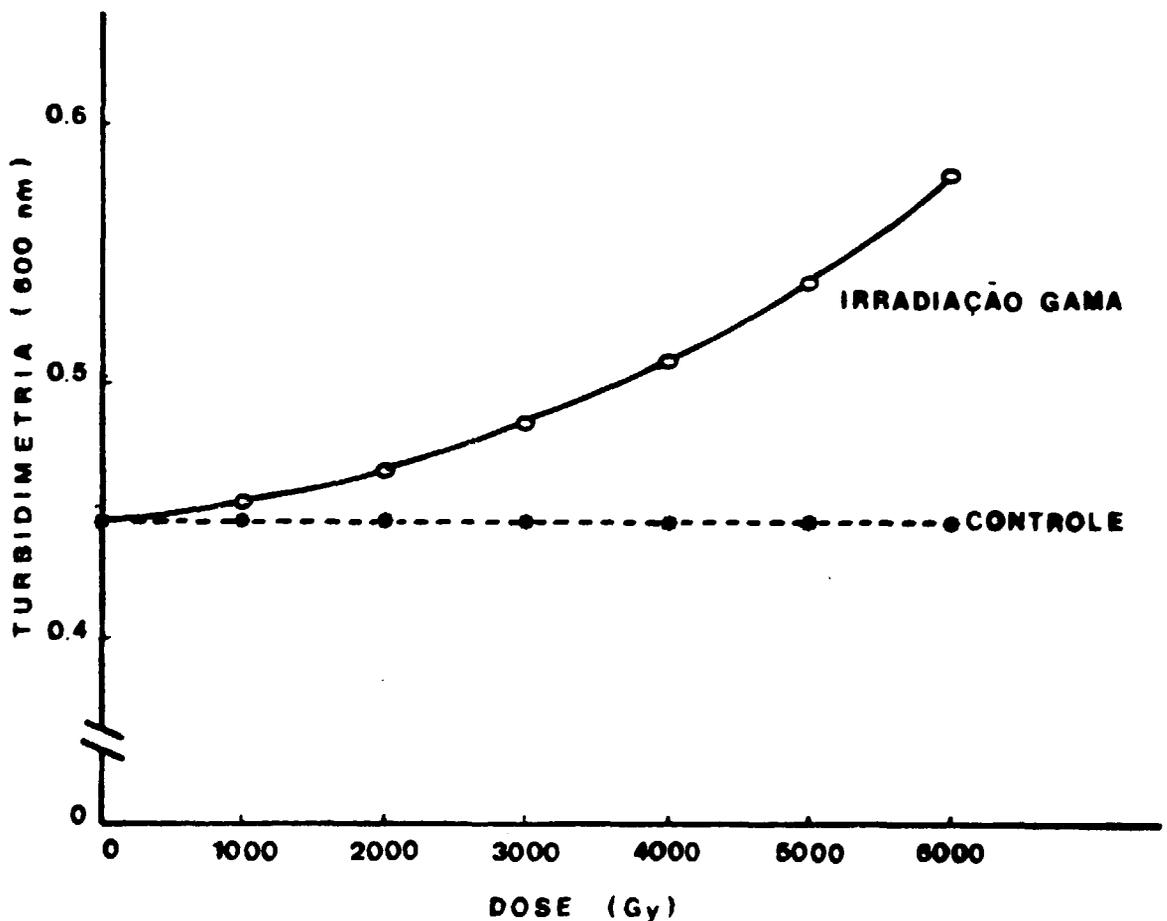


Figura 1 - Mudanças na turbidância de solução homogeneizada de cristalino sob irradiação gama.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BENEDICT, W.H. Development of x-ray induced lamellar cataract in the new born mouse in relation to age at time of irradiation. Trans. Am. Ophthalmol. Soc., 60: 373 - 407, 1962.
02. CHARLES, M.W. & BROWN, N. Dimensions of the human eye relevant to radiation protection. Phys. Med. Biol., 20 (2): 202 - 18, 1975.
03. COGHLAN, S.D. & AUGUSTEYN, R.C. Changes in the distribution of proteins in the aging human lenses. Exp. Eye Res., 25: 603 - 12, 1977.
04. ELLMAN, G.L. & LYKO, H. Disulfide and sulphhydryl compounds in TCA extracts of human blood and plasma. J. Lab. Clin. Med., 70: 518 - 26, 1967.
05. FROGÉ, P. Rechercher sur l'action des rayons sur l'Oeil. Paris, Ollier-Henry, 1922.
06. GIBLIN, F.J.; CHAKAPANI, B.; REDDY, V.N. High molecular aggregates in x-ray-induced cataract. Exp. Eye Res., 26: 507 - 19, 1978
07. GIBLIN, F.J.; ZIGLER, J.S.; KINOSHITA, J.H. Cross linking of lens crystallins in a photodynamic system: a process mediated by singlet oxygen. Science, 208: 1278 - 80, 1980.
08. HAGEMANN, R.F.; EVANS, T.C.; RILEY, E.F. Modification of radiation effect on the eye by topical application of dimethyl sulfoxide. Radiat. Res., 44: 368 - 78, 1970.
09. HIGH TOWER, K.R.; GIBLIN, F.J.; REDDY, V.N. Changes in the distribution of lens calcium during development of x-ray cataract. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 24: 1183 - 93, 1983.
10. LERMAN, S. Radiation caractogenesis. J. Med., 62: 3075 - 85, 1962.
11. MERRIAN JR., G.R. & FOCHT, E.F. A clinical and experimental study of single and divided doses of radiation on caract production. Trans. Am. Ophthalmol. Soc., 60: 36 - 52, 1962.

12. MERRIAN JR., G.R. & FOCHI, E.F. Radiation dose to the lens in treatment of tumors of the eye and adjacent structures: possibilities of cataract formation. Radiology, 71: 357 - 69, 1958.
13. MERRIAN JR., G.R. & SZECHTER, A. The effect of age on the radiosensitivity of rat lenses. Trans. Am. Ophthalmol. Soc., 71: 88-110, 1973.
14. MERRIAN JR., G.R. & SZECHTER, A. The relative radiosensitivity of rat lenses as a function of age. Radiat. Res., 62: 488-97, 1975.
15. NISHIO, F.; WEISS, J.N.; TANAKA, T.; CLARK, J.I.; GIBLIN, F.J.; REDDY, V.N.; BENEDEK, G.B. In vivo observation of lens protein diffusivity in normal and x-irradiated rabbit lenses. Exp. Eye Res., 39: 61 - 8, 1984.
16. OHMORI, S. & NOSE, H. Physical changes in bovine lens homogenate following ultraviolet irradiation and their prevention by some compounds. Chem. Pharm. Bull., 33 (6): 2432 - 7, 1985.
17. ROY, D. & SPECTOR, A. High molecular weight protein from human lenses. Exp. Eye Res., 22: 273 - 9, 1976.
18. SPECTOR, A.; FREUND, I.; LI, L.; AUGUSTEYN, R.C. Age dependent changes in the structure of alpha crystallin. Invest. Ophthalmol., 10: 677-86, 1971.
19. SPECTOR, A.; LI, L.; 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.
20. UPTON, A.C.; CHRISTENBERRY, K.W.; MELVILLE, J.F.; HURST, G.S. The relative biological effectiveness of neutrons, x-rays, and gamma rays for the production of lens opacities: observations on mice, rats, guinea pigs and rabbits. Radiology, 67: 636 - 96, 1956.