

BR8920878
INIS-BR--1607

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

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA CROTAMINA DO
VENENO DE *Crotalus durissus terrificus*

TÂNIA ALVES DA COSTA

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

Orientador: Dr. José Roberto Rogero

SÃO PAULO
1988

Este trabalho é dedicado

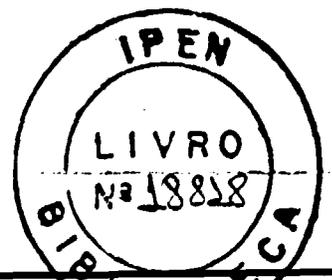
Aos meus pais

Pela dedicação constante, espírito
de renúncia e apoio em todos
os momentos

A minha eterna gradidão

A minha irmã Cris

Pelo carinho e incentivo que
sempre me deu fossem quais
fossem as circunstâncias



AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. José Roberto Rogero, por ter-me dado a oportunidade de realizar este trabalho
- Aos funcionários da CNEN/SP, especialmente: Eunice Oliveira de Lima e Maria Valdomira de Aguiar (Auxiliares de Laboratório); Cicero Florêncio dos Santos e Manoel Calixto Lopes da Silva (funcionários do biotério); Cláudia Feliciano da Silva (secretária); Gregório Lugo Postigo e Carlos Roberto Jorge Soares (funcionários da eletrônica); Maria Tereza Zavitoski Malavolta (bibliotecária) e Anésio da Silva (fotógrafo).
- A todos os colegas do departamento, especialmente (em ordem alfabética): Adir Janete Godoy dos Santos, Eliane Bernardes, Elizabeth Kinuyo Gimbo, Emerson Azevedo de Araujo, Irecélia Torres de Toledo e Souza, Isida Maria de Campos, Jaime José Gimenes, Ligia Ely M. F. Dias, Maria Glória Feig Ginabreda, Maria Helena Bellini, Marycel Elena Barbosa Figols, Olga Zazuko Higa e Paolo Bartolini.

Cada um teve um teve uma importância muito especial na minha vida durante esses dois últimos anos de convivência.... agradeço a todos pelo carinho e confiança da amizade oferecida e saibam que tudo valeu a pena por vocês!

Colaboraram para execução deste trabalho, concedendo auxílios e bolsas:

- Instituto Butantan

- CNPq

RESUMO

Radiações ionizantes são, suficientemente, energéticas e capazes de romper qualquer ligação química. As moléculas de substâncias presentes em solução tem mostrado tanto pela ação direta ou indireta das radiações ionizantes perda da atividade biológica. A crotamina obtida do veneno de *C.d. terrificus* por cromatografia de exclusão molecular foi irradiada em solução aquosa de 1 mg/ml por raios gama produzidos em uma fonte de cobalto-60. Doses de 100 Gy, 2000 Gy e 5000 Gy (Taxa de dose = $1,14 \times 10^3$ Gy/h) na presença de O_2 foram usadas para comparação das propriedades das amostras irradiadas e não irradiadas. Os seguintes ensaios foram realizados: determinação da concentração proteica, presença de grupos SH livres, SDS-PAGE e imunodifusão de Ouchterlony.

A reação de Ellman para grupos SH livres foi positiva na proteína irradiada e negativa na nativa. A concentração de proteína não foi alterada até a dose de 2000 Gy em relação a proteína nativa; na dose de 5000 Gy foi observado uma perda de 55% do material proteico. A análise de SDS-PAGE mostrou a formação de agregados proteicos na dose de 2000 Gy e 5000 Gy. Uma perda de atividade atigénica foi observada na dose de 2000 Gy e 5000 Gy contra o soro anticrotálico.

Estudos posteriores foram realizados com crotamina irradiada na dose de 2000 Gy em solução aquosa, ausência de O_2 e na presença de diferentes concentrações de radioprotetores tais como: cisteína, nitrato de sódio e tert-butanol. O nível de

radioproteção para a toxina foi estimada através da técnica de imunodifusão radial simples. De acordo com esta técnica o melhor agente radioprotetor foi a cisteína. Foi os determinantes antigênicos foram preservados e na análise de SDS-PAGE a estrutura da crotamina manteve-se íntegra como na toxina não-irradiada.

ABSTRACT

Ionizing radiations are sufficiently energetic and able to cleave any chemical bond. Molecules of substances present in solution have been shown either by direct or indirect action of ionizing radiations loss of biological activity. Crotonamine obtained from *C. d. terrificus* venom by molecular exclusion chromatography was irradiated in aqueous solution of 1 mg/ml by gamma rays produced on a ^{60}Co source. Doses of 100 Gy, 2000 Gy and 5000 Gy (dose rate = $1,14 \times 10^3$ Gy/h) in presence of O_2 were used for the comparison of properties of irradiated and non irradiated samples; the following assays were performed: determination of protein concentration, presence of free SH groups, SDS-PAGE and Duchterlony's immunodiffusion.

The Ellman's reaction for free SH groups was positive in the irradiated protein and negative one. The protein concentration was not altered up to the dose of 2000 Gy in relation to the native protein; at the dose of 5000 Gy was observed a loss of 55% of the proteic material. The SDS-PAGE analysis showed the formation of protein aggregates in the dose of 2000 Gy and 5000 Gy. A loss of the antigenic activity was observed both in the dose of 2000 Gy and 5000 Gy against sera anticrotalic.

Further studies was performed with crotonamine irradiated at the dose of 2000 Gy in aqueous solution, O_2 absence and in presence of different concentrations of radioprotectors such as: cystein, sodium nitrate and tert-butanol. The level of the

radioprotection to the toxin was estimated through the simple radical immunodiffusion technique. According to the technique the best radioprotective agent was cysteine. Since the antigenic determinants were preserved and in the SDS-PAGE analysis the crotoxin structure was maintained entire like the non irradiated toxin.

INDICE

Capitulo I - Introdução	
1 - Crotamina: Histórico.....	01
2 - Efeitos da Radiação em Sistemas Biológicos..	03
3 - Objetivos.....	47
Capitulo II - Materiais e Métodos	
1 - Materiais.....	49
2 - Métodos.....	53
Capitulo III - Resultados.....	59
Capitulo IV - Discussão.....	71
Referências Bibliográficas.....	76

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. Crotamina: Histórico

A cascavel sul-americana subordina-se ao género *Crotalus* e a espécie *durissus*. Reconhece-se hoje várias sub-espécies de *C. durissus* na América do Sul; tendo-se entre estas a *C. d. terrificus*. A peçonha desta cascavel encerra vários componentes farmacologicamente ativos, sendo a crotamina um destes.

A crotamina (23, 24, 43), toxina polipeptídica básica, peso molecular de 4880 daltons (62), é encontrada apenas na peçonha de cascavéis de certas regiões (90) (Argentina, Bolívia, Norte do Paraná e parte do Estado de São Paulo, no Brasil). Esta toxina proteica foi isolada pela primeira vez no veneno da cascavel *C. d. terrificus* (Argentina) por Gonçalves e Polson, em 1947 (42); posteriormente designada crotamina quando foi isolada no mesmo veneno da cascavel brasileira da região central e sul, por Gonçalves e Vieira, em 1950 (43); os quais mostraram se tratar de uma toxina capaz de produzir espasmos musculares em animais (camundongos, ratos, cães e cabras). Quando injetada intra-peritonealmente em camundongos provoca a contração seguida de contrações irregulares e espontâneas das patas posteriores, resultando na paralisia das mesmas. Estas observações demonstram que a fibra muscular é o alvo principal de ação da toxina.

A crotamina age nas membranas de fibras musculares, alterando sua permeabilidade ao sódio (78, 79). É pouco tóxica (23, 100) (DL 50, i.v., em camundongos: 1,50 (1,01 - 2,23) mg/kg, não desempenhando, segundo parece, papel algum ou, pelo menos de importância, na fisiopatologia do envenenamento crotálico no

2. Efeitos da Radiação em Sistemas Biológicos

Nesta secção alguns dos termos gerais e conceitos com relação à radiação e do dano da radiação a sistemas biológicos são revisados.

2.1. Tipos de Radiação

A tabela 1 apresenta uma lista de formas de radiação que consistem em partículas energéticas e de certos raios do espectro eletromagnético (cósmicos, raios gama e X) que são, comumente, designados como radiações ionizantes. Quando esses tipos de radiações penetram no tecido biológico (ou outra forma de matéria), alguns dos átomos neutros ao longo do percurso de penetração são convertidos à ions. No outro extremo do espectro eletromagnético estão microondas e ondas de rádio que são caracterizadas como radiações não-ionizantes. As ondas ultravioleta são intermediárias, e tanto sua frequência como seus efeitos biológicos, estão entre radiação-ionizante e não-ionizante.

Tabela 1: Alguns tipos de radiação

Tipos de Radiação	Fontes	I/NI*
Particulada:		
Elétron (partículas β^-)	decaimento radioativo	I
Pósitrons (partículas β^+)	decaimento radioativo	I
Prótons	Ciclotron; gerador Van de Graff	I
Neutron	fusão nuclear, Ciclotron	I

(Continuação da Tabela 1)

Núcleo de Hélio	decaimento radioativo	I
Núcleo de elementos pesados	acelerador de partículas	I
Eletromagnéticos (comprimento de Onda)		
raios cósmicos (5×10^3 nm)	estrelas	I
raios gama ($45 \times 10^{-4} - 1.4 \times 10^{-1}$ nm)	decaimento radioativo	I
raios X ($11 \times 10^{-2} - 10$ nm)	máquina de raio-X	I
ultravioleta (280-400 nm)	luz solar, fontes artif.	Int
microondas (0.3-300 cm)	rádio, televisão e outros transmissores, campos EM artif.	NI
ondas de rádio (> 0.3 cm)	comunicações: fontes cb-sônicas	NI

* I, Ionizante; NI, não ionizante; Int, Intermediária.

2.2. Modos de transferência de Energia

De um modo geral, a transferência de energia primária ocorre através da projeção ou excitação de elétrons presentes nos orbitais de átomos ao longo do percurso da radiação, apesar de alguma transferência ocorrer através da colisão direta com o núcleo desses átomos. O percurso de partículas de baixa-massa, tais como os elétrons, será irregular, pois estas partículas estão sujeitas à dispersão e deflexão por colisões com elétrons do meio.

2.2.1. Ionização: a passagem de uma partícula energética (ou um fóton) causa projeção de um elétron de um átomo, como resultado-criação de um par de íon positivo e negativo. Este é o principal meio pelo qual a energia da radiação ionizante (partícula ou eletromagnética) é transferida para tecidos bio-

lógicos. A água é a molécula da qual, mais, frequentemente, o elétron é expelido, devido á sua predominância na maioria dos tecidos biológicos. Os "radicais da água", que resultam, são os principais agentes que retransferem a energia da radiação absorvida para biomoléculas "alvo".

2.2.2. Excitação: em adição a ionização, uma fração significativa da energia de partículas energéticas ou de radiação eletromagnética é dissipada por excitação de elétrons. Neste processo, um elétron externo de um átomo alvo absorve energia suficiente para atingir um estado altamente energético mas permanece associado ao átomo.

2.2.3. Colisão: tanto raios X, raios γ , radiação ultravioleta e partículas carregadas interagem, principalmente, com átomos interceptados para projetar ou excitar elétron do orbital desses átomos, a energia da radiação do nêutron é absorvida, principalmente, pela colisão direta do núcleo, causando a projeção de fragmentos de desintegração (tais como nêutrons, prótons, ou partículas alfa) possibilitando a transferência da energia cinética da colisão de nêutrons. Em tecidos biológicos com sua predominância de átomos de hidrogênio, a produção de prótons de alta velocidade (núcleo de hidrogênio) é o resultado mais frequente dessas colisões. Desintegração nuclear pode também ser produzida

por fótons de alta energia. Fótons ou elétrons podem interagir com o núcleo alvo para produzir emissões de raio-X secundários.

2.2.4. Transferência indireta de energia: se a energia da radiação é, inicialmente, absorvida por ionização, excitação, ou colisão, a produção secundária de prótons livres, elétrons, íons, radicais livres ou fótons pode ocorrer quando a energia é retransferida para outros átomos ou moléculas. A desintegração do núcleo alvo que tornou-se instável devido à projeção ou absorção de partículas, também contribui para a produção secundária de íons pela liberação abundante de partículas energéticas.

Entre os produtos do processo de absorção de energia "radicais livres" são de significado particular. Um radical livre é um átomo com um único elétron do orbital desemparelhado, hidrogênio atômico sendo a exemplo mais simples. Um radical livre tem uma vida mais longa do que um par de íons e tem alta probabilidade de reagir com outro átomo, combinando seu elétron desemparelhado com um elétron de um outro átomo, ou pela liberação de um elétron desemparelhado a outro átomo, ou pela captura de um elétron de outro átomo. Cada uma dessas interações podem tornar a criar íons adicionais ou radicais livres. A maioria do dano da radiação a moléculas orgânicas,

está associada com tais cadeias de interações de radicais-livres secundários.

2.3. Variáveis Significativas

A natureza dos efeitos, que irão ocorrer quando radiações ionizantes penetram na matéria, depende de uma multiplicidade de variáveis. Algumas de maior significado são citadas abaixo.

2.3.1. Tipo de radiação: os resultados da interação entre radiação e o alvo serão influenciadas se a radiação é particulada ou não particulada, se for a anterior, pelo tamanho e carga da partícula energética. Por exemplo, devido aos nêutrons não serem lentos ou não serem defletidos pela carga negativa ou pela massa muito pequena dos elétrons encontrados, sua energia é mais provável de ser absorvida por colisões nucleares diretas. A energia de partículas menos carregadas como de raios γ , por outro lado, serão, grandemente, dissipadas na ionização ou excitação das interações, com elétrons dos orbitais. Interações de íons pesados de aceleradores de partículas serão influenciados tanto pela sua carga como pela sua massa. Quanto mais elevada a carga de uma partícula, mais frequentes serão suas interações e maior será a densidade de íons produzidos ao longo do percurso. Quanto maior a massa desta, mais lenta esta será

(a um dado nível de energia) e maior será a densidade de eventos ionizantes. A energia de massa-menor: ultravioleta, raio X e é transferida em colisões fótons/elétrons e o dano biológico produzido por esta radiação é devido quase que inteiramente à ação de radicais livres e ions produzidos.

2.3.2. Velocidade da partícula: a densidade de ions produzidos ao longo do percurso de uma partícula ionizante, é influenciada pela sua velocidade. Quanto mais lenta esta é, maior será o número de ions produzidos por milímetro do percurso. Por esta razão, a densidade de ionização aumenta continuamente ao longo do percurso de uma partícula, pois a partícula é gradualmente retardada pela aumento de transferência de energia. A produção mais abundante de ions ocorre apenas antes da partícula atingir o repouso.

2.3.3. Comprimento de onda: para radiação não-particulada, quanto maior sua energia (isto é, seu menor comprimento de onda), maior é o seu potencial para fortalecer o dano nos eventos de transferência de energia no alvo.

2.3.4. LET/RBE: Transferência de Energia Linear, ou LET, é uma medida da quantidade de energia liberada (por qualquer mecanismo) por micron do percurso de qualquer radiação ionizante e é um indicador do nível de destruição biológica a ser esperado. Dano

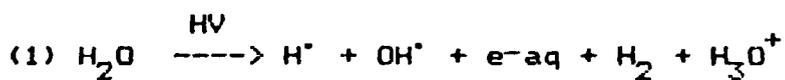
biológico é maior e a recuperação pós-irradiação é mais lenta ⁽⁷³⁾ para radiações de alto-LET do que para de baixo-LET. LET é determinado em parte pelas variáveis já mencionadas: este varia com o nível da energia cinética (velocidade e tamanho) e carga das partículas da radiação e com o comprimento (energia) da radiação eletromagnética. Desde que a velocidade da partícula diminui continuamente ao longo do percurso da partícula, LET também muda continuamente, aumentando quando a partícula torna-se lenta até cair abruptamente a zero, quando a partícula atinge o repouso. Devido ao LET variar para diferentes tipos de radiação, o efeito biológico é algumas vezes expresso em termos de eficiência biológica relativa (RBE), que é uma razão da destruição biológica da radiação em questão para uma radiação de referência (geralmente raios-gama).

2.3.5. Dose: Dano biológico de radiação ionizante aumenta com a dose (isto é, a quantidade da energia de radiação absorvida).

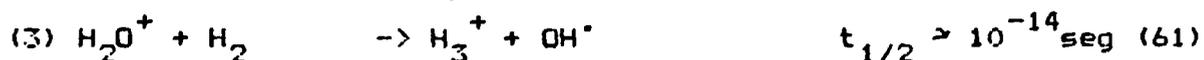
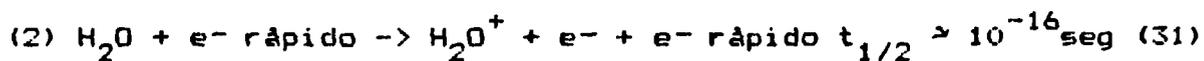
A dose absorvida mede a energia de qualquer tipo de radiação capaz de produzir ions, isto é, radiação ionizante, em qualquer material. A unidade antiga, rad (sigla de "radiation absorbed dose") equivale a 100 erg de energia depositada em uma grama de material ou ainda 0,01 joule de energia

A deposição de energia sobre as próprias moléculas alvo é referida como ação direta, já a deposição de energia no meio que as cercam, com subsequente transferência a alvos críticos, é referida como ação indireta.

A energia absorvida em uma mistura é distribuída aproximadamente na proporção da razão de massa de seus constituintes (60), isto é, em um sistema biológico as energias depositadas na parte orgânica (RH, R'RH) mais na parte inorgânica e na água poderia ser 25% e 75% do total, respectivamente. Isto leva a formação de espécies altamente reativas, as quais tem sido extensivamente estudadas (20, 34, 95), como segue:

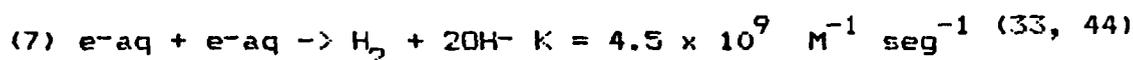


A deposição de energia não é uniforme em água radiolizada (66, 93). Aproximadamente 10^{-14} segundos após o pulso da radiação de alta energia, elétrons interagem com moléculas de água para produzir as espécies primárias da radiólise da água, de acordo com as equações 2-4.

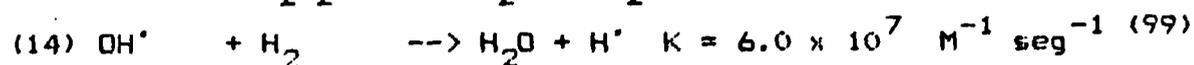
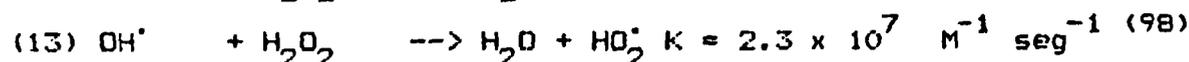
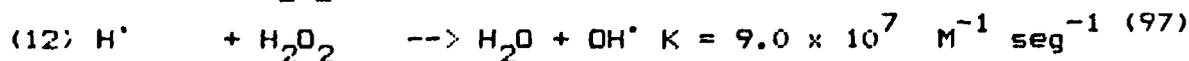
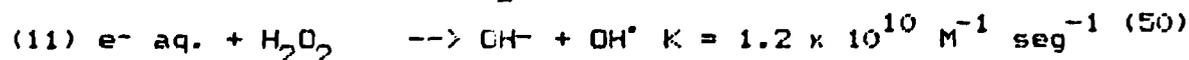


Esses produtos primários da radiólise da água são formados em regiões restritas pequenas conhecidas

como "spurs", de aproximadamente 2 nm de raio. O e^- aq. é formado fora do spur, entretanto a formação de H_3O^+ e OH^\cdot estão localizadas, inicialmente, no núcleo do "spur" numa esfera de ≈ 0.75 nm de raio. Essas espécies primárias sofrem reações nos "spur" entre 10^{-14} a 10^{-12} seg. pelas reações 5-8.

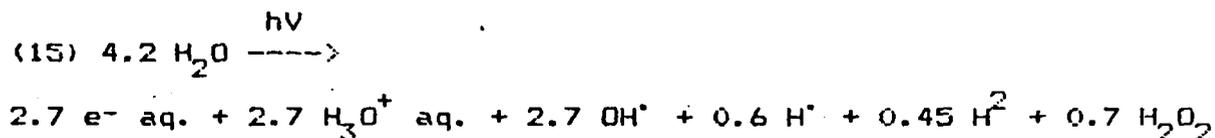


Quando o "spur" aumenta e os produtos começam a se difundir para fora, interagindo com o meio ao redor, eles sofrem reações com outros radicais, formando radicais e moléculas neutras como produtos (equações 9 - 14).



Dentro de 10^{-3} seg. do recebimento do pulso de radiação, as reações dos radicais livres primários estão

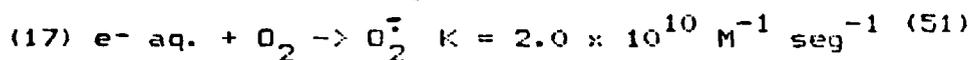
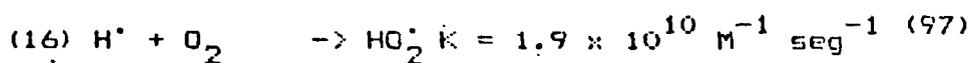
completas e uma solução homogênea de produtos de radiólise da água como mostrada na reação 1 está formada. O rendimento dessas espécies para 100 eV de energia absorvida (o valor G) é aproximadamente como é mostrada na reação 15 (21).



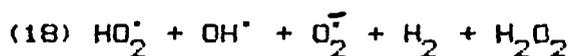
Dentro do "spur" em $< 10^{-12}$ seg. após a incidência da radiação a concentração de H^\bullet e $\text{e}^- \text{ aq.}$ pode atingir 10 e 100 mM, respectivamente (95); enquanto no núcleo do spur, H^\bullet e OH^\bullet podem ser formados em concentrações de aproximadamente 0.5 e 2M, respectivamente (34, 57, 56, 93). Como as dimensões do spur aumentam com o passar do tempo e os produtos de radiólise da água sofrem suas reações, as concentrações das espécies diminuem tanto que a 10^{-3} seg. uma solução homogênea é formada, com concentração de radicais que são em ordem de magnitude menores do que inicialmente formados ($< 10^{-12}$ seg.) no núcleo do spur na interação dos produtos de radiólise da água com oxigênio molecular.

O rendimento e a natureza das espécies moleculares e radicais formados na irradiação da água é influenciada em grande grau pela presença do oxigênio molecular (16). O oxigênio molecular tem alta afinidade por radicais redutores H^\bullet e $\text{e}^- \text{ aq.}$, formando radicais perhi-

droxil (eq. 16) e radicais ânion superóxido (eq. 17), respectivamente.



As proporções dessas reações são tão altas que em água saturada com oxigênio, poucos solutos competem, com o oxigênio. Então em 10^{-8} seg. após a irradiação, os produtos de radiólise em água oxigenada incluem:

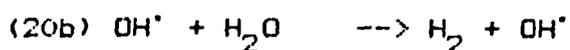
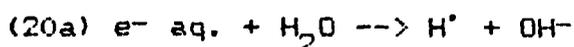


O oxigênio interage com o radical hidroxil somente em condições de pH extremamente alto, sob essas condições o íon ozonida O_3^- é formado.

As reações entre compostos orgânicos e produtos primários da radiólise da água tem sido estudado extensivamente. Sob condições de anóxia, reações do elétron hidratado e átomo de hidrogênio são importantes.

Reações entre os elétrons hidratados ($\text{e}^- \text{ aq.}$) e compostos orgânicos são, por definição, processos de transferência de elétrons. Desde que reações de transferência de um elétron com a maioria dos compostos orgânicos não produzem espécies estáveis, os produtos de reações primárias sofrem reações secundárias para gerar produtos estáveis. O elétron hidratado sofre reações de

adição com a maioria dos compostos orgânicos, dependendo da afinidade eletrônica e potenciais de redução deles (8,50). O átomo de H[•] participa em reações de adição a sítio de insaturação em compostos orgânicos, abstração de hidrogênio de compostos orgânicos e reações de transferência de carga com íons de metal (6,37). O radical hidroxil reage similarmente por abstração de hidrogênio, adição a sítios de insaturação e transferência de elétron (37). As reatividades do radical ânion superóxido (88) e do radical perhidroxil (12) tem sido revisadas. Em cada caso, as reações de espécies transitórias formadas da água (e oxigênio, se presente) envolve, uma competição entre reações de espécies do tipo radical com solutos orgânicos (eq. 19) e com água (eq. 20 a-c) e a proporção dessas reações dependerá do comprimento da ligação carbono-hidrogênio e da estabilidade dos radicais livres produzidos.

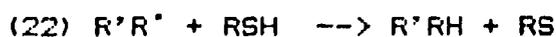
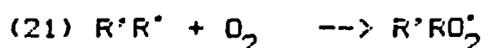


A importância relativa a efeitos diretos e indiretos na gênese do dano da radiação tem sido muito debatida. Entretanto esses efeitos são conceitualmente distintos, os limites práticos entre eles tem tornado-se

obscurecidos quanto mais é compreendido sobre a química da radiação na água. A diferença prática entre interação direta de uma molécula alvo com fótons ou elétron Compton (elétrons rápidos na equação 2) e a presença de uma molécula alvo muito próxima a um spur de radiólise da água, tendo concentrações muito altas de e^- aq. e OH^\bullet não é claro ⁽⁹⁶⁾. Além disso, os efeitos diretos da radiação nem sempre resultam em dano ao sítio de absorção de energia, como efeitos diretos podem também envolver processos de transferência de energia ^(15, 52).

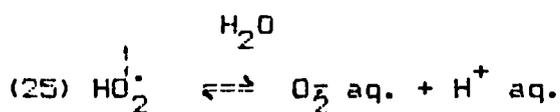
2.5. Efeito do Oxigênio

Radiobiologistas parecem atribuir ao efeito do oxigênio, principalmente, as duas seguintes reações de fixação-dano: a formação do radical peroxi (reação 21), que previne a regeneração da molécula original, eq. 21 e 22 e o sequestro de e^- , que previne a regeneração do substrato do cátion ⁽⁹⁵⁾ eq. 23 e 24.

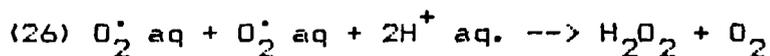


Esses dois efeitos ocorrem em uma curta escala de tempo (< 10 ms), sendo que nesse período de tempo, efeitos danosos de O_2^\bullet aq. ⁽⁹⁵⁾ poderiam também contribuir

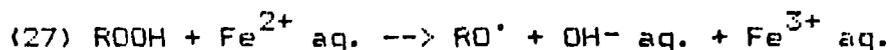
para o efeito do oxigênio. Na presença de oxigênio, uma provável porção de e^- aq. e H (> 50%) poderia dar O_2^- aq. Por causa da baixa reatividade de O_2^- aq. há alguma controvérsia sobre sua toxicidade ⁽⁹⁵⁾. Mais pesquisas serão necessárias para avaliar sua contribuição no efeito do oxigênio. As reações de dano da H_2O_2 ⁽⁹⁵⁾ poderiam também contribuir para o efeito do oxigênio. O e^- aq. e H são convertidos em O_2^- aq. (reações 17 e 25).



Em resposta, O_2^- aq. formará H_2O_2 via reação 26.



Os peróxidos orgânicos e hidroperóxidos formados na presença de oxigênio poderiam contribuir também para o efeito do oxigênio através da produção de radicais alcóxi (reações 27 e 28), radicais hidroxil (reação 29) e compostos carbonil tóxicos ⁽⁹⁵⁾.



As contribuições de H_2O_2 , ROOH, ROOR e compostos carbonil poderiam estar presentes no período pós-irradiação.

O dano químico por radiações de alta energia não é limitado a quebra da ligação C-H (a qual pode ser reparada por protetor químico que são doadores de H) ou ao dano por O_2^- aq. (que pode ser evitado pela desmutase superóxido). As espécies metaestáveis formadas, por exemplo, peróxido de hidrogênio e hidroperóxido orgânico são as fontes mais prováveis do dano no período pós-irradiação. A toxicidade da maioria dos produtos estáveis, provavelmente, também contribui para o dano radiobiológico. Um breve perfil da complexidade das consequências químicas (e bioquímicas) do dano da radiação é dado abaixo.

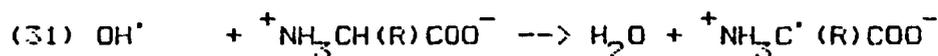
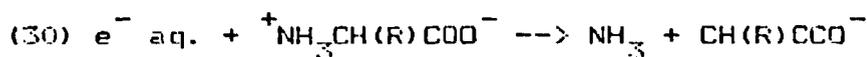
2.6. Mecanismos de Reação na Radiação de Proteínas

Estudos da ação química de radiações ionizantes na cadeia principal peptídica, envolveram estudos anteriores da química dos mais simples α -aminoácidos como monômeros, tanto em sistemas aquosos e no estado sólido.

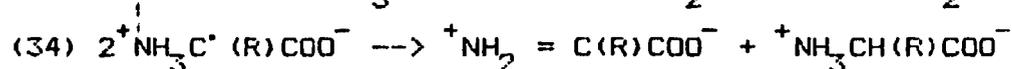
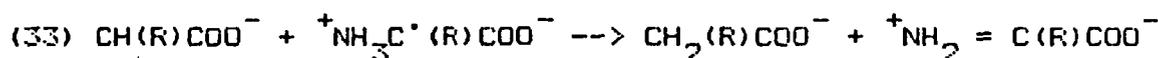
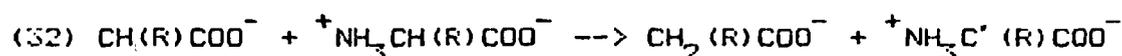
Danos químicos em soluções aquosas diluídas são iniciados pela decomposição da água induzida pela radiação ⁽⁴¹⁾ citados na equação 1. Para raios γ e elétrons rápidos os rendimentos dos produtos em radical correspondem a $G(OH) = 2.8$, $G(e^-) \approx 2.7$, $G(H) \approx 0.55$. As reações da maioria dos radicais e^- aq. e OH com aminoácidos glicina e alanina em solução livre de oxigênio produzem amônia, cetoácido e ácido graxo como produtos principais ⁽⁴¹⁾.

Estudos químicos detalhados desses sistemas

incluindo o uso de solutos secundários para o sequestro preferencial de e^- aq. e OH^- levaram à identificação dos principais modelos de reação (41).

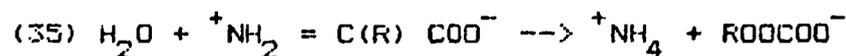


Reações subsequentes incluem:

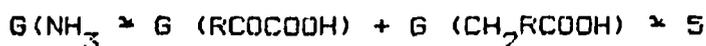


Uma pequena fração de radicais ${}^+NH_3C'(R)COO^-$ sofrem dimerização para produzir o ácido α, α' -diamino-succinico.

O derivado lábil ácido imino produzido nas reações 33 e 34 de desprotonação, hidrolisa-se espontaneamente.



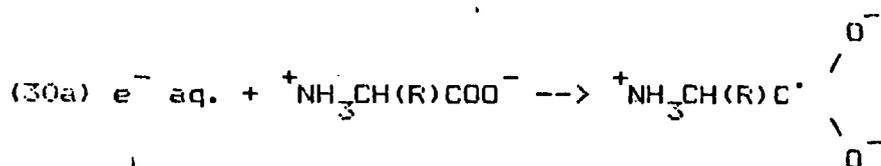
Toda a estequiometria das reações 30-35 dá:



que corresponde a valores muito próximos dos observados experimentalmente (41).

Na extensão desses estudos (41) verifica-se que

aminoácidos tais como β -alanina e ϵ -aminocaprônico não sofrem deaminação redutiva (reação 30). E foi concluído que e^- aq. adiciona-se a ligação C = O de α -aminoácidos mais simples.



e que o radical ânion intermediário se dissocia



Se há mais do que uma unidade de carbono entre grupos amino e grupos carbonil, deaminação redutiva não ocorre.

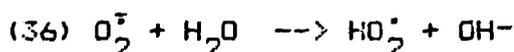
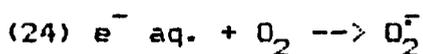
A deaminação redutiva de α -aminoácidos via reação 30 foi logo confirmada por várias observações adicionais. Os radicais livres transitórios da reação 30, ${}^{\cdot}\text{CH(R)COO}^-$, foram observados diretamente em estudos do pulso de radiólise de um certo número de sistemas aquosos de aminoácidos.

Com os α -aminoácidos alifáticos de maior peso molecular, isto é, com α -aminobutírico, valina, leucina,

etc; a reação de deaminação redutiva (reação 30) continua a representar a principal via de remoção de e^- aq. Entretanto, com o aumento da cadeia lateral alifática, o ataque do OH via reação 31 não é mais confinado a ligação C-H do carbono α , outras ligações C-H ao longo da cadeia lateral também serão envolvidas. Com os α -aminoácidos insaturados tais como fenilalanina, tirosina e histidina, a cadeia lateral representa o principal locus de competição para reação tanto de e^- aq. e OH^- (41).

Com o aminoácido cisteína, as reações de e^- aq. e OH ocorrem exclusivamente na função SH (41).

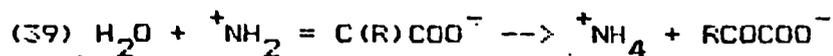
A presença de O_2 dissolvido em uma concentração relativamente alta resulta no bloqueio da deaminação redutiva (reação 30) desde que o elétron hidratado, e^- aq., é sequestrado preferencialmente para produzir o radical hidroperoxil, HO_2^\cdot .



A reação do OH não é inibida por O_2 e no caso de glicina e alanina, os radicais do carbono $^+NH_3C^\cdot(R)COO^-$ formados na reação 31 reagem com O_2 para produzir HO_2^\cdot e ácido imino lábel.



com hidrólise espontânea para dar amônia e cetoácidos.

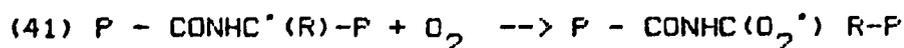


A formação do radical hidroperóxil (HO_2 ; O_2^{\cdot}) via reação 38 tem sido observado em estudos do pulso de radiólise de soluções aquosas de glicina ⁽⁴¹⁾. O produto estequiometricamente, na solução oxigenada, está aproximado por $G(\text{NH}_3) \approx G(\text{carbonil}) \approx G(\text{OH}) \approx 3$ ⁽⁴¹⁾. O rendimento da deaminação oxidativa diminui com o aumento do comprimento da cadeia lateral alifática. Com norleucina, ${}^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3)\text{COO}^-$, somente uma pequena fração de radicais OH são removidos através da abstração de H na posição do carbono α para dar $G(\text{NH}_3) \approx 0.3$.

2.6.1. Química na Cadeia Principal de Proteínas

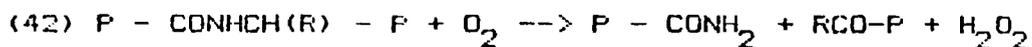
2.6.1. a - Solução aquosa oxigenada

Acredita-se que as reações de OH nas posições C-H ao longo cadeia principal da proteína levam à degradação oxidativa via:



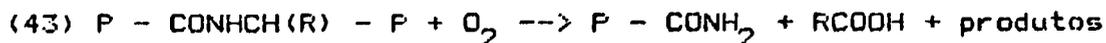
que em reações subsequentes irão produzir as funções amida e cetoácidos. Toda a química desta sequência de reações é, estequiometricamente,

equivalente a seguinte reação:



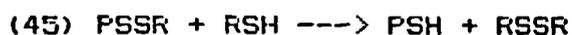
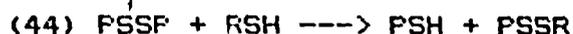
O ataque de OH via reação 40 foi verificado como ocorrência de competição do ataque OH à cadeia lateral, com o rendimento de degradação da cadeia principal sendo afetado tanto pela composição de aminoácidos como pelas características conformacionais da proteína.

Os produtos cetoácidos incluem glioxílico, pirúvico, fenilpirúvico, α -cetoglutárico, oxalacético mais traços de outros α -cetoácidos não identificados para dar um rendimento combinado de G (> CO) \approx 0.9. O rendimento combinado de amida é, apreciavelmente maior com G (amida) \approx 1.25. Estudos mais detalhados com peptídeo ⁽⁴¹⁾ mostram que a diferença entre G (> CO) e G (amida), aumenta em parte, do fato de uma química secundária (paralela) está envolvida na degradação radiolítica da cadeia principal da proteína ⁽⁴¹⁾. Este segundo modo de degradação produz a função amida e produtos orgânicos de maior oxidação.



A separação e isolamento de fragmentos de proteínas formados pela quebra da cadeia-principal na radiólise-X de ribonuclease (RNase), soroalbumina bovina (BSA) e desidrogenase lactase (LDH) em soluções oxigenadas tem sido recentemente atingida (41).

Os fragmentos da proteína tornam-se aparentes somente depois da redução das ligações S-S nas proteínas irradiadas com mercaptoetanol (RSH).



em meio aquoso com dodecil sulfato de sódio, SDS. A separação foi atingida por uma combinação de gel filtração e gel de eletroforese. O rendimento observado da fragmentação (valor G) para RNase, BSA e LDH são 0.19, 0.3 e 0.1, respectivamente. Em proteínas como LDH, que contém grande quantidade de aminoácidos insaturados e aminoácidos contendo enxofre, poderia ser esperado menor rendimento de fragmentação da cadeia-principal. Esses valores podiam ser um tanto baixos como uma medida do ataque do radical OH a cadeia principal nestes sistemas. A hidrólise ácida suave anterior aos passos de filtração e eletroforese poderia resultar em rendimentos de fragmentação um tanto

maiores do que aqueles relatados.

Estudos de pulso de radiólise e espectroscopia cinética tem também demonstrado evidências para reações de OH na cadeia principal da proteína. O radical $\text{CONHC}^*(\text{R})$ em peptídeos tem mostrado uma forte banda de absorção em 250 nm com alto coeficiente de extinção (41).

Estudos do espectro de absorção produzidos pelo ataque OH na papaina e na ribonuclease (41) sugerem que 20-30% de radicais OH gerado nesses sistemas reagem nas posições C-H ao longo da cadeia principal da proteína.

Estudos combinados de gel filtração e ultracentrifugação de proteínas irradiadas em soluções oxigenadas tem mostrado a presença (antes da redução com RSH) de monômeros alterados conformacionalmente com um menor conteúdo de α -hélice do que na proteína "nativa" (41). Esta denaturação da estrutura proteica induzida pela radiação é observada em solução oxigenada e tem sido demonstrada em um certo número de sistemas protéicos por medidas de alterações através da dispersão óptica rotatória e fluorescência do triptofano (41). Esses autores tem sugerido que esta destruição induzida pela radiação da hélice de proteínas em solução oxigenada aparece devido a mudanças químicas em sítios da cadeia lateral. Isto poderia

significar que quebras oxidativas da cadeia principal via reações 41 e 42 (as quais ocorrem em paralelo com mudanças oxidativas em sítios da cadeia lateral) poderiam ser também um importante fator na desestabilização da estrutura da α -hêlice de proteínas irradiadas em soluções oxigenadas.

2.6.1. b - Solução aquosa livre de oxigênio

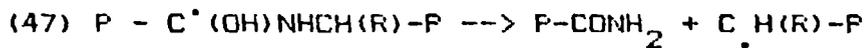
Vários tipos de evidências indicam que a adição de e^- aq. ao carbonil peptídico de proteínas em solução livre de oxigênio



ocorre na competição com adição de e^- aq. a ligação dissulfeto da cistina e resíduo histidina protonado. Por exemplo, estudos do pulso de radiólise de papaína indicam que a reação 46 representa a principal via de remoção de e^- aq. nesse sistema, sendo este atraído, predominantemente, à cistina da ligação dissulfeto e a resíduos de histidina (41). Por outro lado, com lisozima e tripsina o e^- aq. é, preferencialmente, atraído para resíduos de cistina (41).

Estudos recentes de reações de e^- aq. com proteínas de cromossomos, histomas H1 e protamina

(compostos de poliglicina, poliarginina e polialanina) indicam que a reação 47 de dissociação representa a consequência química principal de



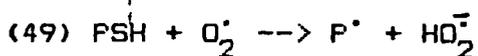
adição de e^- aq. ao carbonilpeptídico de histamina H1 e protamina (e derivados ácidos poliamino de lisina, arginina e alanina). Eletroforese em gel de poliacrilamida de protamina e histona irradiada mostram extensiva quebra da cadeia-principal, embora dados dos rendimentos quantitativos não tenham sido relatados. Deve ser notado que a histona H1 e protamina não contêm cisteína, cistina, metionina ou histidina que são conhecidas por serem efetivas como centros de competição para captura de elétron.

Tem-se sugerido que o e^- aq. primeiro adiciona-se ao carbonil de ligações peptídicas localizadas na superfície da proteína e que a transferência de elétrons de radicais $-C^*(O^-)NH-$ a resíduos cistina e histidina ocorre através das ligações hidrogênio entre as unidades peptídicas (41).

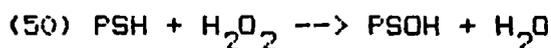
2.6.2. Química da cadeia lateral de proteínas em solução aquosa

2.6.2. a - Resíduos contendo enxofre

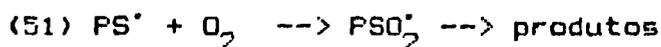
Em estudos com papaína e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (41), três modos de oxidação induzida pela radiação de proteínas com grupos SH em soluções oxigenadas tem sido formulada, isto é;



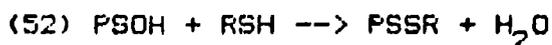
e processos moleculares mais lentos



Reações subsequentes de PS^\cdot macromolecular com O_2 leva a formação de produtos não-reparáveis que presumi-se ser os derivados sulfinico (RSO_2H) e sulfônico (RSO_2H).



A oxidação de PSH pela H_2O_2 , via reação 50 para produzir o derivado ácido sulfênico PSOH é reparável, onde este pode ser revertido pela adição de excesso de cisteína e outros tióis (41).



Rendimentos de inativação para papaína e GAPDH em soluções oxigenadas são excepcionalmente altas. Por exemplo, com soluções saturadas de ar 3×10^{-5} M papaína sob radiólise gama o $G(\text{inat}) O_2 \approx 4.8$ do qual $G \approx 3.5$ é reparável no tratamento com excesso de cisteína. Similarmente, rendimentos altos são observados com GAPDH. Com papaína que tem um único grupo SH (que é essencial para atividade enzimática) somente 20% dos radicais OH disponíveis estão envolvidos na reação 48 para produzir dano não-reparável.

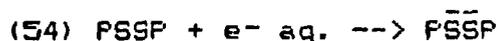
Os resíduos são removidos através de reações em outros sítios da cadeia-lateral e na cadeia-principal da proteína. A maioria da química do enxofre nesses sistemas surge da reação da H_2O_2 com PSH como formulada na reação 50.

Estudos similares foram feitos com lactase desidrogenase (LDH) ⁽⁴¹⁾ e a perda da atividade enzimática em solução oxigenada envolve a oxidação SH no sítio ativo. Entretanto, o rendimento de inativação com LDH é muito mais baixo com $G(\text{inat}) O_2 \approx 0.12$. Este baixo rendimento de inativação, quando comparado à papaína e GAPDH é atribuído ao fato de que grupos SH da papaína e GAPDH estão envolvidos em ligações do substrato e são altamen-

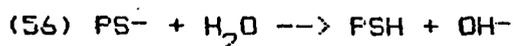
te nucleofílicos. Desde que eles são mais reativos do que grupos SH da LDH que não tem esta função, mas conserva a estrutura tridimensional através da formação da ligação de H.

O rendimento de inativação $G(\text{inat})O_2 \rightarrow 0.12$ obtido com LDH cai dentro do limite de inativação observada com a maioria de outras enzimas $G(\text{inat})O_2 \rightarrow 0.1$ a $\rightarrow 0.5$ em solução oxigenada. Há duas razões principais para valores baixos, geralmente, de inativação por radiação ionizante: (1) somente poucas enzimas como a papaína e GAPDA tem sítios reativos para H_2O_2 (2) o ataque de radicais OH é, relativamente, não específico e é amplamente distribuído sobre muitos sítios tanto da cadeia lateral como da principal.

Os principais sítios para reação de e^- aq. com proteínas em soluções livre de oxigênio incluem ligações de dissulfeto, carbonil peptídico e histidina da cadeia lateral. A captura de elétron em ligações de dissulfeto na proteína produz uma banda de absorção característica em 400 nm observadas com cistina e outros dissulfetos simples (41).



As consequências químicas do ataque de e⁻ aq. à ligação S-S de proteínas não são totalmente compreendidas. Parece haver dois tipos de captura dissulfídica em proteínas. Em um tipo de $\overline{\text{PSSP}}$ é de vida curta e sofre dissociação.



como é achado com dissulfeto simples, cistina etc. A produção de PSH pelas reações de dissociação 55 e 56 tem sido observado com um certo número de proteínas em solução aquosa incluindo a papaína (41). Com papaína, a reação de dissociação contribui para todo o rendimento de inativação. O $\overline{\text{PSSP}}$ do segundo tipo é de vida-longa e tem estabilidade de ions $\overline{\text{S-S}}$.

Aparentemente os $\overline{\text{PSSP}}$ de vida-longa tem estruturas e meios que evitam a dissociação.

Enzimas, que mostram um alto rendimento de radicais $\overline{\text{PSSP}}$ de vida-longa, com um pouco ou nenhum de vida-curta, não são significativamente inativadas por e⁻ aq. (41). Tem sido sugerido que espécies $\overline{\text{PSSP}}$ de vida-longa são removidas, finalmente, através de reação posterior com radicais formados através do ataque OH em vários locais da cadeia lateral e principal.

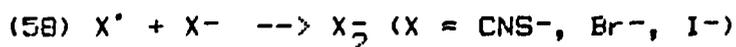
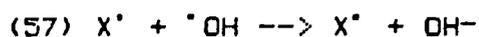
Os radicais PS^{\bullet} formados na reação 55 e os radicais OH na reação 48 podem sofrer reações de combinação em soluções livres de O_2 para produzir dímeros e trímeros de alto peso molecular que contribuem para o rendimento combinado de agregados. Agregados de radiação surgem tanto de ligações covalentes e não covalentes. A última forma de agregado se dissocia em monômeros em soluções aquosas concentradas de SDS ou uréia (41).

Recentemente, estudos detalhados tem sido feitos da formação radiolítica de produtos agregados em soluções livre- O_2 de lactase desidrogenase (LDH); ribonuclease (RNase) e soroalbumina bovina, BSA (41). Técnicas de gel filtração e eletroforese em gel foram utilizadas na separação das frações de proteínas em solução aquosa de SDS com e sem a adição do agente redutor, RSH.

Os resultados mostram claramente que dois tipos de dímeros ligados covalente são formados aqueles que contem ligações cruzadas de dissulfeto e aqueles que contem outras ligações covalentes (não-reduzíveis). O rendimento combinado de dímeros ligados covalentes nesses sistemas está no limite entre $G = 0.1$ e $G = 0.5$. Pontes dissulfeto parecem ser menos importantes (10 a 40%) do que ligações cruzadas de outros tipos de reações radical-radical.

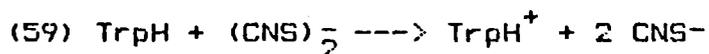
2.6.2. b - Resíduos Insaturados Aromáticos

A maioria das enzimas (com exceção de certas enzimas com grupo SH mencionadas anteriormente) são inativadas pelo ataque OH em solução oxigenada com relativamente baixa eficiência e tem $G(\text{inat})O_2$ no limite 0.1 a 0.5 (41). Embora dados anteriores de pulso de radiólise e análises de produtos mostraram que resíduos insaturados aromáticos são sítios importantes de ataque OH nesses sistemas, tais estudos mostram somente informações limitadas sobre aminoácidos essenciais para atividade de uma enzima em particular (41). Em soluções saturadas de N_2O ($N_2O + e^- \text{ eq. } \rightarrow N_2 + OH^\cdot + OH^-$), o espectro transitório da reação OH com a maioria das proteínas (por exemplo, pepsina, RNase, lisozima, tripsina) são pouco características e refletem a não especificidade das reações OH que são amplamente distribuídas sobre muitos sítios tanto da cadeia principal como da lateral (41). Entretanto a descoberta que íons inorgânicos gerados na forma de radical livre via:



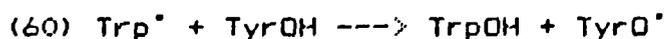
são, relativamente, não reativos para com aminoácidos alifáticos, mas mostram especificidade em

suas reações com resíduos aromáticos e resíduos contendo enxofre, possibilitam uma nova tentativa para identificação de resíduos cruciais para atividade de uma enzima particular. Em estudos anteriores a especificidade da reação com radicais $(\text{CNS})_2$ com triptofano foi usada para mostrar que o

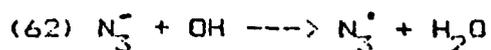


dano da radiação ao triptófanio leva diretamente a perda de atividade da lisozima. Estudos combinados de pulso de radiólise e inativação enzimática de reações de radicais $(\text{CNS})_2$, Br_2 e I_2 com inúmeras enzimas levaram a uma tentativa de identificação de resíduos de aminoácidos essenciais a atividade enzimática da lisozima [tryp], ribonuclease [his], tripsina [his], pepsina [tryp], papaína [cys] e lactase desidrogenase [cys] (41).

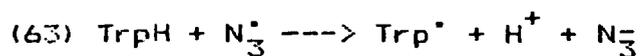
Reações de transferência entre radicais triptofano e resíduos de tirosina em sistemas



aquosos de peptídeos e proteínas tem sido identificadas e estudadas cineticamente (41)
Radicais azida gerados radioliticamente reagem

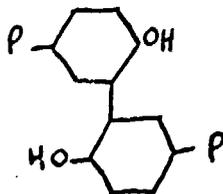


seletivamente com resíduos de triptófano em solução neutra



A migração de dano do triptofano a tirosina através da reação 61 parece ocorrer mais por transferência direta de H; do que pela condução de carga através da cadeia peptídica ou através das ligações de hidrogénio. Medidas de proporções da reação 61 estão sendo usadas em estudos dos efeitos do meio de estrutura e conformação proteica.

A ligação cruzada entre aminoácidos insaturados como fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina em soluções aquosas livres de O_2 de derivados peptídicos simples tem sido demonstrada. Há agora evidência definitiva que processos similares estão envolvidos na dimerização induzida pela radiação de proteínas. A ligação cruzada ditirosil tem sido detectada através do uso de sua característica forte no espectro de



de fluorescência com $\lambda_{\text{max}} = 400$ nm como um produto da radiólise - γ de insulina, ribonuclease, papaína, colágeno, histona e lisozima aquosa (41). Embora os rendimentos observados de ligações cruzadas ditirosil nesses sistemas ($G = 0.1$) são baixos quando comparados a $G(OH)$, sua detecção sugere que reações de ligação cruzada similares em outros sítios estão também envolvidas, mas são menos rapidamente identificadas (41).

2.6.2. c - Resíduos Alifáticos

Na radiólise da maioria das enzimas em meio aquoso, os conteúdos relativos de aminoácidos e conformações das proteínas são tais que a principal fração de radicais OH é removida para sítios mais reativos, como resíduos insaturados aromáticos e resíduos contendo enxofre. Entretanto, outras importantes classes de proteínas tem, relativamente, maior conteúdo de aminoácidos alifáticos os quais oferecem sítios adicionais de competição para o ataque OH. Por exemplo, estudos da perda de aminoácidos em radiólise- de soluções oxigenadas de α -globina do heme, colágeno solúvel e histona do timus mostram que o dano a resíduos alifáticos ocorre para 75,85 e 80%, respectivamente, das alterações químicas observadas devido ao ataque de OH. Os aminoácidos mais afetados em termos de número de resíduos danificados incluem serina,

treonina, prolina, leucina, lisina e arginina.

2.7. Mecanismos de Radioproteção - Revisão

As teorias de proteção à radiação podem ser consideradas tanto a nível molecular como a nível fisiológico-bioquímico, ou seja, mecanismos de radioproteção envolvendo processos químicos de início rápido da radiação e aqueles em que proteção é resultado de mudanças na bioquímica ou fisiologia da célula. No caso da química da radiação, os compostos protetores parecem agir por participação direta em reações de radical livre com dano a moléculas vitais. Em mecanismos bioquímicos, a proteção parece ser um resultado de ação do composto químico sobre o metabolismo da célula, ou sobre processos bioquímicos que afetem a resposta da célula para o dano químico inicial depois que as reações químicas rápidas da radiação tenham sido completadas.

Os mecanismos de proteção química contra dano de radiação ionizante levam em consideração quatro hipóteses: sequestro de radical ("Radical Scavenging"); reações de transferência de hidrogênio; mistura de dissulfetos; liberação de compostos sulfidrilas não proteicos endógenos.

2.7.1. "Radical Scavenging"

A teoria do "radical scavenging" de radioproteção envolve somente o efeito indireto da radiação, ou seja, a interação da radiação iônica

zante com sistemas bioquímicos em solventes (água). Os radicais produzidos na radiólise da água (OH^\cdot , H^\cdot , $\text{e}^- \text{aq.}$) exercem efeitos prejudiciais em constituintes vitais do "alvo". Portanto a remoção desses produtos de radiólise da água antes que eles possam interagir com alvos críticos poderia conferir proteção à radiação.

Esta teoria da radioproteção foi primeiro descrita quando a natureza do radical livre como dano da radiação foi primeiro entendida na década de 50. E tem sobrevivido até o presente, em grande parte, porque pelo menos uma porção do dano causado pela radiação ionizante é, provavelmente, o resultado da ação indireta, e vários radioprotetores muito eficientes são muito bons sequestradores ("scavengers") de radicais derivados da água.

2.7.2. Doação de Hidrogênio para Radicais Alvo

Tanto os efeitos indiretos como os diretos da radiação ionizante produzem radicais em materiais biológicos. Radicais hidroxil, átomos de hidrogênio e produtos derivados de elétron aquoso, reagem com moléculas orgânicas para abstrair átomos de hidrogênio da molécula. Efeitos diretos podem também contribuir, para a formação de espécies nas quais o átomo de hidrogênio é removido da

estrutura inicial. Nessas circunstâncias, a reconstrução da estrutura original requer doação do átomo de hidrogênio. Esta transferência do átomo de hidrogênio tem sido observada entre tióis e radicais de carbono (no centro). Em sistemas simples contendo radicais de carbono (derivado de alcoóis alifáticos) e tióis biológicos (isto é, glutathiona e cistelna) a doação do átomo com formação de radicais sulfidril tem sido observada. Entretanto, esses sistemas altamente purificados não podem ser considerados quando comparados diretamente a células ou tecidos; e a relevância de tais reações à biomoléculas alvo é desconhecida.

2.7.3. Mistura de Dissulfeto

A teoria da mistura de dissulfeto foi proposta em meados da década de 50 e aplica-se somente a radioprotetores contendo enxofre, os quais podem formar a mistura de dissulfetos com grupos sulfidrilas proteicos. Os efeitos da radiação ionizante podem ser expressos até um certo grau pela perda da função biológica de moléculas críticas da proteína. Essas moléculas críticas podem ser protegidas do dano pela formação temporária da mistura de dissulfetos em uma reação de troca que pode ser expressa como nas seguintes equações:



A formação da mistura de dissulfeto serve para proteger os grupos sulfidrilas e dissulfeto nas proteínas do dano oxidativo devido aos efeitos direto e indireto da radiação. O reverso das equações poderia regenerar a molécula proteica original após a ionização e reação dos radicais livres, iniciadas pela radiação, terem sido completados. Desta forma, nos sítios ativos da enzima, a conformação da estrutura proteica pode escapar do dano da radiação pela suas metades tiól ou dissulfeto. Então, os alvos de ação da radiação são estabilizados pela formação da mistura de dissulfetos e desde que a formação da mistura de dissulfetos é reversível, moléculas biologicamente ativas podem ser restauradas após a passagem da radiação.

2.7.4. Liberação de Radioprotetores Endógenos

Révész e colaboradores tem proposto que radioprotetores tióis e dissulfetos administrados exogenamente, agem pela liberação de radioprotetores endógenos que são responsáveis por efeitos benéficos. Esta teoria é restrita a radioprotetores exógenos, tendo um grupo tiól ou dissulfeto

reduzível, já que radioprotetores endógenos liberados (principalmente a glutathiona) estão contidos na forma de mistura de dissulfetos que ocorre naturalmente com proteínas celulares. Em modelo similar à teoria da mistura de dissulfetos, os defensores desta teoria tem mostrado que a eficiência da radioproteção por agentes exógenos está correlacionada com o potencial de liberação de glutathiona dos mesmos. A glutathiona liberada previne o dano da radiação por outros mecanismos, isto é, por reações de transferência de hidrogênio, "radical scavenging", etc. Esta teoria se apoia no fato da glutamina poder exercer atividade protetora devido a existência de formas que não podem ser simuladas por outros radioprotetores contendo tiól (86). Entretanto, pesquisas mais recentes sobre a natureza daqueles tióis presentes naturalmente em misturas de dissulfeto proteínico-Tiol, tendem a não apoiar esta teoria, porque somente uma pequena fração de tióis de baixo peso molecular ligados à proteína tem sido identificados como glutathiona (17, 63).

Sequestradores de Radicais ("Radical Scavenging")

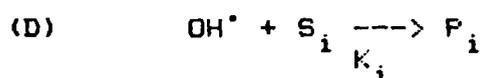
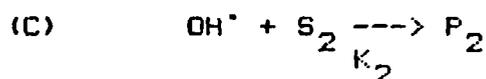
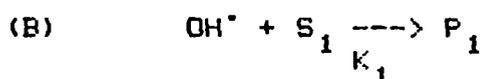
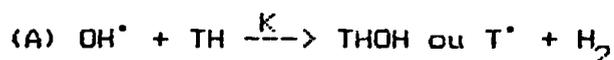
A maioria dos compostos químicos reagem com radicais induzidos pela radiação formados da água. A proporção relativa de interação de vários compostos, com radicais livres poderá entre-

tanto diferir consideravelmente. E, portanto, de interesse comparar compostos com efeitos protetores, não protetores e sensibilizantes em sistemas biológicos com respeito a habilidade de sequestro em sistemas químicos definidos.

"Scavengers" de OH[•]

O radical hidroxil (OH[•]) é, geralmente, considerado ser o mais prejudicial à macromolécula e células (29).

Se o OH[•] é formado em um sistema homogêneo, onde este reage com a molécula alvo TH e com "scavengers" S₁, S₂, ..., observa-se as seguintes reações:



Se TH é uma biomolécula complexa como uma enzima, os radicais OH[•] vão, prontamente, reagir com seus vários sítios (neste caso aminoácidos sendo que K descreve a constante de velocidade para a reação do OH[•] com todos esses sítios. Somente uma fração α , das reações OH[•] com a enzima causa dano à atividade enzimática, geralmente, somente se a reação ocorre próximo ao sítio ativo, ou a um sítio que mude a conformação da enzima. A fração (1 - α) de radicais OH[•] reagem com a enzima em sítios não

cruciais, os quais não afetam a atividade enzimática. Isto está de acordo com os baixos rendimentos de desativação da maioria das enzimas pela irradiação que tem $\alpha < 0.01$ (69).

O dano é dado por:

$$D_0 = [\text{alvo danificado}] = \frac{k [\text{TH}]}{k[\text{TH}] + \sum K_i [\text{Si}]} [\text{OH}]^{\text{total}}$$

Na condição de atingir 50% de proteção da enzima em solução, a concentração de "scavengers" deveria ser suficiente assim $k [\text{E}] \approx \sum K_i [\text{Si}]$. Para enzimas $k = 2.2 \times 10^{10} - 1.2 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ (29), e as concentrações são geralmente menores do que 10^{-7} M , e para scavengers OH, $K_1 > 2.10^9 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$. Portanto, concentrações de "scavengers" de 10^{-5} M são suficientes na condição de atingir proteção de 50%, entretanto, 10^{-4} M dará proteção quase total para a enzima nessas soluções (29).

Considerando-se apenas a condição de "scavengers" em soluções homogêneas, onde o alvo, o OH[•] e o "scavengers" estão homogeneamente distribuídos; há vários casos, onde haletos e pseudo-haletos foram usados como "scavengers" de OH[•] para proteger enzimas e ao contrário a sensibilização foi observada (29).

As espécies Cl_2^- , Br_2^- , I_2^- , $(\text{CNS})_2^-$, bem como CO_3^- tem diferentes constantes de velocidade com aminoácidos quando comparados a do OH[•]. Por exemplo, Br_2^- é mais eficiente do que OH[•] na desativação de enzimas que tenham o triptofano e a histidina em sítios ativos (29).

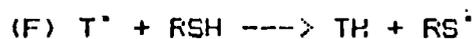
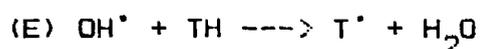
Em resumo se um OH[•] reage com um "scavenger" o efeito

protetor depende das propriedades do produto da reação do OH^\bullet com o "scavenger". Se o produto não é reativo a proteção é atingida, mas se o produto é reativo e pode inativar o alvo também, então é importante comparar as reatividades deste com a de OH^\bullet . Pode-se observar um caso de extrema sensibilidade ou de proteção parcial. Devido a tais efeitos, pode-se concluir que vários "scavengers" de OH^\bullet não protegem necessariamente os alvos na ordem de seus valores de $K_{\text{OH}^\bullet+\text{S}}$ [S].

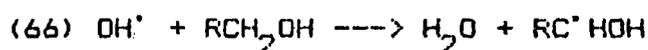
Quando OH^\bullet é formado nas proximidades de uma macromolécula, este reagirá com um sítio da mesma em poucos choques, e portanto a concentração relevante do alvo não é a concentração média da macromolécula em soluções. A concentração de "scavenger" para competir com OH^\bullet é a concentração do sítio reativo no volume de um raio de vários raios de encontro, do OH^\bullet . Portanto, concentrações muito altas de scavengers de OH^\bullet são necessárias na condição de sequestrar este OH^\bullet . Isto tem sido observado quando $\text{Cu}(\text{I})$ ligado a penicilinase ⁽²⁹⁾ reage com H_2O_2 e forma OH^\bullet na superfície da enzima. Neste sistema "scavengers" de OH^\bullet foram ineficientes e proteção parcial foi observada somente em concentrações muito altas desses "scavengers".

Há casos onde concentrações muito pequenas de scavengers de OH^\bullet promovem proteção quase total de um soluto. Se por exemplo, pequenas concentrações de um doador de H, tal como compostos RSH, são adicionadas ao sistema, eles sequestram prontamente radicais OH^\bullet . Portanto, eles podem em concentrações muito baixas "reparar", eficientemente, a molécula danificada T^\bullet através da doação de um átomo H. Este mecanismo é descrito na seguinte

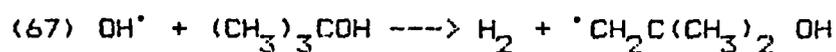
sequência de reações (29):



Alcoóis são comumente usados para sequestrar radicais hidroxil.



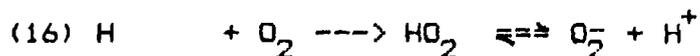
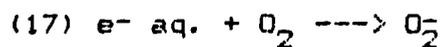
Metanol, etanol e isopropanol tem sido usado mais comumente, porém o álcool butílico terciário pode oferecer algumas vantagens: o radical produzido não é reativo e desaparece rapidamente no processo, na ordem de segundos. A constante de velocidade da reação é ao redor de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



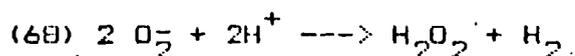
Scavengers de Elétrons Solvatados

- Oxigênio

Em água pura aerada, elétrons solvatados e átomos de hidrogênio interagem muito rapidamente com oxigênio (já mencionado nas equações 16 e 17):



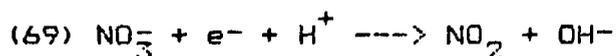
Na presença de "scavengers" específicos para OH, todos os radicais O_2 poderão dar aumento a produtos como:



Embora a interação de elétrons solvatados com oxigênio ocorra em uma proporção muito alta, outros compostos, como nitrato, podem competir, eficazmente, com oxigênio por elétrons solvatados.

- Nitrato

Quando Bachofer e Pollinger, em 1954 ⁽¹¹⁾ estudaram o efeito protetor de vários sais contra a degradação induzida por raios-X do bacteriófago T_1 foi demonstrado que ions nitrato protegem contra os efeitos indiretos da radiação ionizante. Este ion é um "scavenger" muito eficiente de elétrons solvatados ⁽⁵⁸⁾, mas não de radicais OH^* .



"Scavenging" de Radicais Hidrogênio

Átomos de hidrogênio são sequestrados pelo oxigênio em uma proporção similar àquela de elétrons solvatados, dando aumento a radicais O_2 .

Átomos de hidrogênio reagem muito mais lentamente do que elétrons solvatados.

03. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo analisar os efeitos da radiação gama na crotamina em solução aquosa, enfatizando os seguintes aspectos:

- estudar as alterações bioquímicas produzidas pela radiação na toxina;
- estudar a ação da radiação na atividade imunológica da toxina;
- estudar a ação de radioprotetores químicos que sejam capazes de proteger os determinantes antigênicos da toxina.

CAPÍTULO II - MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

1.1. Veneno Crotálico e Soro Anti-Crotálico

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* var. *crotaminicus* utilizado neste trabalho foi gentilmente doado pelo Instituto Butantan de São Paulo, onde foi extraído. Após a coleta, o veneno foi imediatamente dessecado a vácuo em temperatura ambiente e conservado a 4 C. Do Instituto Butantan também se origina o soro anti-crotálico, produzido em cavalos hiperimunizados com "pool" de veneno crotálico, contendo crotamina. O soro é purificado por digestão peptídica, concentrado e titulado em miligramas de antiveneno frente a veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Segundo indicações do fabricante, cada mililitro neutraliza 1,5 mg de veneno.

1.2. Fonte de Cobalto-60:

As amostras de crotamina em solução aquosa foram irradiadas em frascos de vidro com raios gama procedentes de uma fonte de cobalto-60, "Gammacell 220" da Atomic Energy of Canada Limited, com uma atividade aproximada de 5361×10^{10} Becquerel. A fig. 1 representa a parte externa correspondente à blindagem da fonte de cobalto-60 onde foram realizadas as irradiações. As amostras colocadas na câmara de amostras (fig. 2), cujas dimensões são de 15,49 cm de diâmetro por 20,47 cm de altura. A irradiação, propriamente dita, das amostras procede-se quando a porta da câmara é fechada e

seleciona-se o tempo necessário no painel de controle. Assim acionado o botão de controle, a câmara de amostra desce, automaticamente, indo colocar-se onde se encontra a fonte de cobalto-60, ou seja na posição de irradiação. Ela está localizada no centro de blindagem de chumbo e consiste de 26 "lâpis" como pode ser visto na fig. 3. Cada "lâpis" possui 7 pastilhas de cobalto, totalizando 182.

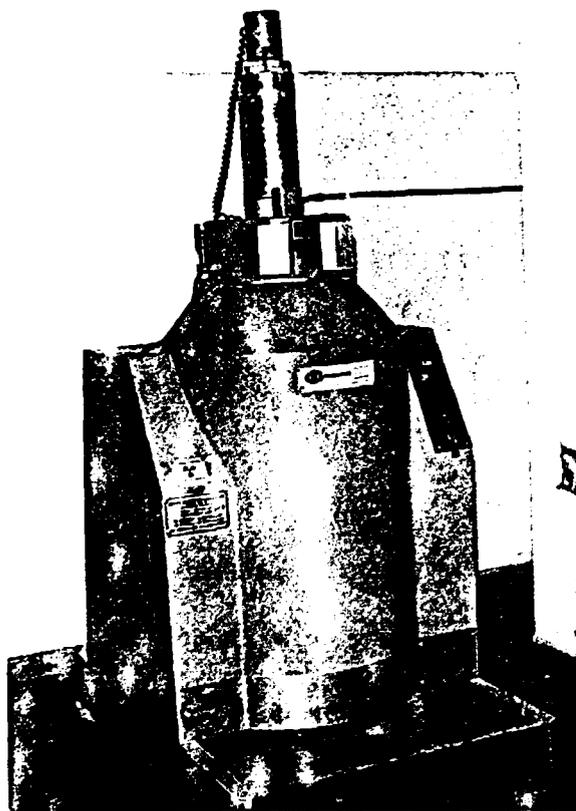


Fig. 1 - Fonte Cobalto-60

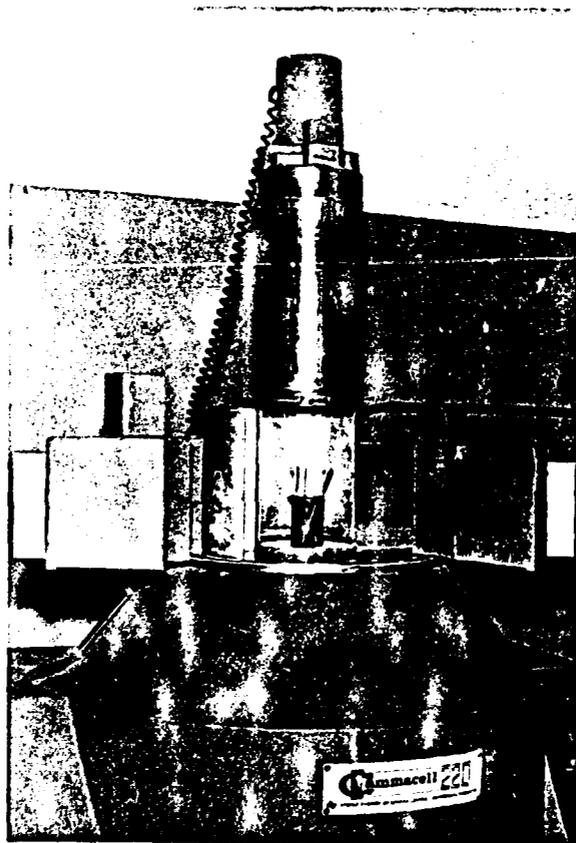


Fig.2 - Câmara de Amostras da Fonte de ^{60}Co

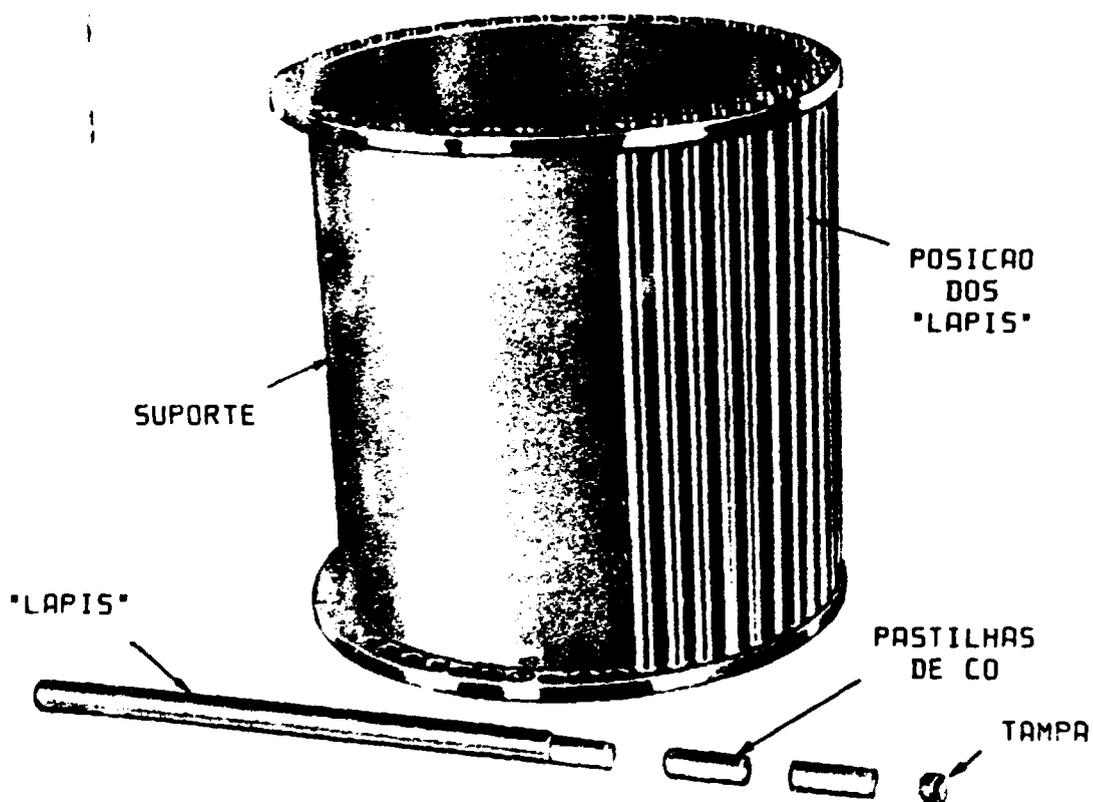


Fig. 3 - Suporte onde se encontra o Cobalto Radioativo na Fonte de Irradiação.

1.3. Outros Reagentes

Todos os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de grau p.a.

2. Métodos

2.1. Purificação da Crotamina a Partir do Veneno de *Crotalus durissus terrificus*:

A primeira fase de purificação da crotamina consiste num fracionamento inicial do veneno em gel de Sephadex G-75 (Pharmacia Fine Chemical). Após o isolamento da toxina, esta foi recromatografada no mesmo gel várias vezes para garantir o maior grau de pureza da toxina proteica.

Todas as etapas de purificação foram realizadas em temperatura ambiente.

2.2. Preparação da Amostra:

Cerca de 200 mg do veneno bruto seco de *C. d. terrificus* foram suspensos em 2 ml de acético 0.1 M. A suspensão obtida foi centrifugada a 2000rpm durante 10 min a 4 C numa centrífuga Sorvall RC-2B. O sobrenadante foi submetido a filtração em gel de Sephadex G-75.

2.3. Filtração em Gel de Sephadex G-75:

O sobrenadante obtido no item anterior foi aplicado, a uma coluna 80 x 1,6 cm de Sephadex G-75

equilibrada com ácido acético 0,1 M. A amostra, portanto, foi eluída com ácido acético e frações de 1 ml foram coletados, num fluxo de 3 ml/h num coletor de frações da LKB. A absorvância de cada fração coletada foi lida em 280 nm, num espectrofotômetro da Karl Zeiss PMQ II, o gráfico foi traçado e os "picos" delimitados para crotamina foram testados quanto à sua atividade paralisante das patas posteriores em comundongos e posteriormente liofilizado.

2.4. Irradiação da Toxina

A crotamina foi submetida à radiação gama da fonte de cobalto-60, com uma taxa de dose de $1,14 \times 10^3$ Gy/h nas doses de 100 Gy, 2000 Gy e 5000 Gy. A crotamina foi irradiada em solução aquosa numa concentração aproximada de 1 mg/ml em presença de O_2 e em temperatura ambiente. Posteriormente, a crotamina foi irradiada em solução aquosa na mesma concentração, agora livre de O_2 (através de borbulhamento do gás de nitrogênio nas amostras), somente na dose de 2000Gy. Sendo a taxa de dose, neste caso, de $1,08 \times 10^3$ Gy/h, e na presença de diferentes concentrações de "scavengers": cisteína (2×10^{-1} M, 2×10^{-2} M, 2×10^{-3} M, 2×10^{-4} M, 2×10^{-5} M, 2×10^{-6} M), álcool butílico terciário (10^{-1} M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M) e nitrato de sódio (10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, 10^{-1} , 1 M).

2.5. Determinação Quantitativa de Proteína:

A determinação da concentração de proteína foi realizada nas soluções irradiadas; nas doses de 100 Gy, 2000 Gy e 5000 Gy e na toxina não-irradiada em presença de O_2 . Utilizou-se o método de Lowry, modificado por Miller (70). Foram realizadas nove dosagens de cada amostra e aplicou-se, o teste t Student como tratamento estatístico.

2.6. Imunodifusão Dupla, Radial (Ouchterlony)

Quando em dois pontos diferentes de uma camada de gel, colocada em posição horizontal, colocam-se o antígeno e o anticorpo, um difunde contra o outro formando o precipitado. Alguns autores preferem designar de dupla difusão bidimensional, mas deveríamos em verdade chamá-la de multidirecional, uma vez que a difusão se dá em todas as direções, mas difusão dupla é o nome mais adequado. Esse método foi descrito por Ouchterlony, em 1946-1948, sendo ainda o mais largamente empregado, pois a grande vantagem desse sistema é a de permitir a comparação simultânea de muitos sistemas antigênicos contra o mesmo sistema de anticorpos.

Através desse métodos comparamos a crotamina e solução aquosa nas doses de 100 Gy, 2000 Gy e 5000 Gy, bem como na forma nativa frente ao soro anti-crotálico.

2.7. Imunodifusão Radical de Mancini, Carbonara e Heremans ou Imunodifusão Radical Simples (I.R.S.)

Quando se tem o anticorpo específico para determinado antígeno, incorporado ao gel, distribuído sobre lâmina de ágar, e em posições adequadas do gel são feitos orifícios, que se enchem, com os antígenos em concentrações padronizadas e outros com o antígeno de concentração desconhecida, há difusão radial a partir do orifício, e quando todo antígeno estiver difundido, verifica-se a opacificação em forma circular em torno do orifício. O método é muito sensível, mostrando larga aplicação na quantificação de componentes proteicos.

Pelo menos três padrões com concentrações diferentes são utilizados para cada antígeno, sendo absolutamente indispensável a alta pureza dos anticorpos que se encontram incorporados ao gel de ágar. Procedese, após o término da difusão, a leitura dos diâmetros correspondentes aos halos de precipitação dos padrões e dos desconhecidos, e traça-se a reta, lançando-se em ordenadas o quadrado dos diâmetros dos respectivos halos de precipitação contra as concentrações. Lê-se a concentração do desconhecido a partir do quadrado do diâmetro, sobre a reta, a qual deve ser estabelecida para cada experimento. Em nosso caso para reta padrão utilizou-se a crotamina na forma nativa e no caso das amostras desconhecidas utilizou-se crotamina irradiada a 2000 Gy na ausência de O_2 e na presença de várias

concentrações de "scavengers".

2.8. Determinação de Grupos SH Livres:

As determinações de grupos SH livres foram realizadas nas soluções aquosas irradiadas nas doses de 100 Gy, 2000 Gy e 5000 Gy em presença de O_2 e em 2000 Gy na ausência de O_2 ; bem como na proteína nativa através do método de Ellman (35).

Para cada tipo de amostra foram realizadas 5 dosagens.

2.9. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

SDS-PAGE/descontínua, sendo gel de separação (gradiente de 12 a 20%) de bis-acrilamida 36% em tampão Tris-HCl 3M pH 8.8 contendo SDS a 5% (m/v).

O diluente da amostra contendo Tris-HCl 0.5M pH 6.7, glicerol 30% (v/v), dietiltreitol, SDS e azul de bromofenol a 0.05% (m/v). As amostras foram aquecidas no diluente em banho de água em ebulição por 3 min.

Foram utilizados como padrões de peso molecular: Soroalbumina bovina (68.000); Ovalbumina (45.000); Aldolase (38.000); Quimotripsinogénio (25.000); RNase (13.000).

As amostras foram aplicadas no gel num volume de 40 μ l contendo aproximadamente 100 μ l de proteína. O tampão do eletrodo era Tris-glicina-SDS (2,1 g Tris, 10,1

g glicina e 0,7 g SDS). O gel foi submetido a uma corrente constante sendo posteriormente corado com Coomassie brilliant blue.

CAPÍTULO III - RESULTADOS

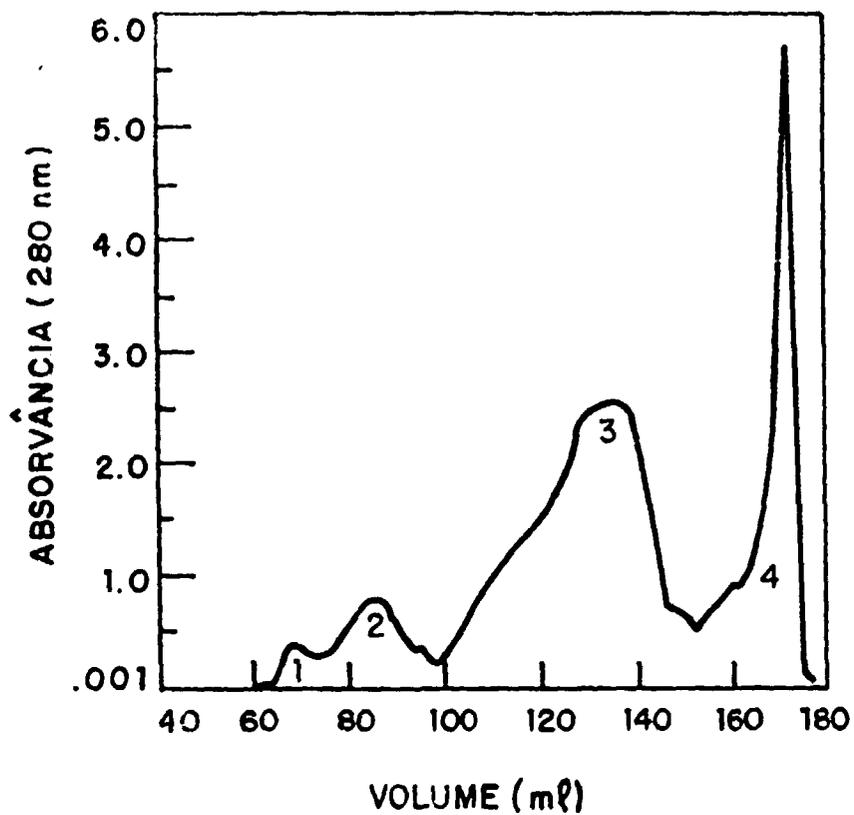


Fig. 01 - Perfil cromatográfico do veneno bruto obtido por cromatografia de gel filtração; onde o pico nº 4 corresponde a crotamina.



Fig. 02 - Observa-se paralisia das patas posteriores do camundongo após a inoculação, por via intraperitoneal, de 0,2 ml de crotamina obtida na cromatografia anterior, caracterizando dessa forma a atividade biológica da toxina.

Tabela 1 - Concentração Proteica das Amostras Irradiadas

Dose (Gy)	Conc. média (mg/ml)
0	0,85
100	0,80
2000	0,82
5000	0,47

Tabela 2 - Comparação da Proteína Nativa (n = 9) e Amostras Irradiadas (n = 9).

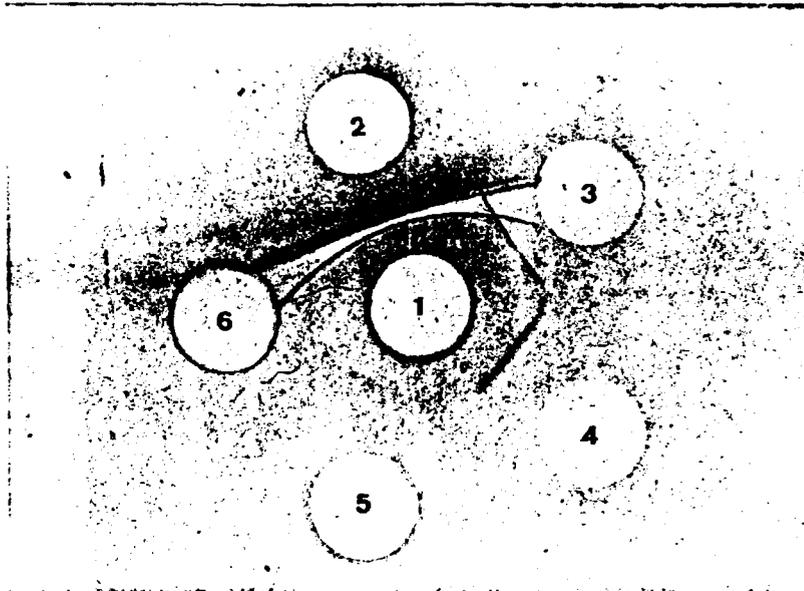
	Proteína nativa	Proteína Irrad. 100 Gy	Proteína Irrad. 2000 Gy	Proteína Irrad. 5000 Gy
\bar{X} (mg/ml)	0,85	0,80	0,82	0,47
S	0,1666	0,2328	0,4328	0,1851
t_0		0,0953	0,1423	4,57

$$GL = 9 + 9 - 2 = 16$$

$$P = 5\%$$

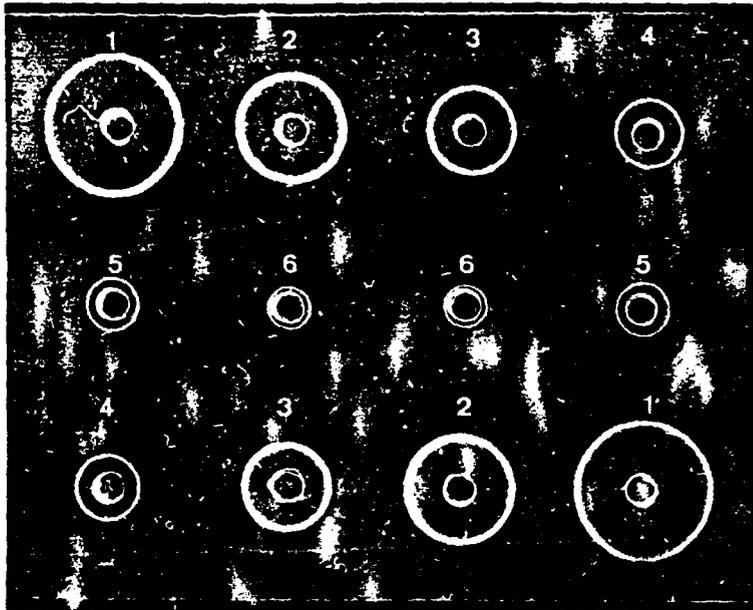
$$t_{\alpha} = 2,120$$

Fig. 03 - Imunodifusão (Ouchterlony)



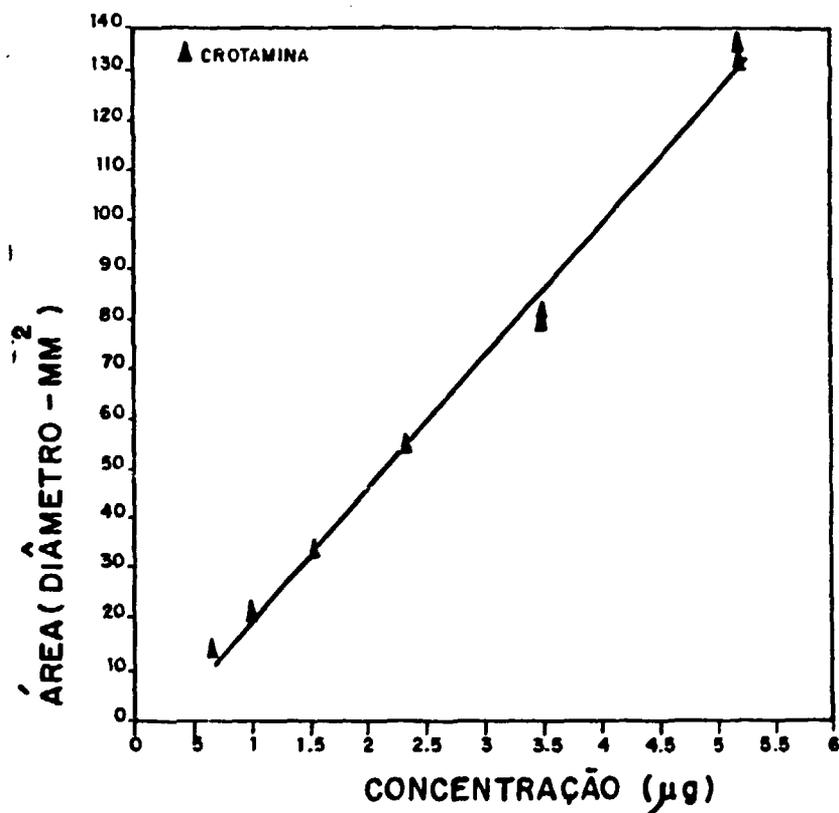
- Legenda Fig. 03: 1 - Soro anticrotálico
2 - Veneno Bruto
3 - Crotamina Nativa
4 - Crotamina Irradiada 100 Gy
5 - Crotamina Irradiada 2000 Gy
6 - Crotamina Irradiada 5000 Gy

Fig. 03 - Padronização da IRS Através da Crotaimina Nativa



Legenda Fig. 04: 1 - 5,20 ug Toxina
2 - 3,50 ug Toxina
3 - 2,34 ug Toxina
4 - 1,54 ug Toxina
5 - 1,00 ug Toxina
6 - 0.66 ug Toxina

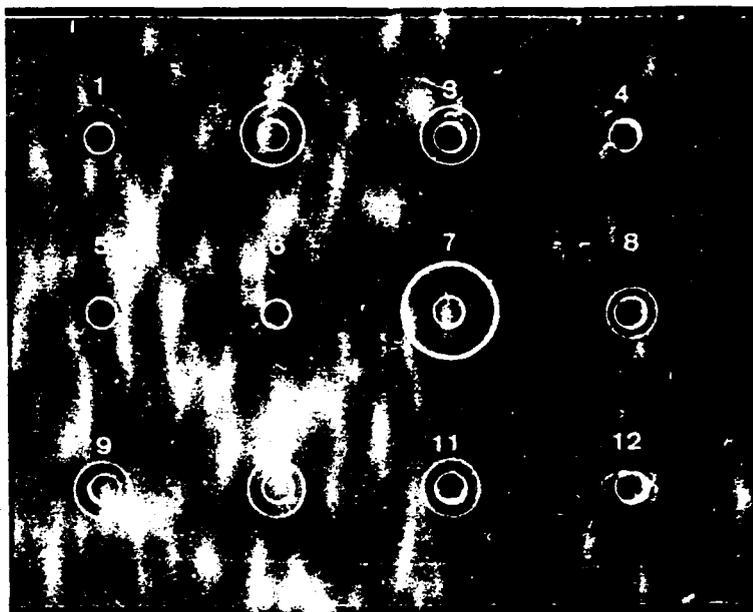
Fig. 05 - Curva Padrão da IRS



A partir dos dados obtidos na fig. 04, traçou-se a reta acima e pelo método dos mínimos quadrados; a equação da mesma seria $y = 26,50x - 7,40$; onde x corresponde a concentração em μg e y corresponde ao $(\text{diâmetro})^2$, isto é, a área dos halos em mm^2 .

As figuras 6 e 7 correspondem a IRS das amostras irradiadas na dose 2000 Gy em ausência de O_2 , e na presença de "scavengers" em diferentes concentrações e também de amostras irradiadas nas doses de 100 Gy, 2000 Gy e 5000 Gy na presença de O_2 e ausência de "scavengers".

Fig. 06



Legenda Fig. 06

- | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| 01 - 2×10^{-1} M Cisteína | 07 - Fadrão de Crotonina Nativa |
| 02 - 2×10^{-2} M Cisteína | 08 - 1 M Nitrato de Sódio |
| 03 - 2×10^{-3} M Cisteína | 09 - 10^{-1} M Nitrato de Sódio |
| 04 - 2×10^{-4} M Cisteína | 10 - 10^{-2} M Nitrato de Sódio |
| 05 - 2×10^{-5} M Cisteína | 11 - 10^{-5} M Nitrato de Sódio |
| 06 - 2×10^{-6} M Cisteína | 12 - 10^{-4} M Nitrato de Sódio |

Fig. 7



Legenda Fig. 7

- 13 - 10^{-5} M Nitrato de Sódio
- 14 - 5 M Alcool Butílico Terciário
- 15 - 4 M Alcool Butílico Terciário
- 16 - 3 M Alcool Butílico Terciário
- 17 - 2 M Alcool Butílico Terciário
- 18 - 1 M Alcool Butílico Terciário
- 19 - 10^{-1} M Alcool Butílico Terciário
- 20 - Padrão de Crotamina Nativa
- 21 - Crotamina Irradiada 100 Gy (O_2)
- 22 - Crotamina Irradiada 2000 Gy (O_2)
- 23 - Crotamina Irradiada 2000 Gy (sem O_2)
- 24 - Crotamina Irradiada 5000 Gy (O_2)

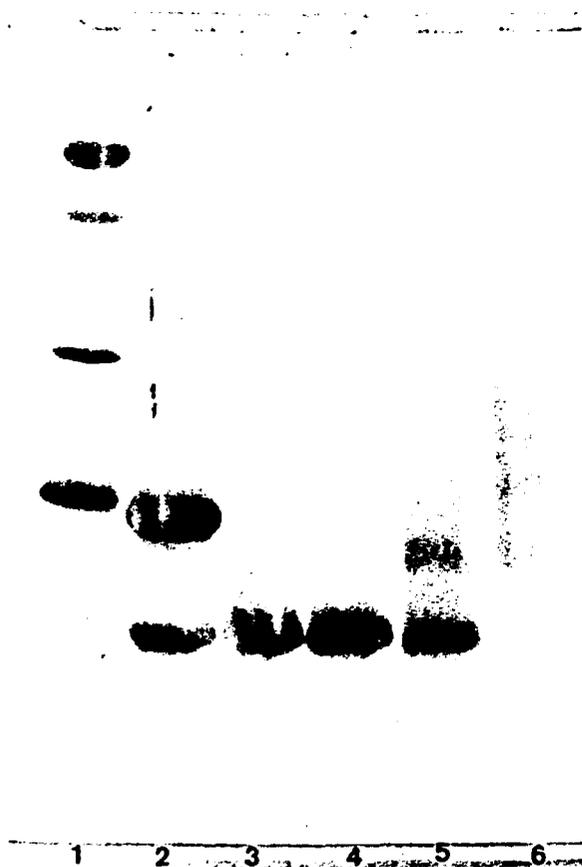
Tabela 3 - Quantidade de Proteína nas Amostras Irradiadas a partir da Curva Padrão de IRS.

Amostra	Conc (ug)
2×10^{-1} M Cisteína	1,37
2×10^{-2} M Cisteína	1,42
2×10^{-3} M Cisteína	1,22
2×10^{-4} M Cisteína	----
2×10^{-5} M Cisteína	----
2×10^{-6} M Cisteína	----
1 M de Nitrato	1,04
10^{-1} M de Nitrato	1,15
10^{-2} M de Nitrato	1,20
10^{-3} M de Nitrato	1,19
10^{-4} M de Nitrato	0,91
10^{-5} M de Nitrato	0,98
5 M de Alcool	0,74
4 M de Alcool	0,74
3 M de Alcool	0,88
2 M de Alcool	0,98
1 M de Alcool	----
10^{-1} de Alcool	----
Crotamina 100 Gy O_2	1,50
Crotamina 2000 Gy O_2	----
Crotamina 2000 Gy	----
Crotamina 5000 Gy O_2	----

Tabela 4 - Concentração de SH Livre (Reação de Ellman)

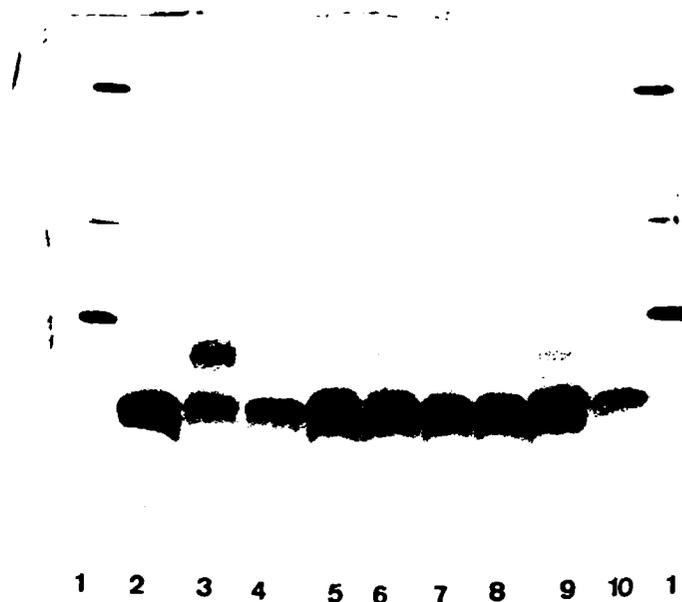
Amostra	Conc. Média SH Livre (10 ⁻⁴ M)
Crot. Nativa	-----
Crot. Irrad. 100 Gy (O ₂)	0,136
Crot. Irrad. 2000 Gy (O ₂)	0,340
Crot. Irrad. 2000 Gy	0,269
Crot. Irrad. 5000 Gy (O ₂)	0,393

Fig. 8 SDS-PAGE



Legenda da Fig. 8:

- 1 - Padrões de Peso Molecular
- 2 - Veneno Bruto Não-Irradiado
- 3 - Crotoxina Não-Irradiada
- 4 - Crotoxina Irradiada 100 Gy (O_2)
- 5 - Crotoxina Irradiada 2000 Gy (O_2)
- 6 - Crotoxina Irradiada 5000 Gy (O_2)



Legenda Fig. 9:

- 1 - Padrões de Peso Molecular
- 2 - Crotonina Nativa
- 3 - Crotonina Irradiada 2000 Gy D₂
- 4 - Crotonina Irradiada 2000 Gy
- 5 - Crotonina Irrad. 2000 Gy com 2 x 10⁻³ M Cisteína
- 6 - Crotonina Irrad. 2000 Gy com 2 x 10⁻⁴ M Cisteína
- 7 - Crotonina Irrad. 2000 Gy com 10⁻³ M Nitrato
- 8 - Crotonina Irrad. 2000 Gy com 10⁻⁴ M Nitrato
- 9 - Crotonina Irrad. 2000 Gy com 2 M Alcool
- 10 - Crotonina Irrad. 2000 Gy com 1 M Alcool

CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO

O processo empregado neste trabalho para purificação da crotamina é um método simples e rápido, consistindo basicamente de filtrações sucessivas em gel de Sephadex que segundo o critério de pureza adotado, ou seja, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), observamos uma única banda na placa do gel, estando, portanto, aparentemente pura.

Em todas as etapas do processo de purificação foi testada a atividade biológica da toxina proteica "in vivo", isto é, sua ação na musculatura das patas posteriores de camundongos; verificou-se que tal atividade se manteve inalterada.

Após o processo de obtenção e purificação iniciamos a irradiação da crotamina em solução aquosa e em diferentes doses de irradiação.

Na literatura são citados casos de proteínas que após a irradiação ocorre a precipitação da mesma em solução, em nosso caso observamos que a crotamina é uma proteína bastante solúvel em solução aquosa e mesmo após a irradiação na dose de 5000 Gy não notamos turvação da solução.

A determinação da concentração proteica das amostras irradiadas com relação à proteína nativa, nas doses de 100 Gy, 2000 Gy e 5000 Gy na presença de O_2 demonstrou que não houve alteração nas doses de 100 e 2000 Gy, a pequena variação não é significativa, estatisticamente, admitindo um erro de 5% no teste t Student. Já na dose de 5000 Gy verificou-se uma perda de aproximadamente 55% do material proteico.

Em função apenas desse dado poderíamos supor que ocorreu

o rompimento da cadeia polipeptídica, contudo pela SDS-PAGE do material nas mesmas doses e condições citadas acima, o que notamos é a formação de agregados proteicos, portanto o que podemos supor agora é que durante a irradiação ocorreu perda de sítios específicos para a reação Lowry. Pois, parte da sensibilidade do método depende da redução do reagente de fenol seg. Folin-Diocalteu pela oxidação dos aminoácidos aromáticos tirosina e triptofano da proteína, como a crotamina apresenta um resíduo de tirosina e dois resíduos de triptofano e como é citado na literatura a não-especificidade das reações OH, as quais são amplamente distribuídas sobre muitos sítios tanto da cadeia principal como da lateral da proteína, as reações de transferência entre radicais triptofano e o resíduo tirosina, como citado na equação 61 do capítulo 1, poderia ter ocorrido, por exemplo; como também a radiação pode ter atingido aminoácidos alifáticos, provocando modificações nestes que impliquem na não complexação do íon Cu^{++} pelas ligações peptídicas dos mesmos. E por estas razões se justificaria a perda de 55% do material proteico na dose de 5000 Gy pelo método utilizado.

Nas mesmas amostras utilizadas para reação de Lowry realizou-se a reação de Ellman. Nosso principal interesse era o de verificar por este método se durante a irradiação ocorreria a ruptura das pontes de dissulfeto, sendo que esta toxina não apresenta grupos tióis livres e todas as cisteínas estão comprometidas em pontes de dissulfetos. Supondo-se que ocorresse a ruptura das três pontes de dissulfeto o máximo de SH livre que seria encontrado estaria na ordem de 1×10^{-4} M por este método,

a sensibilidade deste permite que tal concentração seja detectada. Embora tenha ocorrido um ligeiro aumento da concentração de SH livre em função da dose de irradiação, não podemos afirmar que tal concentração obtida seja específica somente para grupos tibiis. Durante a irradiação pode ocorrer a formação de algum produto que possa interagir com reativo de Ellman; reforçando esta suposição em nossos dados verificamos que não há uma diferença entre as concentrações de SH obtidas na dose de 2000 Gy com e sem O_2 no sistema, lembrando que o principal sítio de reação do elétron aquoso seria as pontes de dissulfeto no sistema livre de O_2 ; pode-se se supor também que a conformação da proteína mesmo irradiada confira proteção as pontes de dissulfeto e essas concentrações sejam inespecíficas.

Com relação à atividade antigênica da proteína ficou evidente de uma forma qualitativa, pela imunodifusão de Ouchterlony a perda da antigenicidade da proteína nas doses de 2000 Gy e 5000 Gy em solução oxigenada. Na SDS-PAGE destas doses notamos uma maior denaturação proporcional ao aumento de dose, provavelmente a formação de agregados proteicos está relacionada a perda dos determinantes atingênicos da proteína.

Em função destes dados a dose de 2000 Gy foi escolhida como parâmetro para estudarmos a ação dos "scavengers", pois se estes atuariam como radioprotetores, principalmente da antigenicidade da macromolécula.

Pelo método da imunodifusão radial simples visamos a quantificação da "proteção" conferida "scavengers" (cisteína, nitrato de sódio, álcool butílico terciário).

Nas condições adotadas para estudar a ação desses "scavengers", ou seja, a irradiação foi realizada na ausência de O_2 , portanto, a molécula proteica sofrerá, principalmente, a ação tanto do radical OH como do elétron aquoso, sendo nossa intenção nessa fase também identificar qual dos produtos de radiólise da água é o principal responsável pelo dano da proteína em seus determinantes antigênicos.

Dos tres "scavengers" adotados a cisteína foi que demonstrou maior eficiência como radioprotetor químico, porque através da presença da mesma no sistema obteve-se os maiores valores de concentração proteica com atividade antigênica. Segundo a literatura a cisteína por apresentar o grupo funcional tiól na sua estrutura é doadora de átomos de H, e estes restauram a molécula alvo, ou pode ainda sequestrar radicais OH do sistema.

Nas concentrações testadas um máximo de proteção foi atingido a partir da concentração de 2×10^{-3} M e em concentrações inferiores não houve proteção, portanto podemos supor que as concentrações de 2×10^{-4} a 2×10^{-6} M não foram suficientes para reparar a molécula proteica danificada pela radiação gama, bem como não sequestrou radicais OH o suficiente para preservar os determinantes antigênicos da proteína. O resultado obtido SDS-PAGE entre o limite de proteção e não-proteção, isto é, entre as concentrações de 2×10^{-3} M e 2×10^{-4} M de cisteína, notamos claramente que com a concentração de 2×10^{-3} M não houve denaturação proteica, pois não há formação de agregados proteicos, podendo-se daí justificar a perda de atividade antigênica da proteína.

O nitrato de sódio, como é citado na literatura, é "scavenger" específico para eletrôn aquoso e pelo que observamos na imunodifusão radial simples não existe uma relação aparente entre a concentração com a "proteção". O mesmo observamos na SDS-PAGE destas mesmas concentrações; a formação de agregado proteico foi semelhante.

A literatura cita o álcool butílico terciário como eficiente "scavenger" de radicais OH somente em altas concentrações, e foi o que verificamos na prática, obtivemos o máximo de proteção só com concentrações altas de álcool (a partir de 2 M). Observamos também neste caso um limite de proteção e não-proteção, isto é, entre 2 M e 1 M de álcool, respectivamente, o que é justificável pelo que constatamos na SDS-PAGE, com 1 M de álcool a denaturação foi maior do que com 2 M. Portanto a "proteção" dependeu da concentração do álcool.

Estes dados nos fazem supor que tanto OH e o eletrôn aquoso interferem no aspecto antigênico da molécula proteica e que nem sempre a denaturação está relacionada a perda total da atividade antigênica.

E como foi citado na literatura a presença ou não do O_2 no sistema tem um efeito sob a molécula alvo, na SDS-PAGE verificamos, realmente, maior dano na presença de O_2 contudo sob o aspecto antigênico não parece ter influência, pelos nossos dados, a irradiação com ou sem O_2 não teve alteração no aspecto antigênico da crotamina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 001 - ADAMS, G.E.; ALDRICH, J.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L.; WILLSON, R.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: Reactions of inorganic radical anions with amino acids. Radiat. Res., 49: 278-89, 1972.
- 002 - ADAMS, G.E.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B.; REDPATH, J.L.; WILLSON, R.L. Selective radical reactions with proteins and enzymes: The inactivation of ribonuclease. Radiat. Res., 49: 290-9, 1972.
- 003 - ADAMS, G.E.; REDPATH, J.L.; BISBY, R.H.; CUNDALL, R.B. The use of free radical probes in the study of mechanisms of enzyme inactivation. Isr. J. Chem., 10:1079-93, 1972.
- 004 - ADAMS, G.E.; WILLSON, R.L.; ALDRICH, J.E.; CUNDALL, R.B. On the mechanism of the radiation-induced inactivation of lysozyme in dilute aqueous solution. Int. J. Radiat. Biol., 16:333-42, 1969.
- 005 - ALEXANDER, P. Chemical protection in chemical systems. In. RADIATION research: proceedings of the 2nd. international congress, Harrogate, 1962. (Separata).
- 006 - ANBAR, M. Water and aqueous solutions. In: AUSLOOS, P., ed. Fundamental processes in radiation chemistry. New York, Wiley Interscience, 1968. p.651-85.
- 007 - ANBAR, M. & NETA, P. A compilation of specific bimolecular rate constants for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution. Int. J. Appl. Radiat. Isot., 18:493-523, 1967.

- 008 - ANBAR, M.; BAMBENEK, M.; ROSS, A.B. Selected specific rates of reactions of transients from water in aqueous solutions. I. Hydrated electron. Washington, D.C., National Bureau of Standards, 1973. (COM-73-50537).
- 009 - ANBAR, M.; FARHATAZIZ, R.; ROSS, A.B. Selected specific rates of reactions of transients from water in aqueous solution. II Hydrogen atom. Washington, D.C., National Bureau of Standards, 1975. (COM-75-10617/96A).
- 010 - ANBAR, M.; MEYERSTEIN, D.; NETA, P. Reactivity of aliphatic compounds towards hydroxyl radicals. J. Chem. Soc., B. 742-7, 1966.
- 011 - BACHOFER, C.S. & POLLINGER, M.A. J. Gen. Physiol., 37:663, 1954 apud NAKKEN, K.F. Radical scavengers and radio-protection. Curr. Top. Radiat. Res., 1:49-92, 1965.
- 012 - BIELSKI, B.H.J. & GEBICKI, J.M. Species in irradiated oxygenated water. Adv. Radiat. Chem., 2:177-279, 1970.
- 013 - BISBY, R.H. & CUNDALL, R.B.; ADAMS, G.E.; REDPATH, J.L. Selective free radical reactions with proteins and enzymes: The inactivation of substilisin Carlsberg and substilian Novo. J. Chem. Soc. Faraday Trans., 70:2210-8, 1974.
- 014 - BONIFACIO, M.; SCHAFER, K.; MOCKEL, H.; ASMUS, K. - D. Primary steps in the reactions of organic disulfides with hydroxyl radicals in aqueous solutions. J. Phys. Chem., 79(15):1496-502, 1975.
- 015 - BRAAMS, R. A mechanism for the direct action of ionizing radiations. Nature, 200:752-4, 1963.

- 016 - BRESLER, S.E.; NOSKIN, L.A.; STEPANOVA, I.M.; KUZOVLEVA, N.A. Mechanism of radioprotection of chemical compounds on "escherichia coli" cells. Mol. Gen. Genet., 163:75-85, 1978.
- 017 - BRIGELIUS, R.; MUCKEL, C.; AKERBOOM, T.P.M.; SIES, H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. Bioche. Pharmacol., 32:2529-34, 1983.
- 018 - BUTLER, J.; LAND, E.J.; SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem., 24: (3/4):273-82, 1984.
- 019 - BUTLER, J.; LAND, E.J.; PRUTZ, W.A.; SWALLOW, A.J. Charge transfer between tryptophan and tyrosine in proteins. Biochem. Biophys. Acta, 705:150-62, 1982.
- 020 - BUXTON, G.V. Basic radiation chemistry of liquid water. In: Study fast processes transient species electron pulse radiolysis. New York, Plenum, p. 241-66, 1982. (NATO Advanced Study Institute series C, 86).
- 021 - BUXTON, G.V. Nanosecond pulse radiolysis of aqueous solutions containing proton and hydroxyl radical scavengers. Proc. R. Soc. (London), Ser. A. 328:9-21, 1972.
- 022 - CHANDERKAR, L.P.; GURNANI, S.; NADKARNI, G.B. The involvement of aromatic amino acids in biological activity of bovine fibrinogen as assessed by gamma-irradiation. Radiat. Res., 65:283-91, 1976.

- 023 - CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J.M.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine et du de "crotalus durissus terrificus" var "crotaminicus"./ I./Sur préparations neuromusculaire in situ. Toxicon, 9:279-86, 1971.
- 024 - CHEYMOL, J.; GONÇALVES, J.M.; BOURILLET, F.; ROCH-ARVEILLER M. Action neuromusculaire comparée de la crotamine e du venin de "crotalus durissus terrificus" var "crotaminicus"./II./Sur préparations isolées. Toxicon, 9:287-89, 1971.
- 025 - CONTI, M.A.B.; GIGLIO, J.R.; LAURE, C.J. Pontes dissulfeto da crotamina alfa. In: Sociedade Brasileira para o Pro- gresso da Ciência: resumos da 32 Reunião Anual, Rio de Janeiro, R.J., Jul. 6-12, 1980. Ciênc. Cult. (São Paulo) Supl., 32(7):855, 1980.
- 026 - COPERLAND, E.S. Mechanism of radioprotection. A review. Photochem. Photobiol., 28:839-44, 1978.
- 027 - COYLE, P.J.; DAITON, F.S.; LOGAN, S.R. The probable relaxation in time of the ionic atmosphere of the hydra- ted electron. Proc. R. Soc. London: 219, 1964.
- 028 - CZAPSKI, G. The hydroperoxy radical in aqueous solutions. Isr. J. Chem., 10:987-97, 1972.
- 029 - CZAPSKI, G. On the use of OH scavengers in biological systems. Isr. J. Chem., 24:29-32, 1984.
- 030 - CZAPSKI, G. & ILAN, Y.A. On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the Haber-Weiss reaction be source of OH radicals. Photochem

Photobiol., 28:651-3, 1978.

- 031 - DEWHURST, H.A.; SAMUEL, A.H.; MAGEE, J.L. A theoretical survey of the radiation chemistry of water and aqueous solutions. Radiat. Res., 1:62-83, 1954.
- 032 - DORFMAN, L.M. & ADAMS, G.E. Natl. Stand. Ref. Data Ser. Nat Stand, 46:23-5, 1972 apud PRYOR, W.A. ed. Free radicals in biology. New York, Academic, 1977, v.3 p.50.
- 033 - DORFMAN, L.M. & TAUB, I.A. Pulse radiolysis studies./III./ Elementary reactions in aqueous ethanol solution. J. Am. Chem. Soc., 85:2370-4, 1963.
- 034 - DRAGANIC, I.G. & DRAGANIC, Z.D. The radiation chemistry of water New York, Academic, 1971.
- 035 - ELLMAN, G.L. Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82:70-7, 1959.
- 036 - FARAGGI, M.; KLAPPER, M.H.; DORFMAN, L.M. Fast reaction kinetics of one-electron transfer in proteins. The histidyl radical. Mode of electron migration. J. Phys. Chem., 82(5):508-12, 1978.
- 037 - FARHATAZIZ, R. & ROSS, A.B. Selected specific rates of reactions of transients from water in aqueous solution./III./Hydroxyl radical and perhydroxyl radical and their ions. Washington, D.C., G.P.O., 1977. (PB-263198); (NSRDS-NBS, 59).
- 038 - FELDBERG, R.S. & CAREW, J.A. Water radiolysis products and nucleotide damage in γ -irradiated DNA. Int. J. Radiat. Biol., 40(1):11-17, 1981.

- 039 - FERRADINI, C. Kinetic behaviour of the radiolysis products of water. Adv. Inorg. Chem. Radiochem., 3:171-205, 1961.
- 040 - FLOHE, L. Glutathione peroxidase brought into focus. In: PRYOR, W.A., ed. Free radicals in biology. New York, Academic, v.5, p.223-54, 1981.
- 041 - GARRISON, W.M. Reaction mechanism in the radiolysis of peptides, polypeptides and proteins. Chem. Rev., 87:381-98, 1987.
- 042 - GONÇALVES, J.M. & POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. Arch. Biochem., 13:253-9, 1947.
- 043 - GONÇALVES, J.M. & VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras /I./Análise eletroforética. An. Acad. Bras. Ciênc., 22(1):141-9, 1950.
- 044 - GORDON, S.; HART, E.J.; MATHESON, M.S.; RABANI, J.; THOMAS, J.K. Reaction constants of the hydrated electron. J. Am. Chem. Soc., 85:1375-7, 1963.
- 045 - GREENSTOCK, C.L. Oxy-radicals and the radiobiological oxygen effect. Isr. J. Chem., 24:1-10, 1984.
- 046 - HAJOS, G.Y.; DELINCHEE, H. Structural investigation of radiation-induced aggregates of ribonuclease. Int. J. Radiat. Biol., 44(4):333-42, 1983.
- 047 - HAFE, O.G. Self-association of cromatomine: a study of models. Brazilian J. Med. Biol. Res., 18(5/6):766A, 1985.
- 048 - HAMPE, O.G. & BAPTISTA, A. Study of crotamine self-association by disc polyacrylamide gel electrophoresis. Brazilian J. Med. Biol. Res., 18(5/6), 1985.

- 049 - HAMPE, O.G. & GONÇALVES, J.M. Optical rotatory dispersion of crotamine: effect of denaturants. Polymer, 17:638, 1976.
- 050 - HART, E.J. & ANBAR, M. The hydrated electron. New York, Wiley-Interscience, 1970.
- 051 - HART, E.J. & FIELDEN, E.M. Submicromolar analysis of hydrated electron scavengers. Adv. Chem., 50:253-62, 1965.
- 052 - HENRIKSEN, T. Effect of the irradiation temperature on the production of free radicals in solid biological compounds exposed to various ionizing radiations. Radiat. Res., 27:694-709, 1966.
- 053 - HOFFMAN, M.Z. & HAYON, E. Pulse radiolysis study of sulfhydryl compounds in aqueous solution. J. Phys. Chem., 77(8):990-6, 1973.
- 054 - KRALJIC, i. & TRUMBORE, C.N. p-Nitrosodimethylaniline as an OH radical scavenger in radiation chemistry. J. Am. Chem Soc., 87(12):2547-50, 1965.
- 055 - HUTCHINSON, F. Sulfhydryl groups and the oxygen effect on irradiated diluted solutions of enzymes and nuclei acids. Radiat. Res., 14:721-31, 1961.
- 056 - JONAH, C.D. & MILLER, J.R. Yield and decay of the OH radical from 200ps to 3ns. J. Phys. Chem., 81:1974-6, 1977.
- 057 - JONAH, C.D.; MATHESON, M.S.; MILLER, J.R.; HART, E.J. Yield and decay of the hydrated electron from 100ps to 3ns. J. Phys. Chem., 80:1267-70, 1976.

- 058 - JORTNER, J.; OTTOLENGHI, M.; RABANI, J.; STEIN, G. In: RADIATION research: abstracts of the 2nd. int. congr. Harrogate, 1962. p.74 apud NAKKEN, K.F. Radical scavengers and radioprotection. Curr. Top. Radiat. Res., 1:49-92, 1965.
- 059 - KLAYMAN, D.L. & COPELAND, E.S. The desing of antiradiation agents. In: ARIENS, E.J., ed. Drug and desing., New York, Academic, v.6; c.2, p.81-142, 1975.
- 060 - KLOTZ, C.E. Energy deposition mechanism. In: AUSLOOS, P., ed. Fundamental process in radiation chemistry., New York, Willey-Interscience, p.1-57, 1968.
- 061 - LAMPE, F.W.; FIELD, F.H.; FRANKLIN, J.L. Reactions of gaseous ions./IV./Water. J. Am. Chem. Soc., 79:6132-5, 1957.
- 062 - LAURE, C.J. Die Primärstruktur des Crotamins. Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 356:213-5, 1975.
- 063 - LIVESEY, J.C. & REED, D.J. Meassurement of glutathione-protein mixed disulfides. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 10: (Suppl), 1984.
- 064 - LOMAN, H. & BLOK, J. On the radiation chemistry of thymine in aqueous solution. Radiat. Res., 36:1-13, 1968.
- 065 - LOMAN, H.; VOOGD, S.; BLOK, J. Indirect radioprotection by sulfhydryl compounds: A model chemical system. Radiat. Res., 42:437-45, 1970.
- 066 - MAGEE, J.L. & CHATTERJEE, A. A spur unfolding model for the radiolysis of the water. Radiat. Phys. Chem., 15:125-32, 1980.

- 067 - MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry., 2:235, 1965.
- 068 - MANCINI, G.; VAERMAN, J.P.; CARBONARA, A.O.; HEREMANS, J.F. A single radial diffusion method for the immunological quantitation of protein. In: PETERS, H. ed. Frot. Biol. Fluids: Lith Colloque, 1964. Oxford, Pergamon, p.370-3, 1964.
- 069 - MATHESON, M.S. & RABANI, J. Pulses radiolysis of aqueous hydrogen solutions. I. Rate constants for reaction e_{aq}^- with itself and other transients./II./ The interconvertibility of e_{aq}^- and H^1 . J. Phys. Chem., 69:1324-35, 1965.
- 070 - MILLER, G.L. Protein determination for large number of samples. Anal. Chem., 31:964, 1959.
- 071 - NAGATA, C. & YAMAGUSHI, T. Electronic structure of sulfur compounds and their protecting radiation. Radiat. Res., 73:430-9, 1978.
- 072 - NAKKEN, K.F. Radical scavengers and radioprotection. Curr. Top. Radiat. Res., 1:49-92, 1965.
- 073 - OHNO, T.; NISHIMURA, T.; NAKANO, K.; KANEKO, I. Differential recovery from potentially lethal damage in normal human lung fibroblast after irradiation with Co-60 - rays and accelerated N-ion beam. Int. J. Radiat. Biol., 45:21-6, 1984.
- 074 - OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Prog. Allergy., 5:1-78, 1958.

- 075 - DUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. Prog. Allergy., 6:30-154, 1962.
- 076 - DUCHTERLONY, O. Quantitative immunoelectrophoresis. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl., 154:252, 1962.
- 077 - PACKER, J.E. & WINCHESTER, R.V. ^{60}Co -radiolysis of oxygenated aqueous solutions of cysteine at pH7. Can. J. Chem., 48:417-21, 1970.
- 078 - PELLEGRINI FILHO, A. Contribuição ao estudo da ação da crotamina no musculo esquelético., Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, 1976. (Tese de Doutorado).
- 079 - PELLEGRINI FILHO, A.; VITAL BRAZIL, O., FONTANA, M.D.; LAURE, C.J. The action of crotonamine on skeletal muscle: an electrophysiological study. In: ROSENBERG, P. ed. Toxins: animal plant and microbiol., London, Pergamon, 1978 apud VITAL BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Bras., 26(6):212-8, 1980.
- 080 - PIHL, A. & SANNER, T. Chemical protection against ionizing radiation by sulphur-containing agents. In: MOROSON, H.L. & QUINTILIANI, M., eds. Radioprotection and sensitization., London, Taylor and Francis, p.43-55, 1970.
- 081 - PRUTZ, W.A.; SIEBERT, F.; BUTLER, J.; LAND, E.J.; MENEZ, A.; MONTENAY-GARESTIER, T. Charge transfer in peptides. Intramolecular radical transformations involving methionine, tryptophan and tyrosine. Biochim. Biophys. Acta, 705:139-49, 1982.
- 082 - PRYOR, W.A. Free radicals in biology. New York, Academic, v.3, 1977.

- 083 - FURDIE, J.E. -Radiolysis of cysteine disulfide in aqueous solution. Can J. Chem., 49:725-30, 1971.
- 084 - RABANI, J. & STEIN, G. The reactivity of OH radicals with ferro-ferricyanide, formate, ethanol and amino acids in irradiated solutions. Trans. Faraday Soc., 58:2150-9, 1962.
- 085 - RELEIGH, J.A. & SHUM, F.Y. Radioprotection in model lipid membranes by hydroxyl radical scavengers: supplementary role for α -tocopherol in scavenging secondary peroxy radicals. In: NYGAARD, O.F. & SINIC, M.G., eds. Radioprotectors and anticarcinogens., New York, Academic, p.87-102, 1983.
- 086 - REVESZ, L.; EDGREN, M.; NISHIDAI, T. Mechanism of interest radioprotection in mammalian cells. In: SUGAHARA, T., ed. Modification of radiosensitivity in cancer treatment. New York, Academic, c.2, p.13-29, 1984.
- 087 - SENNER, T. Transfer of radiation energy from macromolecules to sulfur compounds. A comparison between the trapping efficiency of a thiol and its corresponding disulfide. Radiat. Res., 44:494-604, 1970.
- 088 - SAWYER, D.T. & VALENTINE, J.S. How super is superoxide? Acc Chem. Res., 14:393-400, 1981.
- 089 - SCHENBERG, S. Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantã. Mem. Inst. Butantã, 20:213-26, 1959.
- 090 - SCHENBERG, S. Geophysical patteredu distribution in the same rattlesnake subspecies. Science, 129:1361, 1959 apud

- VITAL BRAZIL, D. Venenos ofidicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Bras., 26(6):212-8, 1980.
- 091 - SCHUSSLER, H.; FREUNDL, K. Reactions of formate and ethanol radicals with bovine serum albumin studied by electrophoresis. Int. J. Radiat. Biol., 44(1):17-29, 1983.
- 092 - SCHUSSLER, H. & HERGET, A. Oxygen effect in the radiolysis of proteins./I./ Lactate dehydrogenase. Int. J. Radiat. Biol., 37(1):71-80, 1980.
- 093 - SCHWARZ, H.A. Applications of the spur diffusion model to the radiation chemistry of aqueous solutions. J. Phys. Chem., 73:1928-37, 1969.
- 094 - SHAPIRO, A.L.; VINUELA, E.; MATZEL, J.B. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28: 815, 1967.
- 095 - SINGH, A. & 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.
- 096 - STEIN, G. & SWALLOW, A.J. The biological action of ionizing radiation from the point of view of radiation chemistry. In: DEHEVESY, G.C.; GUNNER, A.F.; ABBATT, J.D., eds. Advances in radiobiology. Edinburg, Oliver & Boyd, p.16-21, 1956.
- 097 - SWEET, J.P. & THOMAS, J.K. Absolute rate constants for H atom reactions. J. Phys. Chem., 63:1363-8, 1964.

- 098 - THOMAS, J.K. Rate of reaction of the hydroxyl radical.
Trans. Faraday Soc., 61:702-7, 1965.
- 099 - THOMAS, J.K.; RABANI, J.; MATHESON, M.S.; HART, E.J.;
GORDON, S. Absorption spectrum of the hydrogen radical.
J. Phys. Chem., 70:2409-10, 1966.
- 100 - VITAL BRAZIL, O.; PRADO-FRANCHESI, J.P.; LAURE, C.J.
Repetitive muscle responses induced by crotamine.
Toxicon, 17:61, 1979 apud VITAL BRAZIL, O. Venenos ofi-
dicos neurotóxicos. Rev. Ass. Med. Bras., 26(6):212-8,
1980.
- 101 - WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight
determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
electrophoresis. J. Biol. Chem., 244(16):4406-12, 1969.
- 102 - WILKENING, V.G.; LAL, M.; ARENDS, M.; ARMSTRONG, D.A. The
cobalt-60 radiolysis of cysteine in denaturated aqueous
solution at pH between 5 and 6. J. Phys. Chem.,
72(1):185-90, 1968.
- 103 - WOODWARD, T.W. & SUTTON, H.C. Radiolysis of aqueous
solution containing nitric oxide and aliphatic alcohols.
Trans. Faraday Soc., 62:70-80, 1966.
- 104 - YAMAMOTO, O. Radiation-induced binding of cysteine and
cystine with aromatic amino acids of serum albumin in
aqueous solution. Int. J. Rad. Phys. Chem., 4(2):227-36,
1972.