

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

**Radiosensibilidad y radioprotección : acción de las
radiaciones gamma sobre mucoproteínas "ovomucoide"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Carmen Fuster Monescillo

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322350458

T1

S44

FUJ

UNIVERSIDAD DE MADRID
Facultad de Ciencias - Sección de Químicas

RADIOSENSIBILIDAD Y RADIOPROTECCIÓN.

ACCION DE LAS RADIACIONES GAMMA SOBRE

MUCOPROTEINAS "OVOMUCOIDE"

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro ...33.211.....

T E S I S

Para aspirar al grado de Doctor en Ciencias

por

M^º del Carmen Fdster Monescillo

Instituto de Química Física "Rocasolano"

M a d r i d, abril 1962.

Esta tesis ha sido realizada en el Instituto de Química Física "Rocasolano" C.S.I.C. y dirigida por la Dra. María Domínguez Astudillo, Jefe de RADIOBIOLOGÍA de dicho Instituto, en colaboración con el Profesor D. Félix Sanz Sánchez, Catedrático de Farmacología de la Facultad de Veterinaria y - Jefe de la sección de Farmacología del Instituto de Investigaciones Veterinarias C.S.I.C.

La irradiación de las proteínas la hemos -- efectuado en el Instituto del Cáncer con agujas de radio, en el Hospital de S. Francisco (V.O.T.) con Co^{60} (cobalto) y en el ENCIN, campo de experimentación gamma del Instituto de Investigaciones Agronómicas con Cs^{137} (cesio).

Nos complacemos en expresar nuestro agradecimiento a la Dra. Astudillo y al Profesor Sanz por sus muchas enseñanzas y valiosa ayuda durante la realización de este trabajo.

Igualmente agradecemos al Excmo. Sr. D. Antonio Rius, Director de este Instituto la acogida en el mismo como becaria, y a los Directores de los distintos centros donde hemos irradiado por las -

facilidades que se nos han dado para utilizar las fuentes de irradiación.

Así mismo damos las gracias a nuestros compañeros de laboratorio por su ayuda en algunas técnicas.

Madrid, marzo 1962.

CONTENIDO

- I - INTRODUCCION
- II - REVISION BIBLIOGRAFICA
- III - PARTE EXPERIMENTAL. RESULTADOS.
- IV - DISCUSION DE DATOS Y RESULTADOS.
- V - CONCLUSIONES.
- VI - BIBLIOGRAFIA.

I - INTRODUCCION

II - REVISION BIBLIOGRAFICA.

A - II. Mucoproteínas. Ovomucoide.

II-a₁. Mucoproteínas.

II-a₂. Ovomucoide: generalidades.

II-a₃. Composición elemental y en aminoácidos.

II-a₄. Composición en carbohidratos.

II-a₅. Obtención.

II-a₆. Purificación y propiedades.

B - II. Acción de las radiaciones ionizantes en los sistemas biológicos.

II-b₁. Acción directa e indirecta de la radiación ionizante.

II-b₂. Acción de las radiaciones ionizantes sobre aminoácidos, carbohidratos y proteínas.

b₂' . Acción sobre aminoácidos.

b₂'' . Acción sobre carbohidratos.

b₂''' . Acción sobre proteínas.

II-b₃. Criterios para detectar los cambios físico-químicos en las proteínas al ser irradiadas.

C - II. Estudio e interpretación de los cambios en el espectro de absorción en el ultravioleta de proteínas.

- II-c₁. Estudios generales sobre el espectro ultravioleta.
- II-c₂. Espectro ultravioleta de aminoácidos y proteínas.
- II-c₃. Espectro ultravioleta de proteínas irradiadas. Análisis de la difusión Rayleigh.

D - II. Radiosensibilidad y radioprotección química.

- II-d₁. Generalidades.
- II-d₂. Sustancias radioprotectoras.
- II-d₃. Mecanismos de acción de las sustancias radioprotectoras.
- II-d₄. El bromuro del hidrobromuro de 2-amino-etil-isotiuronio (AET) como radioprotector.

III - PARTE EXPERIMENTAL. RESULTADOS: TABLAS Y GRÁFICAS.

A - III. Obtención y análisis del ovomucoide.

III-a₁. Obtención y purificación.

III-a₂. Análisis elemental, determinación de grupos NH₂, exosaminas y aminoácidos como índices para conocer los cambios sufridos por las proteínas al ser irradiadas.

III-a₃. Espectro de absorción en el ultravioleta del ovomucoide, diversos aminoácidos y glucosamina. Determinación por espectro de absorción en el ultravioleta de la relación tirosina a triptofano existente en el ovomucoide.

B - III. Irradiación: fuentes, dispositivos y dosis.

III-b₁. Fuentes de irradiación.

III-b₂. Dosimetría y dosis aplicadas.

C - III. Irradiación de aminoácidos y glucosamina.

III-c₁. Espectro de absorción en el ultravioleta de diversos aminoácidos y de glucosamina irradiados con diferentes dosis y su com-

paración con los espectros normales.

III-c₂. Determinación de la relación tirosina a triptofano en el ovomucoide después de la irradiación.

III-c₃. Análisis de la difusión Rayleigh en los espectros de las sustancias anteriores.

D - III. Radiosensibilidad del ovomucoide comparada con la de la seroalbúmina bovina, ovoalbúmina y glicoproteína bovina (fracción VI).

III-d₁. Determinación de grupos NH₂ y glucosamina en las proteínas indicadas, antes y después de irradiar.

III-d₂. Espectro de absorción en el ultravioleta de dichas proteínas antes y después de irradiar.

E - III. Radioprotección de estas proteínas por el hidrobromuro del bromuro de 2-amino-etil-iso-tiuronio. (AET).

III-e₁. Espectro de absorción en el ultravioleta del AET y del ovomucoide protegido por el AET y a las distintas dosis de radiación.

III-e₂. Análisis de la difusión Rayleigh del AET irradiado, del ovomucoide y del ovomucoi-

de protegido por el AET.

III-e₃. Radioprotección de las cuatro proteínas anteriormente indicadas por el AET.

IV - DISCUSION DE DATOS Y RESULTADOS.

V - CONCLUSIONES.

VI - BIBLIOGRAFIA.

I- INTRODUCCION

Los múltiples y complejos problemas que enmarca la Radiobiología, ponen en interdependencia a la Física, Química, Biología, y Ciencias Médicas y en consecuencia son varias las ramas de Investigación a quienes esta materia pone en juego.

Algunas de las modernas escuelas radiobiológicas trabajan especialmente sobre el aspecto químico de las radiaciones ionizantes y sobre como se producen los efectos biológicos, para prevenirlos por agentes químicos.

Apoyandonos en las publicaciones y orientación de estas escuelas, hemos estudiado con los medios que han estado a nuestro alcance, la radiosensibilidad de una mucoproteína típica "ovomucoides", y su radioprotección por el hidrobromuro del bromuro de 2-amino-etil-isotiuronio (AET).

Como dicha proteína contiene gran cantidad de carbohidratos, pensamos que su radiosensibilidad diferiría de la de otras proteínas, tales como la seroalbúmina y ovoalbúmina que habían sido las más estudiadas a este respecto, además de que no habíamos encontrado referencias sobre la irradiación de estas proteínas conjugadas.

Comenzamos por obtener el ovomucoide con el mayor grado de pureza posible, examinada por varios métodos. Posteriormente determinamos en esta proteína, así como en la ovalbúmina, seroalbúmina, y glicoproteína bovina, ciertos índices de referencia antes y después de irradiar, tales como, grupos $-SH$, $-NH_2$, exosaminas y espectro de absorción en el ultravioleta con el correspondiente análisis de la difusión Rayleigh. Estas experiencias fueron repetidas aplicando el radioprotector AET previamente a la irradiación.

Fundamentalmente observamos que, el ovomucoide debido a su composición química es la proteína menos radiosensible y la que menos se protege por el AET.

II - REVISION BIBLIOGRAFICA

A - II. Mucoproteínas. Ovomucoide.

II-a₁. Mucoproteínas.

En 1955 KENT y WHITEHOUSE estudian detenidamente las mucosustancias del huevo de gallina y PELAEZ V. F. (1958) hace una revisión de lo publicado sobre mucoproteínas en general.

Estas sustancias son aquellas que contienen cuatro por ciento o más de aminoazucares.

Las mucoproteínas solubles no son fácilmente desnaturalizadas por calor, ni fácilmente precipitadas por los precipitantes comunes de proteínas WHITE, A. y colab. (1954).

Una de las clasificaciones que se dan de las mucosustancias y que consideramos más completa por abarcar toda clase de mucocompuestos es la siguiente:

Mucopolisacaridos: polisacaridos y agrupaciones nitrogenadas.

Mucolípidos: lípidos y carbohidratos.

Mucoproteínas: proteínas y carbohidratos.

Mucolipopolisacaridos: polisacaridos y lípidos.

Mucolípidos protéicos: lípidos, proteínas y carbohidratos.

En los grupos anteriores no van incluidos los

nucleoproteidos que en cierto modo estan relacionados tambien con las mucosustancias.

Los proteidos contienen, unido más o menos fuertemente a una proteina típica, un grupo no proteínico, denominado grupo prostético.

Los glicoproteidos y mucoides son compuestos de proteínas y mucopolisacáridos. No existe aún para este grupo una nomenclatura reconocida de carácter general. Como glicoproteidos se designan compuestos, cuyo grupo hidrocarbonado contiene poca cantidad de exosamina, menos del cuatro por ciento según MEYER, K. (1945). Los mucoides son más ricos en exosaminas, estan muy difundidos y se encuentran especialmente en la mucosa intestinal, en la clara de huevo y en la saliva.

El ovomucide es una mucoproteina típica por su contenido en carbohidratos.

II-a₂. Ovomucide: generalidades.

El ovomucide llamado en la nomenclatura de MEYER (1945) ovomucide alfa, es una de las mucoproteínas clásicas que existe en la clara de huevo y quizas es una de las mejor estudiadas. Por su gran cantidad de carbohidratos tiene una gran solubilidad y estabilidad, posee gran resistencia al calor y a la acción precipitante de varios reactivos, por lo que se considera como una proteina muy estable.

Su peso molecular se ha calculado en 28.000 (FRAENKEL, H. y PORTER, R. R. en 1952).

Electroforéticamente es heterogeneo. El punto isoelectrico determinado por HESSELVIK (1938) fué obtenido a 4,5, posteriormente otros investigadores hallaron el punto isoelectrico a 4,3. El ovomucoide purificado por electroforesis en buffer de fuerza iónica 0,1 da un punto isoelectrico de 3,9. Este valor es algo más bajo que el encontrado para preparados de ovomucoide por desnaturalización diferencial por calor de las otras proteínas de clara de huevo. El ovomucoide purificado durante una hora a 100° a pH 3,9 en baja concentración salina da el punto isoelectrico a pH 4,2, que casi coincide con el valor de 4,3 encontrado por LONSWORTH, L. G. y colab. (1940), pero más bajo que el valor de HESSELVIK, Z. (1938) de 4,5. La falta de homogeneidad del ovomucoide preparado por tratamiento con calor, ha sido reconocida por LONSWORTH, CANNAN y MACINNES.

Las experiencias electroforéticas del ovomucoide a fuerza iónica 0,01 indican la presencia de dos componentes en el sistema, mientras que a fuerza iónica 0,1 solo aparece uno. Las preparaciones de ovomucoide calentadas a 100°C durante una hora no cambian sus propiedades electroforéticas en buffer de veronal a pH 8,6.

La concentración del ovomucoide en la clara es

aproximadamente del trece al quince por ciento de peso seco, deducido por medidas electroforéticas. Por aislamiento suelen obtenerse valores más bajos, MEYER (1938) obtiene el diez por ciento; otros autores obtienen valores más bajos, FREDERICQ y DEUTSCH (1949) dan el 2,42 por ciento para el ovomucoide purificado.

Es interesante señalar que el ovomucoide suficientemente purificado se desnaturaliza fácilmente, sobre todo por liofilización y diálisis, mientras que es particularmente resistente cuando está acompañado de las otras proteínas en la clara de huevo.

Según ROMANOFF (1949) el ovomucoide tiene las siguientes constantes: rotación específica $-61,6^{\circ}$ (MAZZA, 1930 y ONOC, 1936). El índice de refracción en el punto isoelectrico y en solución acuosa al uno por ciento, es aproximadamente de 1,3335. El índice de refracción está en razón directa de la concentración, y su medida ofrece un método exacto para determinar la concentración de la proteína en la solución.

Los estudios más completos sobre el ovomucoide se deben a FREDERICQ y DEUTSCH (1949) tanto en la forma de obtenerlo como en el estudio de sus propiedades.

II-a₃. Composición elemental y aminoácidos del ovomucóide.

YOUNG (1937) da la siguiente composición: N = 11,8% a 13,1 %; S total = 1,59-1,80 % y cistina = 3,95 %.

En general el estudio de los aminoácidos en el ovomucóide ha recibido muy poca atención.

Elementos y aminoácidos	ROMANOFF (1947) porcentaje	FEVOLD, HARRY L. (1951) porcentaje
Arginina	5,6	3,7
Cistina	6,2	6,7; 4,0; 6,3
Histidina	4,0	2,2
Lisina	1,6	6,0
Fenilalanina	4,0	2,9
Triptofano	2,2	0,3; 1,6; 2,0
Acido aspártico	1,8	13,0
Acido glutámico	2,0	6,1
Leucina	4,0	5,1
Metionina	1,7	0,9; 1,4
Prolina	2,4	2,7
Tirosina	4,7	3,4
Alanina		2,3
Isoleucina		1,4
Hidroxiprolina		0
Glicina		3,8

Elementos y aminoácidos	ROMANOFF (1947) porcentaje	FEVOLD, HARRY L (1951) porcentaje
Serina		4,2
Treonina		5,5
Valina		6,0
N-total	12,7	13,3; 13,5
N-amino		0,68
N-amido		1,0
Azufre	2,3	2,2; 2,3
Fósforo	0,3	
Carbono	48,6	
Oxigeno	29,1	
Manosa		9,7; 12,5; 10,2
Glucosamina		17,0; 12,6; 12,5; 13,5

II-a₄. Composición en carbohidratos.

La composición en carbohidratos es la que ha merecido más especial atención para esta proteína.

FRANKELY, JELLINCK (1927) fueron los primeros que indicaron que en la clara de huevo existía manosa que aislaron como fenilhidrazona, a la vez que glucosamina como glucosamina clorhídrica. Estas experiencias las hicieron sobre la clara total; obtuvieron en ellas una biosa compuesta de glucosamina y manosa entrelazadas a través del grupo amino de la glucosamina. Pocos años después LEVENE y MORI (1929) continuaron este trabajo y aislaron también glucosamina y manosa de la cla-

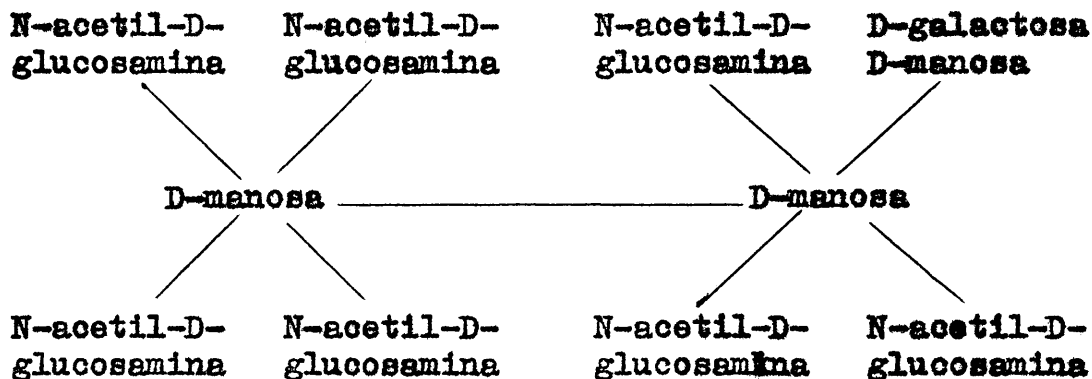
ra entera, de la albúmina cristalizada y del ovomucoide.

Por colorimetría ha encontrado KARLBERG (1936) el valor de 13,5 % para la glucosamina y del 10,2 para la manosa.

MASAMUNE y HOSHINO (1936) encontraron exosamina y manosa en proporción equimolecular.

Según KENT y WHITEHOUSE (1955) los constituyentes monosacáridos del ovomucoide que se han identificado son: D-manosa, D-galactosa y D-glucosamina (12 a 16 %). La metilación del carbohidrato (libre de material polipeptido por tratamiento con álcalis) fué hecha por STACEY y WOOLLEY (1940). La hidrólisis del carbohidrato metilado producía N-acetil-3:4:6-trimetil-D-glucosamina (siete moléculas), D-manopiranososa (dos moléculas), 3:4:6-trimetil-D-manopiranososa (una molécula) y tetrametil D-galactopiranososa.

Por ello dedujeron que el ovomucoide podía tener un núcleo de carbohidratos del siguiente tipo:



Composición en exosaminas del ovomucoide según diversos autores:

KARLBERG (1936)	13,5 %
YOUNG (1937)	9,7 a 12,1 %
HESSELVIK (1938)	12,5 %
FREDERICQ y DEUTSCH (1947). .	17,0 %
HARRY L. y FEVOLD (1951) . .	17,0; 12,6; 12,5; 13,5 %

II-a₅. Obtención del ovomucoide.

La mayor parte de los investigadores han aislado el ovomucoide de la clara de huevo coagulando las demás proteínas por el calor y recogiendo el líquido sobrenadante. De este líquido han precipitado el ovomucoide por alcohol o por sales amónicas (MEYER 1945).

También se ha obtenido el ovomucoide extrayendo las demás proteínas por agitación con cloroformo y alcohol amílico.

FREDERICQ y DEUTSCH (1949) lo obtienen a partir de la clara de huevo fresca precipitando con tricloroacetato sódico y fraccionando con alcohol. Posteriormente dializan contra agua destilada en el punto isoelectrico, liofilizan y por último secan en vacío a 60° C durante 24 horas.

El método que utilizan para la preparación del ovomucoide se basa en parte en su solubilidad relativamente grande en soluciones de tricloroacetato sódico. El ión picrato les daba también resultados satisfactorios a concentraciones aún más bajas que el ión tricloroace-

tato. Las demás proteínas de clara son relativamente insolubles en presencia de los anteriores iones y en valores de pH ácidos para sus puntos isoelectricos. El principal contaminante del ovomucoide en la solución sobrenadante es la ovoalbúmina.

Las soluciones obtenidas despues de la precipitación inicial con tricloroacetato, se dializan a pH 3,9 y el ovomucoide se recupera por liofilización:

FREDERICQ y DEUSCH (1949) esquematizan la obtención del ovomucoide en la siguiente forma:

1 litro de claras de huevos frescos y homogeneizadas

Ajustar el pH a 3,5 con sulfurico 1N y añadir un vol. de tricloroacetato sódico al 10 % pH final 3, al final volver a poner a 3,5 el pH a 25°C, dejar toda la noche. Decantar y centrifugar.

Precipitado I

descartar

Solución

Filtrar, añadir sol. de NaCl 0,5N hasta pH 6, poner a 0°C añadir 2 vol. de etanol del 95, preenfriado, temp. -6°C a -8°C dejar varias horas, decantar y filtrar.

Precipitado II

Ovomucoide (crudo)
disolver en agua a 0°C, dializar contra agua destilada 1-2 días a 0°C; ajustar pH 2,3; (0,02,NaCl) temp. 0°C; añadir 1 vol. de etanol del 95, preenfriado a -6°C, -8°C. Centrifugar.

Solución

descartar

Precipitado III

Reprecipitar en las mismas condiciones que en la parte II con etanol del 42 %

Solución

Preenfriar etanol del 95 % y añadir hasta concentración del 65 %, temp. -6°C, -8°C.

Precipitado II C

Ovomucoide purificado

Precipitado II B

Solución

descartar

Solución

descartar

II-a₆. Purificación y propiedades del ovomucoide.

El ovomucoide ha sido purificado por electroforesis de zona JUSTISZ y colab. (1957).

La pureza de varias preparaciones del ovomucoide de acuerdo con FREDERICQ y DEUTSCH fué valorada por cromatografía sobre papel y agar y por electroforesis en columna de celulosa. Todas las preparaciones estudiadas fueron heterogeneas. La electroforesis sobre columna de celulosa permitió separar el constituyente responsable de la actividad antitriptica, que estudiado por electroforesis de columna a pH próximo del punto isoelectrico y por inmunolectroforesis, parecía ser homogénea. La pureza del ovomucoide revelada por electroforesis de papel ha sido realizada por MIRKHAM y SMITH (1952) utilizando buffer veronal sódico 0,1 M; pH 8,2; duración seis horas; 6,5 voltios/ cm y revelada con azul de bromofenol seguida de elución.

B - II. Acción de las radiaciones ionizantes en los sistemas biológicos.

II-b₁. Acción directa e indirecta de la radiación ionizante.

El consumo de energía procedente de las radiaciones ionizantes es independiente de la constitución química del material irradiado y puede decirse que pesos iguales de las distintas materias del cuerpo, incluso el agua, absorben una misma cantidad de energía de una dosis de radiación dada. Muchos de los sistemas vivos contienen una gran cantidad de agua que puede componer hasta el 85 % del peso en un mamífero, en consecuencia, al irradiar un animal una gran parte de la energía se depositará inicialmente en el agua y una pequeña proporción será absorbida por los materiales que forman el cuerpo, piel, huesos, músculos, etc, así como por los sólidos disueltos en los líquidos orgánicos, tales como las proteínas de sangre. La energía absorbida por el agua no se desperdicia puesto que activa las moléculas disueltas que se ponen en su contacto.

Los cambios producidos por la reacción con las moléculas del agua activada se llaman acción indirecta de la radiación, en contraposición con aquellos cambios que ocurren cuando el material recibe directamente la radiación a los que se les llama acción directa.

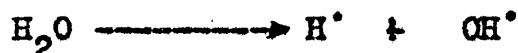
Los seres vivos del tipo de semillas y esporas que se pueden desecar sin que pierdan la vida, si son irra-

diados en ausencia de agua solo puede darse en ellos la acción directa. En la mayoría de los casos se dan al mismo tiempo la acción indirecta y la acción directa.

Los cambios químicos que inician una lesión biológica por radiación son causados por el agua activada o, por la energía depositada dentro del mismo material. Hasta hace poco se había creído que los factores externos no podían influir en los procesos debidos a la acción indirecta, puesto que se suponía que una vez que una molécula había absorbido la cantidad necesaria de energía tenían forzosamente que presentarse cambios químicos que no podían desviarse ni pararse. La molécula de agua activada tiene que recorrer cierta distancia antes de ser capaz de reaccionar y en este proceso puede quedar capturada por otras sustancia. Los materiales que la rodean pueden cambiar el curso de la acción indirecta y la adición de un compuesto que reaccione fácilmente con el agua activada puede actuar como protector, puesto que capturará alguna de las moléculas de agua activada antes de que esta se ponga en contacto con el material de importancia biológica. Otras sustancias especialmente el oxígeno pueden combinarse con el agua activada para producir todavía una entidad más activa que será más destructora, con lo cual la acción indirecta se intensificará. Otro modo de influir en la acción indirecta, es coartar el movimiento del agua activada por congelación, en este caso se impide al agua activada el que entre en contacto con la sustancia, que en caso contrario sería atacada.

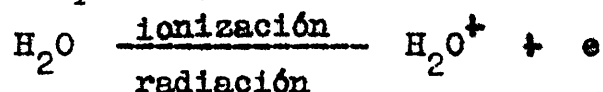
Desde el momento de que hasta cierto punto los efectos de la radiación pueden modificarse por factores externos se cree que la acción indirecta juega un papel muy importante, teniendo en cuenta la gran cantidad de agua que contienen los animales y la mayor parte de las células vivas. La contribución de la acción directa no puede tampoco despreciarse porque incluso pudiera ser más importante que lo que se podría pensar por la preponderancia del agua.

En 1923 RISSE uno de los primeros investigadores en este campo indicó que el agua por irradiación se disocia en radicales libres:



Estos como sabemos son entidades muy reactivas, puesto que no tienen la configuración electrónica que se requiere para moléculas estables. El H^\bullet tiene que perder un electrón para dar H^+ y el OH^\bullet tiene que ganar uno para convertirse en HO^- . Ambos iones son muy estables y no son muy reactivos. La gran actividad del agua activada se debe a estos radicales que atacan a la mayor parte de las sustancias orgánicas para dar una configuración electrónica normal. Si estos radicales no encuentran con quien reaccionar se combinan entre sí y pueden permanecer en solución durante menos de una milésima de segundo.

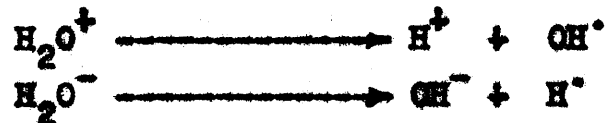
Se forman los radicales libres cuando la partícula ionizante al pasar por el agua emite un electrón para formar un ión positivo:



el electrón es entonces capturado para dar un ión negativo:



el cual completa la formación de iones, pero ninguno de estos es estable y se descompone inmediatamente del modo siguiente:



para producir dos radicales libres y dos iones H^+ y OH^- que se vuelven a combinar para dar agua.

La acción indirecta puede interpretarse satisfactoriamente en términos de la reacción de los radicales libres formados en el agua y el ataque de estos sobre otras sustancias.

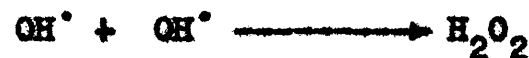
Estas reacciones se encuentran siempre en competición con la tendencia de los radicales a volverse a combinar para formar agua:



gas hidrogeno



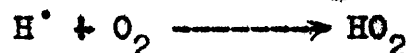
o agua oxigenada



que es molécula estable, que puede reaccionar con muchas sustancias. Su formación dentro de estructuras sensibles tales como el núcleo de la célula puede ser muy peligrosa y causar efectos malignos.

Experiencias químicas han demostrado que el oxígeno reacciona muy rápidamente con el radical hidrogeno formado por la acción indirecta de la radiación pa-

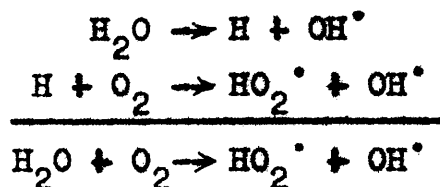
ra producir otro radical el HO_2 :



y el oxígeno también aumenta la cantidad de agua oxigenada producida por las radiaciones de baja ionización específica, muchas de las reacciones químicas producidas por los radicales libres en el agua se presentan preferentemente cuando hay oxígeno.

Según ALEXANDER y FOX (1953) en presencia de oxígeno, la irradiación de agua con rayos X produce agua oxigenada y radicales HO_2 . Estos últimos pueden formarse según

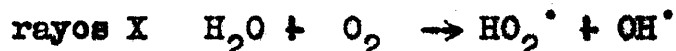
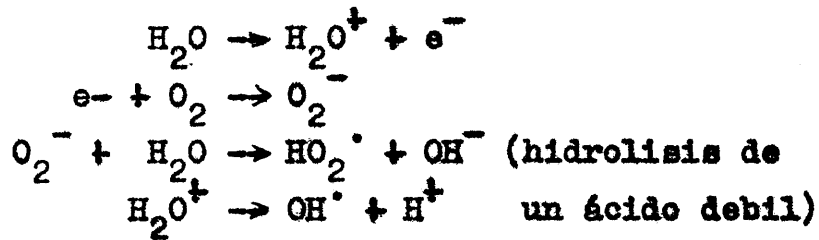
Rayos X



Rayos X

suponiendo que la formación de átomos de hidrógeno no sea segura, la misma reacción general puede formularse de la siguiente forma:

Rayos X

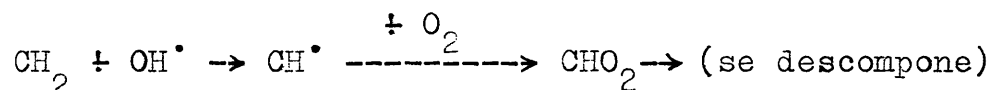


Es interesante saber el papel de los radicales formados al irradiar en solución acuosa, el problema es encontrar que radical libre es responsable de la ruptura de la molécula.

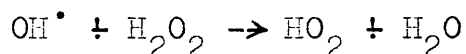
ALEXANDER estudia, para investigar este punto, el ácido polimetacrílico, y saca la conclusión de que los

principales radicales formados en el agua, el OH y probablemente el H, no producen degradación. Esto no prueba que un radical OH no reacciona con el polímero, sino solamente que no produce reacción de ruptura de la cadena de polímero.

Estas experiencias indican que la degradación es producida por los radicales HO₂, o que es el resultado de dos reacciones sucesivas que comprenden un radical OH y oxígeno:



que conduce a la formación de un peróxido inestable. Es posible hacer una distinción entre estas dos posibilidades para determinar la influencia del H₂O₂ sobre la degradación. Si la reacción se efectúa bajo la influencia del agua oxigenada, se formarían radicales HO₂ por la reacción:



Poco se conoce sobre la reactividad del radical HO₂. Es posible que se produzcan un hidroperóxido inestable, que al descomponerse rompa las cadenas de polímeros. El mecanismo de la ruptura de las cadenas está en estudio.

Los efectos químicos de las radiaciones ionizantes sobre sistemas acuosos pueden considerarse influenciados por la presencia de oxígeno molecular (WEISS, 1959). El oxígeno puede, en general, no solo aumentar la extensión de la oxidación por radiación como se ha

probado en muchos casos, sino que puede también conducir a una diferenciación cualitativa en la naturaleza de los productos de la radiación. Se ha supuesto que este efecto es principalmente debido a la formación de radicales de peróxidos orgánicos (RO_2^\cdot) que se forman por la asociación de radicales orgánicos (R) con oxígeno molecular



En particular, se ha encontrado que, en presencia de oxígeno molecular, pueden formarse hidroperóxidos orgánicos.

II-b₂. Acción de las radiaciones ionizantes sobre aminoácidos, carbohidratos y proteínas.

b'₂. Acción sobre aminoácidos.

Por irradiación de tirosina, fenilalanina y triptofano (LOSELEUR, 1955) se producen sustancias de más alto peso molecular y como estas se producen en los aminoácidos aromáticos, es posible que sean dímeros del tipo difenilo. La desaminación de tirosina tiene lugar tan pronto como se ataca el núcleo, se forman amoniaco y 3, 4 dopa, tiramina y 2, 4 dopa se producen en cantidades despreciables, o no se producen. Hay indicaciones de que se forma ácido p-hidroxifenolpirúvico y de que el dopa sufre posteriores oxidaciones a algunos derivados coloreados (ROWBOTTON, 1955). La concentración de 3-4 dopa, se mide colorimétricamente, y en soluciones de tirosina irradiadas aumenta después de cesar la irradiación.

En varios experimentos cuantitativos sobre la formación de dopa, aproximadamente la tercera parte de la tirosina destruida en la irradiación fué convertida en 3-4 dopa.

La tirosina y la dihidroxifenilalanina así como otras sustancias comunmente usadas de sustratos para peroxidasas, han sido irradiadas en solución acuosa conteniendo oxígeno, para demostrar que el efecto de las radiaciones ionizantes es a menudo similar al de la peroxidasa (LOISELEUR, 1943).

La histidina irradiada da histamina. La histidina es también desaminada probablemente por escisión del anillo.

Medidas espectroscópicas de arginina irradiada muestran que se produce urea, y la leucina da ácido isovaleriánico.

Desde algunos puntos de vista es de interés conocer la cantidad de material descompuesto por la irradiación más bien que los productos obtenidos, y tales informaciones han sido dadas para soluciones acuosas de aminoácidos por PROCTOR y BHATIA, 1952.

La rapidez con que los tioles son afectados por la radiación se debe principalmente a la facilidad con que son oxidados.

La cisteína (SWALLOW, 1952) ha sido oxidada por la radiación ionizante. El principal producto de oxidación es el correspondiente disulfuro (WHITCHER, y col, 1953).

Existe una mayor oxidación si hay presente oxi-

geno disuelto, y un aumento en el pH dentro de ciertos límites es también favorable a la oxidación.

La oxidación aumenta con la concentración de tiol, y esta gran oxidación hace suponer una reacción en cadena.

La cantidad de H_2O_2 formada en soluciones de cisteína irradiada es más grande que en agua pura, excepto en solución alcalina (LATARJET, y col 1952).

La cistina en solución acuosa es atacada por rayos X y probablemente da cistina-disulfóxido (ROTHERAM, y col. 1952). Se dan algunas desaminaciones, pero es dudosa la formación de SH_2 . Generalmente no se observa la reducción de disulfuros a tioles.

Al irradiar aminoácidos libres, se pueden producir los siguientes cambios: 1) desaminación, 2) producción de aldehídos, 3) liberación de SH_2 , de cisteína/cistina, 4) hidroxilación y ruptura de anillos de aminoácidos aromáticos e histidina.

En una reciente investigación sobre una serie de aminoácidos y péptidos sencillos (WEISS, 1959) se ha encontrado, que la radiación induce a la formación de hidroperóxidos relativamente estables. Las producciones más altas de hidroperóxidos orgánicos se obtuvieron con soluciones de aminoácidos que contenían un átomo de carbono terciario, por ejemplo isoleucina o valina, y las más bajas se obtuvieron con aminoácidos que contenían por lo menos dos grupos $-CH_2-$ adyacentes (ácido glutámico, arginina) mientras que algunos de los aminoácidos

sencillos (por ejemplo glicina, alanina) y aquellos que contenían un anillo bencénico (por ejemplo fenilalanina) así como histidina e hidroxiprolina, no produjeron cantidades apreciables de hidróperóxido bajo las condiciones experimentales (soluciones 10^{-2} a 10^{-3} M, irradiadas con rayos X a pH 4 a 6).

De varios péptidos examinados, solo aquellos que contenían un residuo de leucina produjeron un hidróperóxido. Por esto se indica, que los grupos hidróperóxidos pueden formarse preferentemente en proteínas que contengan residuos de aminoácidos, que sean capaces ellos mismos de formar hidróperóxidos. Este punto de vista ha sido confirmado por algunas experiencias recientes en soluciones acuosas de tripsina.

VERMEIL y LEFORT han mostrado que se puede inducir hidroxilación de fenilalanina por irradiación en soluciones acuosas neutras.

La degradación por rayos X y gamma de D-L metionina, produce homocisteína por desmetilación, así como varios ácidos por desaminación y metionina-sulfóxido por oxidación; también se formaron otros productos que fueron observados por cromatogramas de metionina irradiada, los cuales no fueron identificados.

Se ha obtenido por irradiación de leucina un producto de olor desagradable formado en su mayor parte por aldehído isovaleriánico. La irradiación de glicina en presencia de un azúcar, tal como glucosa, da lugar a la formación de polímeros marrones. Posteriores

estudios han probado que hay alguna destrucción de varios aminoácidos con altas dosis de radiación tal como de 17 Mrads, pero poca o ninguna destrucción se ha observado con dosis de esterilización.

b₂' . Acción sobre carbohidratos.

Utilizando cromatografía sobre papel y métodos de trazadores radioactivos, se han identificado los productos que se forman cuando se irradian soluciones acuosas de carbohidratos con radiaciones ionizantes, los cuales han sido valorados cuantitativamente (PHILLIPS y MOODY, 1959).

En soluciones acuosas diluidas la D-glucosa es degradada a ácido D-glucúronico, oxido D-glucónico, glicoxal, D-arabinosa, D-eritrosa, formaldehído, ácido sacárico y 1:3 dihidroxiacetona, los cuales han sido valorados cuantitativamente.

El ataque principal cuando se irradian con rayos X soluciones de D-sorbitol, se localiza en los grupos alcoholícos de la molécula. Los productos primarios son: D-glucosa y L-gulosa, y apreciables cantidades de D-arabinosa y L-xilosa se forman por ataque secundario. Estos autores indican un posible mecanismo para explicar estos procesos.

Soluciones de glucosa fueron también irradiadas con rayos X y electrones por BOTHNER y BALAZS tanto en soluciones neutras como alcalinas, y se formaron productos ácidos con pérdida del poder reductor; pero ninguno de los productos pudieron ser identificados.

Al irradiar carbohidratos en solución acuosa WOLFROM, y col. (1959) observaron que se verificaba una oxidación selectiva de los grupos OH primarios terminales de D-glucitol y D-manitol, con la formación de glucosa y gulosa a partir del primero, y D-manosa a partir del segundo. También se formaron arabinosa y xilosa (de D-glucitol) y arabinosa sola (de D-manitol); a grandes dosis D-manitol producía ácido mandrónico. La irradiación de sucrosa, maltosa, celobiosa y rafinosa demostraba que el enlace glicosídico era muy sensible a las radiaciones ionizantes y que la hidrólisis producida era cualitativamente la encontrada en hidrólisis ácida, y del mismo orden. La hidrólisis de disacáridos y trisacáridos aumentaba al aumentar la dosis de radiación.

La radiación ionizante, según MAGYAR RUDAMANYOS (1957) produce oxidación de las soluciones acuosas de azúcares sencillos. Las reacciones de oxidación de la glucosa y fructosa eran:



para la oxidación de los alfa metilglucosidos:



La producción de H_2O_2 en la glucosa y fructosa es mayor que la que se produce en la irradiación de H_2O pura; sin embargo en la solución de alfa metilglucosidos ocurre lo contrario.

b₂''' . Acción sobre proteínas.

Muchos de los trabajos de irradiación de proteínas fueron revisados por ARNOW, en 1936.

En las proteínas los grupos -SH son los más radiosensibles, ya que los tioles se oxidan fácilmente por la radiación. Se ha encontrado en numerosas enzimas con sulfhidrilos, que la adición de glutatión después de la irradiación restaurará parte o toda la actividad perdida. Estos efectos se deben al menos parcialmente a la oxidación de los grupos tioles a disulfuros. En proteínas irradiadas, se ha observado que se libera amoníaco y se han determinado peróxidos orgánicos.

POLLARD, en 1953 hace una revisión sobre irradiación de proteínas.

Cuando las proteínas fueron irradiadas con luz ultravioleta, rayos X y radiación alfa, se observó desnaturalización, precipitación, disminución de viscosidad, cambios en el espectro de absorción en el ultravioleta y variaciones en las constantes de sedimentación. Sin embargo el mecanismo de estos cambios es aún desconocido y la mayoría de los trabajos que se han hecho son sobre soluciones de proteínas no purificadas.

A pesar de la oxidación de grupos tioles y de residuos de tirosina, las valoraciones electrométricas no han sido de utilidad, pues no se han observado diferencias entre el control y las soluciones irradiadas.

das. Las medidas de movibilidades y areas electroforéticas, tampoco dieron resultado en las soluciones de proteína, tales como seroalbúmina y globulina. La medida de la velocidad de sedimentación, sin embargo, mostró la presencia de un segundo componente cuando la albúmina y globulina fueron irradiadas a pH 3. Es posible que la proteína sea dimerizada, y que se obtenga el resultado de la unión intermolecular de dos moléculas de proteína a través de sus enlaces -S-S- para dar un complejo de proteína-S-S-proteína. Por adición de cisteína fué posible prevenir la formación de este complejo.

Los cambios en las proteínas irradiadas dependen grandemente de la temperatura, especialmente los de desnaturalización y precipitación. En efecto, soluciones de proteínas irradiadas a 10°C con 71,900 r. permanecen claras durante horas si se guardan a 3°C; sin embargo, tan pronto como esta solución se lleva a 27°C se precipita. Este proceso se muestra claramente por medida de absorción de la luz a los 2.510 Å.

La irradiación con rayos X de soluciones de seroalbúmina según BARRON y col. (1955) produjeron destrucción de: glicina, alanina y ácido glutámico en un 30 %, lisina 21 %, treonina 18 %, tirosina 16 % e isoleucina 13 %.

El primer estudio realizado fué la resolución en papel cromatográfico de la proteína. Un cambio marcado en el peso molecular o cadenas laterales caracte-

rísticas puede originar un cambio en la resolución, puesto que una ruptura de los enlaces péptidos daría lugar a la aparición de nuevas manchas positivas de ninhidrina. La resolución cromatográfica confirmó la presencia de los aminoácidos glicina y fenilalanina, en el control y su ausencia en las muestras irradiadas. La radiosensibilidad de los aminoácidos de N terminal se debe probablemente a una reacción de desaminación similar a la ocurrida en aminoácidos libres.

Los aminoácidos glicina y fenilalanina se destruyeron a la dosis de 20 millones de rep.

Se irradió insulina a pH 3 con dosis de 0, 10, 20 y 40 millones de rep. para hacer análisis cuantitativos de aminoácidos. Se colocó 1 cc en cada tubo de ensayo y estos mismos tubos se utilizaron para las irradiaciones, secado e hidrólisis con el fin de eliminar posibles errores. La hidrólisis se hizo en vacío, dos muestras por cada dosis de radiación, unas durante 20 horas y otras durante 60 horas.

La marcada disminución de fenilalanina a 10 millones de rep. fué similar a la de fenilalanina sola.

Los aminoácidos más radiosensibles en la molécula de proteína a la dosis de radiación de 10 o 20 millones de rep., fueron cistina, tirosina, prolina, fenilalanina e histidina. Es interesante indicar que los cuatro últimos son aminoácidos que contienen anillo. La leucina, valina, lisina, y arginina, muestran disminución en sus valores analíticos a partir de las do-

sis de cuarenta millones de rep.

ALEXANDER y col. (1956) indican que los cambios que se encuentran en las propiedades físicas y químicas de las proteínas después de la irradiación en solución acuosa diluida, se producen por los radicales libres formados en el agua, y los cambios producidos al irradiar en estado sólido, son debidos a energía absorbida directamente por la proteína.

Las soluciones acuosas de proteínas se precipitan por irradiación cuando se aplican dosis suficientemente altas; pero se conoce poco acerca de los cambios que preceden a este efecto. Varios investigadores se han ocupado sobre el aumento aparente de la absorción en el ultravioleta y sobre la formación de dímeros, por ejemplo en la irradiación con rayos X de la seroalbúmina y fibrinógeno.

Encuentran un aumento marcado en el peso molecular medio de seroalbúmina (humana y bovina). Estas determinaciones las realizan por difusión de luz, exponen las soluciones diluidas que han sido irradiadas con rayos X. Este aumento se debe a la formación de agregados muy polidispersos, según se ha mostrado por examen de ultracentrifugación.

La irradiación de seroalbúmina sólida, produce efectos que son completamente diferentes de los que se siguen por acción indirecta. Sin embargo la seroalbúmina no es posible secarla puesto que la presencia de aproximadamente un cinco por ciento de agua, es esencial para retener la proteína en su forma nativa,

y consideran estos autores que esta cantidad de agua no contribuía significativamente a la acción indirecta.

El efecto de la radiación está influenciado por la presencia de oxígeno. Irradiando con rayos X en aire, la muestra en solución acuosa empieza a hacerse insoluble a los 4×10^6 r.

Experiencias preliminares mostraban que la irradiación en presencia de oxígeno, introduce en la seroalbúmina nuevos grupos (posiblemente peróxidos inestables) que son capaces de iniciar la polimerización de compuestos vinílicos.

Músculo de pescado irradiado por electrones de alto voltaje a una dosis de $5,7 \times 10^6$ rep. no indicaban destrucción significativa de los aminoácidos esenciales.

Irradiación de soluciones acuosas de seroalbúmina 10^{-5} M, con rayos X (44.600 y 66.900 rep.) producía 30 % de destrucción de glicina, alanina y ácido glutámico, y 21 %, 18 %, 16 % y 13 % destrucción de lisina, treonina, tirosina e isoleucina respectivamente.

DRAKE, y col. (1957) trabajan con insulina y aplican dosis de 10, 20 y 40 millones de rep. la pérdida de la actividad biológica al irradiar la insulina es muy grande, la actividad biológica se pierde cuando se atacan los grupos fenólicos, grupos carboxílicos terminales, y enlaces disulfuro. Dos de estos tres grupos fenólicos y disulfuro, se prueba que cambian o se

destruyen por irradiación.

II-b₃. Criterios para detectar los cambios fisicoquímicos en las proteínas al ser irradiadas.

Recientes estudios sobre la seroalbúmina bovina aplicando los criterios anteriores.

El principal criterio para determinar las alteraciones o cambios de las proteínas al ser irradiadas han sido: cambios en solubilidad, absorción en el ultravioleta, comportamiento cromatográfico y alteraciones en el peso molecular, determinado por la difusión de la luz y por ultracentrifugación.

ALENKANDER, y col. (1960) trabajando con seroalbúmina bovina hacen las observaciones siguientes:

Cambios en la solubilidad.

La proteína se va haciendo más insoluble en agua a medida que la dosis de radiación aumenta. Los disolventes que rompen enlaces de hidrogeno, urea 6 M y guanidina hidroclorehidrica 4 M, disuelven a la proteína irradiada.

La pérdida de solubilidad está relacionada con el aumento en el peso molecular medio, determinado por difusión de la luz.

La posibilidad de que el aumento del peso molecular se deba a la formación de enlaces disulfuro por cambio o por oxidación de grupos sulfhidrilos, fué probada por reducción de los enlaces disulfuros accesibles. En el caso de la beta mercaptoetilamina se obtienen dos grupos sulfhidrilos por cada enlace pero no se altera-

ba significativamente el peso molecular medio.

La configuración de la proteína insoluble por la radiación es muy similar a la que se produce en la desnaturalización por el calor.

El primer efecto de la irradiación, es alterar la forma de la molécula, como se muestra por un cambio en el comportamiento de sedimentación y a las dosis que son insuficientes para causar cambios apreciables en el peso molecular medio. La cantidad de proteína sedimentada, normalmente disminuye con la dosis.

Parece probable que los cambios químicos en la molécula que son ya significativos a dosis de 150 ev/molécula, tales como pérdidas de carboxilos, aminos y grupos disulfuros, son los responsables de las grandes agrupaciones intermoleculares. Parece no deben ocurrir posteriores desdoblamientos de la molécula, puesto que no se revelan más grupos disulfuro.

A pesar de que son pocos relativamente los enlaces químicos del material irradiado que se rompen, los cambios físicos y químicos son verdaderamente notables. Los mayores cambios químicos observados en las proteínas al ser irradiadas son los de desnaturalización, degradación y polimerización (SCHWEIGERT, 1959). Uno de los primeros cambios después de la irradiación es la gran sensibilidad de las proteínas a los cambios de temperatura cuando las soluciones se guardan por algún tiempo. Fenómeno que han observado con soluciones irradiadas de mioglobina, proteína conjugada, efecto probablemente debido a la agregación.

En otros estudios se indica también aumento en la viscosidad de las soluciones de proteínas, y una disminución en la solubilidad. Por ejemplo, soluciones de caseína irradiadas formaron un gel insoluble. El cambio químico primario parece que está relacionado con el enlace sulfhidrilo en la proteína y posiblemente con el grupo fenólico de la tirosina. Los efectos oxidantes sobre los grupos sulfhidrilos originan polimerización por formar enlaces disulfuro.

La presencia de sales y la temperatura reducida durante la irradiación protege de estos cambios a proteínas, tales como seroalbúmina y ovoalbúmina, sin embargo tratamientos con 100.000-200.000 rads mostraron alguna formación de dímeros en estas proteínas, cambios que disminuyeron por la adición de cistina.

La ovoalbúmina irradiada manifestó, que se desnaturalizaba por urea más rápidamente que el material no irradiado. Parece que el peligro de la irradiación en la proteína pudiera ser la ruptura de enlaces en el hidrógeno enlazado a diversos grupos.

ALEXANDER y col. (1960) encontraron que la proporción de tirosina que sufría cambio para una dosis dada, era mayor en las proteínas que en un polímero sintético que contuviera tirosina (politirosina), la interpretación de este hecho era el que la energía originalmente depositada en algunos de los residuos de aminoácidos de la proteína, emigraba hacia la tirosina. Los resultados de esta investigación sugie-

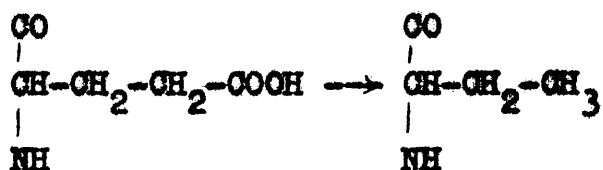
ren que los procesos de transferencia de energía a los aminoácidos determinados es un hecho, aunque el efecto no sea muy selectivo.

Al irradiar seroalbúmina bovina en estado sólido, observan la destrucción de cistina, tirosina, histidina, fenilalanina, arginina y prolina, haciendo análisis de los hidrolizados ácidos de la proteína irradiada. Hay pérdida de grupos carboxilos y aminos (por ej., destrucción del tamaño de las cadenas de los ácidos glutámico, aspártico y lisina). Dosis mayores de 25 megerads, desnaturalizan completamente la proteína. Como el cambio para cada uno de los aminoácidos estudiados es proporcional a la dosis, pudieran extrapolarse estos datos para dosis más bajas.

La sensibilidad de los diferentes grupos varia. Para comparar los cambios que sufren los aminoácidos estudiados en una proteína se debe conocer su concentración dentro de la molécula. Si la proteína se considera como una mezcla de residuos de aminoácidos que no reaccionan entre sí, entonces el número que cambia por cada 100 eV de energía depositados dentro de la molécula de un aminoácido particular, se encuentra multiplicando los residuos cambiados por 100 eV/molécula de proteína por, $1/(\text{gramo de aminoácido/gramo de proteína})$. De estos valores puede deducirse que la sensibilidad de los diferentes aminoácidos estudiados varia, y entre ellos el más sensible es la cistina y el menos sensible la lisina. Algunas de estas varia-

ciones pueden atribuirse a diferencias en la radiosensibilidad inherente de los residuos aminoácidos, pero parte del efecto puede también atribuirse a procesos de transferencia de energía. Para determinar la contribución relativa de estos dos factores, sería necesario estudiar la sensibilidad de la radiación de polipéptidos de peso molecular alto pertenecientes a cada uno de los aminoácidos. La sensibilidad de la radiación de los aminoácidos por sí mismos, no puede ser utilizada para conocer la radiosensibilidad de una proteína, puesto que la incorporación a una cadena de polipéptido altera completamente los cambios químicos inducidos por radiación. Los resultados muestran que la completa desnaturalización de la proteína antes de la irradiación no altera significativamente los cambios químicos producidos. Este resultado es de esperar, puesto que la dosis de radiación que debe darse antes de que aparezcan cambios químicos en los aminoácidos produciría ya desnaturalización, y en este sentido todos los análisis que se han realizado han sido sobre material desnaturalizado.

Hidrolizando la seroalbúmina irradiada han detectado en el cromatograma una nueva mancha de un aminoácido que corre entre tirosina y alanina, (ácido alfa-amino-n-butírico), que puede muy bien formarse por la descarboxilación de los residuos del ácido glutámico:



Así, la pérdida del grupo carboxílico muestra en la curva de valoración cambios de acuerdo con este mecanismo.

Estos autores indican además que ningún otro producto se detectó por la ninhidrina después de la irradiación, ni ácido cístico (producto de oxidación del enlace disulfuro) aunque la irradiación se hizo en presencia de oxígeno.

Dos moléculas de cada tres de seroalbúmina bovina contenían un grupo sulfhidrilo, pero estos estéricamente están enmascarados y solo reaccionan con nitroprusiato sódico si la proteína está completamente denaturalizada por disolución en guanidina clorhídrica 4 M a pH 9. Irradiada la proteína vieron que el número total de grupos sulfhidrilos aumentaba.

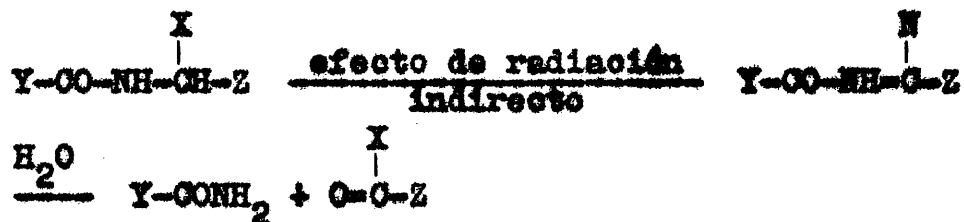
Grupos amido. De la cantidad de amoniaco producida en la hidrólisis ácida el número de grupos amida puede calcularse después de hacer las debidas correcciones. La producción de estos grupos amido es el cambio radioquímico más corriente, y el número producido por 100 ev. depositados en la proteína (valor de G) es 2,2. La seroalbúmina bovina nativa contiene 32 grupos amido por molécula, y este valor aumenta regularmente en la irradiación. Una pequeña parte de es-

te aumento es debida a la formacion de sales amoniacas, que desprenden el amoniaco al tratarse con alcali.

La mayoria del amoniaco liberado viene de grupos con propiedades muy similares a los grupos amidos originalmente presentes y que requieren hidrolisis acida para desprenderse.

Es posible que el amoniaco liberado en la hidrolisis sea derivado no de los grupos amidos, sino mas bien de los productos de radiacion labiles.

Grupos carbonilos. JAYKOO y GARRISON (1957) han indicado la aparicion de grupos carbonilos en proteinas irradiadas en solucion diluida y hacen una breve referencia tambien de su produccion en la pepsina cuando se irradia en seco. Estos autores han indicado que la formacion de grupos carbonilos en el caso de la accion indirecta de la radiacion va acompañada por escision de la cadena de polipeptido principal como sigue:



y que la formacion de un grupo carbonilo estara acompañada por la produccion de grupos amidos adicionales. Aunque este hecho haya sido observado, no hay en ello conformidad cuantitativa. Por cada grupo carbonilo se forman aproximadamente cuatro grupos "amidos", y si

la radiación se hace en presencia de oxígeno, el número de grupos carbonilos formados aumenta mucho, en este punto se encuentra la principal diferencia química entre seroalbúmina bovina irradiada en vacío e irradiada en aire (observaciones no publicadas por estos autores). No observan ningún aumento en grupos amido por lo que piensan que alguno de los grupos carbonilos pueden derivarse de la descomposición de las cadenas laterales.

Pruebas para detectar la ruptura de la cadena principal.

La ruptura de la cadena principal de polipeptido causaría una mayor desordenación de la molécula entera, lo cual puede revelarse por ultracentrifugación y estudios de reactividad. La presencia de enlaces disulfuros intramoleculares podía evitar las rupturas de la cadena principal y el fragmentar la molécula, pero tales rupturas enmascaradas serían retaladas después de que los enlaces disulfuros hayan sido separados por oxidación con ácido peracético. Por esta razón los fragmentos de peso molecular bajo fueron buscados por diálisis después de disolver en solución hidrociorhídrica de guanidina 4 M. No encontraron péptidos difusibles en el dializado antes o después de la oxidación con ácido peracético cuando la proteína fué irradiada con dosis por encima de 214 eV/molécula; lo cual fué confirmado por precipitación de la proteína de la solución irradiada con ácido tri-

cloroacetico y un examen del líquido sobrenadante.

Cambios en la reactividad química.

Uno de los cambios mas característicos producidos por la acción directa de la radiación ionizante es aumentar la reactividad de alguno de los enlaces disulfuros que en la proteína nativa son estericamente inaccesibles. La radiación tambien revela un grupo sulfhidrilo que normalmente no reacciona con nitroprusiato a pH 9, pero la determinación se complica, puesto que el número de sulfhidrilos aumentaba al mismo tiempo por la ruptura de enlaces disulfuros. La sensibilidad relativamente alta de la cistina está de acuerdo con GORDY y SHIELDS (1956), en que los enlaces disulfuros se ionizan preferentemente pero que el efecto no es grande. Claramente parece que los nuevos grupos sulfhidrilos formados deben derivarse de la ruptura de la cistina, pero que no existe ninguna relación estequiométrica que lo confirme.

La radiación cambia el máximo de absorción a pH neutro de la tirosina combinada a una longitud de onda ligeramente más baja, y este cambio podía explicarse por ruptura de un enlace de hidrogeno específico que envuelve el grupo hidroxifenólico. Sin embargo, la radiación no tiene influencia sobre el valor del pK del grupo hidroxilo que en la proteína nativa es dos unidades de pH más alto que el de la tirosina. El fuerte enlace de hidrogeno responsable de este cambio no es afectado por muy grandes dosis de radiación.

Un efecto notable de la radiación que es nuevamente paralelo al calor, es el encubrir algunos de los grupos amino de la cadena lateral ya que ellos no reaccionan con 1-fluore-2,4-dinitrobenzene. Que esto se debe a un cambio estérico se indica por el hecho de que los grupos se hacen accesibles en cloruro de guanidina 4 M.

Estos autores resumen los hechos anteriores en los siguientes puntos:

1. Cambios en los residuos de 9 aminoácidos que se elevan a 73,5 % de seroalbúmina bovina, se han seguido después de la irradiación de esta proteína en el estado sólido con 2 Mev. en vacío.

2. Aunque se forman grupos carbonilos, ninguna evidencia de la ruptura de la cadena principal podía detectarse. Otros productos medidos incluían grupos -SH, un nuevo aminoácido, ácido alfa amino-n-butírico, y un grupo como amido que da elevación de emfánico al hidrolizar.

3. Hay cambios pronunciados en la reactividad de las cadenas laterales. El grupo -SH oculto es revelado, y la posición del máximo de absorción de la tirosina se cambia, aunque su pK enormemente alto permanece sin afectarse. Algunos de los grupos amino se ocultan ya que no reaccionan con 1-fluoruro-2, 4-dinitrobenzene excepto en guanidina hidroclorehidrica 4 M

4. Se saca la conclusión de que los cambios en los residuos de aminoácidos no pueden explicar la desnaturalización como se muestra por los cambios en la

reactividad de las cadenas laterales y por los cambios físico químicos descritos en el presente trabajo. Esta investigación apoya la hipótesis de que la desnaturalización es el resultado de la ruptura simultánea de un número de enlaces de hidrogeno, y que los cambios químicos subsiguientes que han sido medidos no son responsables de este hecho.

AUGENSTINE, (1956) discute el papel de los enlaces -S-S- en la inactivación de proteínas. Indica que el efecto crítico llega a localizarse en un enlace débil, causando primero la ruptura de un enlace disulfuro, seguida por la ruptura de enlaces intramoleculares próximos, y finalmente la ruptura de un segundo enlace disulfuro.

PLATZMAND, y FRANK, (1956) explican la inactivación de proteínas por radiaciones ionizantes por un mecanismo físico. La onda de polarización causada por una producción repentina de carga eléctrica en el interior de la molécula debe causar una profunda degradación de la organización molecular, como simultáneamente ruptura de los enlaces polares muy débiles (enlaces hidrogeno). Varias ionizaciones parece que sean necesarias para inactivar las proteínas comunes.

C - II. Estudio e interpretación de los cambios en el espectro de absorción en el ultravioleta de proteínas.

II-a₁. Estudios generales sobre el espectro ultravioleta.

Según FRIEDEL, y ORCHIN (1951) la absorción de la luz en la región ultravioleta (2000 a 4000 Å) se debe a los electrones de los enlaces no saturados. Grupos tales como $\text{C}=\text{O}$, $\text{N}=\text{O}$, $\text{N}=\text{N}$, $\text{C}=\text{S}$, y otros similares. Con el aumento de la conjugación, se desvía el espectro a mayores longitudes de onda a la vez que se produce aumento de intensidad. La mayor desviación en el espectro resulta de sustituyentes no saturados o de grupos con electrones no compartidos (OH -, NH_2 , OCH_3). Un excelente artículo de BRAUDE sobre grupos cromofóricos y efectos de sustituyentes, que contiene un sumario completo de correlación para sistemas aromáticos, heterocíclicos, isocíclicos y acíclicos. JONES clasifica los efectos de sustituyentes en compuestos aromáticos de acuerdo con los cambios observados en el espectro. El espectro de derivados sustituidos de hidrocarburos aromáticos, se parece al espectro de hidrocarburos aromáticos, no sustituidos en cuanto a posiciones de longitudes de onda, bandas y valores de intensidad.

El espectro de la mayoría de los bencenos susti-

tuidos no se parece al espectro del benceno. Puede atribuirse al hecho de que los grupos sustituyentes en los derivados del benceno forman una proporción mayor de la molécula total que en derivados de compuestos aromáticos polinucleares.

El efecto de los grupos alquilo y amoníaco en el espectro de compuestos aromáticos lleva consigo un ligero aumento de la longitud de onda y disminución de la estructura fina del espectro.

El grupo amino $-NH_2$ produce un gran efecto de conjugación. El sustituyente produce una gran desviación, disminución de la estructura fina y aumento en intensidad. Aparece banda más amplia a mayor longitud de onda.

El efecto estérico es contrario al de conjugación.

Para obtener aumento en la estructura fina se debe trabajar a muy bajas temperaturas.

II-c₂. Espectro ultravioleta de aminoácidos y proteínas.

Las soluciones de la mayoría de las proteínas muestran absorción selectiva en la región de 2.500 a 3.000 Å y SORET (1883) indica que esta absorción se debe a los aminoácidos aromáticos presentes en la proteína. En cada caso la posición exacta del máximo (cerca de 2.800 Å) varía con el pH. La fenilalanina como se espera de su constitución, muestra

absorción débil, que bajo condiciones favorables puede resolverse en varias bandas estrechas, pero en solución 0,1 N, el máximo se encuentra cerca de 258,5 m μ con un coeficiente de extinción molecular bajo. La absorción ejercida por la tirosina y el triptofano es mucho más fuerte, y como primera aproximación la contribución de la fenilalanina puede despreciarse. Como puede seleccionarse la longitud de onda en que la fenilalanina no contribuye, será posible tratar las soluciones de proteína como sistemas de dos componentes para análisis espectrofotométrico y determinar así el contenido en tirosina y triptofano de una proteína GOODWIN y MORTON (1946).

VIERORDT (1934) ha descrito un procedimiento para analizar sistemas binarios utilizando intensidades de absorción a longitudes de onda seleccionadas. El método puede extenderse a soluciones de proteínas e hidrolizados si se considera que ni el modo de enlace ni la presencia de otros aminoácidos desplaza la absorción de la tirosina-triptofano. Afortunadamente esta hipótesis parece estar justificada, por los siguientes hechos:

(a) por la base de muchas experiencias sobre cromóforos orgánicos en general;

(b) produce valores de tirosina y triptofano de acuerdo con los obtenidos por otros métodos.

Las bandas en las proteínas son atribuidas a estos aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano). En

las proteínas las bandas están desplazadas hacia mayores longitudes de onda, en muchos casos de 10 a 35 Å, con respecto a las posiciones que ocupan los aminoácidos no combinados. COULTER, y col. (1936) utilizan soluciones acuosas o ligeramente ácidas y sacan la conclusión de que no hay desplazamiento debido al enlace péptido.

Algunas proteínas sufren alteraciones en el espectro de absorción a pH 13 como consecuencia de la desnaturalización alcalina.

La ovoalbúmina a pH 12 durante tres días a la temperatura ordinaria no mostró desnaturalización, ni aumento en absorción en el ultravioleta; pero a pH 13 la desnaturalización apareció instantáneamente.

La oxidación de proteínas puede ocurrir en solución fuertemente alcalina y dar lugar a cambios cualitativos marcados en su espectro de absorción.

Según ANSLOW y NASSAR (1941), la absorción de proteínas en el rango de longitudes de onda de 2.500 a 3.000 Å no se debe exclusivamente a los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano) y cistina, sino que incluyen la absorción selectiva de los enlaces péptidos, al menos aquellos utilizados en entrelazar sistemas de enlaces de hidrógeno de la molécula entera. Indican que la absorción máxima de proteínas a 2.800 Å se debe al mismo enlace péptido, y solo secundariamente a los cromóforos aromáticos en los grupos de cadena lateral, de los

tres aminoácidos aromáticos. Sus medidas en proteínas se interpretaron por estudios de compuestos alifáticos sencillos, incluyendo ácidos aminocarboxílicos y sustancias conteniendo enlaces péptidos, tales como glutation.

Se ha revisado por SAIDEL y col. (1951) el posible valor de la banda de absorción del enlace péptido en el estudio de estructuras de proteína.

A causa de las deducciones estructurales, ANSON (1952) indican que los enlaces péptidos existen al menos en parte, en la forma anólica como la llamada cromóforo peptenol $(OH)C=N$. Esto, en opinión de los críticos es contrario al concepto de absorción de textura péptida. BEAVEN y HOLIDAY (1950) dan algunas pruebas de esto, al citar varias proteínas en las que la concordancia entre los valores espectrofotométricos para tirosina y triptofano y los datos analíticos obtenidos por otros métodos son suficientemente aproximados para sacar la conclusión de que en estas proteínas no puede haber contribución en el espectro de absorción, de la textura péptida, en la región de 2.700 a 3.100 \AA . Si hubiese alguna contribución se afectaría seriamente la exactitud del análisis espectrofotométrico.

Una proteína que no contenga aminoácidos aromáticos exhibirá la absorción de textura péptida selectiva como una banda con un máximo a 2.800 \AA (ANSLOW y LYMAN, 1941), o 2.500 \AA (SCHAUENSTEIN 1950) li-

bre de interferencias por las bandas intensas de tirosina y triptofano. Estudian el clupeine, un polipeptido de peso molecular cuatro mil que satisface esto. Su espectro de absorción en solución concentrada a pH 7, 10,5 y 12 no muestra absorción selectiva en los 2.600 a 3.000 Å. Las curvas caen suavemente a las longitudes de onda mayores de 3.000 Å, y son prácticamente rectas en el rango de 2.600 a 2.800 Å. Para soluciones menos concentradas de clupeine puro, se observó que la absorción por debajo de 3.300 Å, era prácticamente despreciable.

Polipeptidos y proteínas de peso molecular bajo que pueden obtenerse con alta pureza, dan curvas de absorción en que la banda de proteínas termina con relativa brusquedad aproximadamente a 3.200 Å (en solución neutra o ácida) sin ningún signo de contribución de una banda de absorción peptídica, que se extiende de 2.800 Å a mayores longitudes de onda. Un ejemplo típico se encuentra en la lisozima (peso molecular 13.700).

HOLIDAY en 1936 estudió el espectro de varias proteínas partiendo de la hipótesis de que la curva de absorción de una proteína es la suma de las de sus aminoácidos. Si esto fuera así, la curva de absorción de la proteína podría ser analizada por el método de las mezclas y la concentración de los aminoácidos determinada. La posibilidad de tal análisis depende de varios factores. Uno de ellos es, encontrar una región

del espectro donde absorben pocos aminoácidos. La región más favorable existe entre longitudes de onda de 2.800 a 3.150 Å donde solo absorben la tirosina y triptofano. En proteínas que no contienen estos aminoácidos la absorción en la región de longitudes de onda de 2.400 a 2.800 Å se deberá a fenilalanina y cistina. Análisis del espectro de absorción de una proteínas en la región de longitudes de onda de 2.800 a 3.200 Å, dieron valores para la tirosina y triptofano de acuerdo con los obtenidos por análisis químicos,

$$\frac{M_{\text{tirosina}}}{M_{\text{triptofano}}} = \frac{0,592 D_{2944} - 0,263 D_{2800}}{0,263 D_{2800} - 0,170 D_{2944}}$$

donde D es la densidad óptica de la solución a longitudes de onda 2.800 y 2944 Å.

Se mide la densidad óptica de una solución de proteína en álcali 0,1 N a longitudes de onda 2.800 y 2.944 Å.

Según MAZZA (19305, el espectro de absorción en el ultravioleta del ovomucoide tiene una banda entre 2.590 y 2.900 Å a pH 7, y esta banda se desvía hacia el ultravioleta próximo en solución alcalina, pero en medio ácido no sucede lo mismo. Existen indicaciones de que esta desviación se debe principalmente a la presencia de una gran cantidad de fenilalanina y a la casi completa ausencia de triptofano.

II-c₃. Espectro ultravioleta de proteínas irradiadas.
Análisis de la difusión Rayleigh.

Se conoce desde hace tiempo que el espectro de absorción ultravioleta de muchas proteínas sufre un aumento en la densidad óptica por irradiación de sus soluciones acuosas (SPIEGEL-ADOLF 1928, 1929, 1931). Este resultado se ha confirmado recientemente para seroalbúmina bovina, seroglobulina y albúmina de huevo (BARRON, 1949, 1952) y CARROLL y col., 1952), y se cree que este cambio es un ataque sobre el componente tirosina, similar a lo que ocurre sobre la tirosina misma (BARRON 1952). En casos donde la proporción de triptofano a tirosina es mayor que uno, el espectro de absorción disminuye por irradiación, especialmente cerca de 2.800 Å. Esto parece deberse a un ataque del componente triptofano, pues el triptofano mismo muestra una disminución en el espectro de absorción en esta región cuando es irradiado (BARRON y col., 1955). En general hay aumento en la absorción en el ultravioleta por las proteínas irradiadas, y el efecto es mayor cuando la proteína está disuelta en medio ácido a un valor de pH por debajo del punto isoelectrico, y los cambios son menores cuando la proteína se irradia en ausencia relativa de oxígeno.

Al irradiar soluciones de aminoácidos aromáticos hay hidroxilación y ruptura de anillos, estos cambios se analizaron por absorción en el ultravioleta.

El máximo de absorción de los aminoácidos aromáticos en solución ácida, se desvía ligeramente hacia mayores longitudes de onda, para aumentar en valor absoluto, y para disminuir en relación al mínimo correspondiente cuando aumenta la dosis de radiación. El máximo aromático en solución básica disminuye en valor absoluto, para aumentar en relación al mínimo correspondiente, y el mínimo se desvía hacia más cortas longitudes de onda con aumento de la irradiación. Aparentemente en medio básico, no hay desviación del máximo de absorción, excepto en la dosis de más de diez millones de rep. La actividad biológica de la insulina, por ejemplo, se va perdiendo cuando se atacan los grupos fenólicos, grupos terminales carboxílicos y enlaces disulfuro. Dos de estos tres grupos necesarios para la actividad biológica, el fenólico y el disulfuro, se cambian o destruyen por la irradiación. Las curvas de absorción de los aromáticos típicos obtenidos después de la corrección de la difusión Rayleigh, fortalecen la hipótesis de que el tamaño molecular aumenta con la dosis de radiación, y que el aumento general de absorción observado, es debido al efecto Tyndall.

Se ha confirmado la observación de que la absorción en el ultravioleta de la seroalbúmina a 2.800 \AA aumenta aparentemente después de la irradiación (ALEXANDER, 1960), pero no puede aceptarse que esto sea el resultado de un ataque preferente en los residuos

de tirosina que son responsables de esta banda. Este aumento aparente se debe a la pérdida de luz por difusión, debido al gran aumento de los agregados formados en la irradiación. La difusión de la luz la miden directamente a 4.360 y 5.460 Å con el aparato que se utiliza para determinaciones de peso molecular por la difusión de la luz, y para otras longitudes de onda fué calculada por la ecuación de Rayleigh-Debye. Estos valores son los que utiliza para corregir el espectro que es determinado en un espectrofotómetro, entonces se ve, que la verdadera absorción de la proteína cambia muy poco al irradiar.

La absorción de la seroalbúmina a 2.800 Å es casi completamente debida a la tirosina, así como para lisozima a la misma longitud de onda es debida al triptofano. Al irradiar soluciones diluidas de esta enzima con rayos X, el máximo en el ultravioleta primero disminuye, pero aumenta de nuevo con grandes dosis. El efecto inicial es debido probablemente a los radicales libres formados en el agua sobre el triptofano y puede estar relacionado con la capacidad del triptofano y sus derivados para competir muy efectivamente con otras sustancias. El aumento del máximo de absorción a dosis muy altas, es debido a la agregación de la proteína.

ALEXANDER en otra investigación posterior, determina los cambios químicos primarios producidos por la radiación, como resultado de la agregación observada.

Esta agregación refleja que el cambio físico-quí-

mico es más significativo en la acción indirecta, y puede también dar lugar a otros cambios, tales como a mayor facilidad de desnaturalización por el calor.

La irradiación de la seroalbúmina en sólido origina un verdadero cambio en la absorción del ultravioleta, cambio que ha sido medido por la difusión Rayleigh de los agregados. Este cambio indica el ataque que ha sufrido la tirosina; es mucho mayor de lo que se podría esperar de la energía que directamente toman los residuos de tirosina. El cambio en el espectro ultravioleta de politirosina no es detectable a la dosis que produce un cambio del 20 % en la seroalbúmina. Puesto que la toma de energía inicial es independiente de la estructura molecular, la misma fracción de tirosina debería ser afectada en una proteína que en un polipeptido compuesto de residuos de tirosina. La observación de que la tirosina es afectada en la proteína en una proporción mayor, hace pensar que la energía tomada por los residuos de los aminoácidos, contribuyen también notablemente en el ataque de la tirosina.

BEAVEN, (1952) y DOTY (1953), indican que el aumento de absorción al irradiar, es a veces debido a la difusión de la luz por las grandes partículas, esto es debido al aumento del tamaño molecular (efecto Tyndall). GOODWIN (1946) da una fórmula sencilla para determinar el valor de la absorción verdadera en la región de absorción no aromática de 3.200 a 3.600 Å.

$$\text{absorción verdadera} = D_{\lambda} - (360 - \lambda) k$$

D = densidad óptica.

La caída (k) de la absorción en esta región se calcula mediante la fórmula

$$k = \frac{\text{cambio en la densidad óptica}}{\text{intervalo de longitud de onda}}$$

$$\frac{D_{3.200} - D_{3.600}}{360 - 320}$$

ALEXANDER (1960) estudia la absorción en el ultravioleta de la seroalbúmina irradiada en estado sólido en:

- 1ª. Fosfato buffer M/15, pH 7;
- 2ª. Guanidina hidrociorhídrica 4 M, pH 7 y
- 3ª. El hidrolizado ácido de la proteína.

El aumento aparente en la absorción lo considera debido a la luz difundida por los grandes agregados que se forman. La cantidad de luz que se pierde de esta manera es proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda. El aumento en la intensidad de la difusión de la luz con el cambio en el peso molecular, es un índice del aumento en la absorción.

Hay muchos trabajos en los cuales este aumento de absorción se ha interpretado como la producción de un nuevo grupo cromofórico a las longitudes de onda más bajas. Los cambios en el espectro de absorción persisten después de que las proteínas irradiadas han sido hidrolizadas en sus aminoácidos constituyentes.

Se muestra que la diferencia en la curva para los hidrolizados es cualitativa y cuantitativamente muy similar a la de la proteína disuelta en guanidina hidrociorhídrica 4 M.

La radiación sobre la proteína (seroalbúmina), desplaza ligeramente la posición del máximo de absorción del grupo hidroxifenólico de la tirosina a su forma no disociada. El cambio de 2.780 Å para la proteína no irradiada a 2.760 Å para la proteína que ha recibido 143 ev/molécula, no es debido a la difusión de agregados. Este cambio no ocurre solamente con la radiación; se encuentra también después de la solución en guanidina hidrociorhídrica 4 M y al bajar el pH a menos de 2.

ROSEN en 1959, publica un interesante trabajo sobre la importancia que tiene la difusión de la luz en el espectro ultravioleta de proteínas y polímeros cuando son irradiados. Hace primero una revisión indicando que aunque era conocido y venía estudiándose este problema desde hacía treinta años, el hecho de que las soluciones de seroalbúmina y de otras proteínas sufrían agregación por la acción de radiaciones ionizantes CARROLL (1952) y ROSEN (1957); el que esta agregación influía en la difusión de la luz, solo había sido indicado por PASSYNSKII (1955) y por PAVLOWSKAYA (1957). En este mismo trabajo se considera que, cuando $\lambda^4 \Delta$ permanece constante a lo largo de todo el

rango de longitud de onda medida, esta constancia se puede tomar como un indicador de que la proteína ha sufrido agregación de las moléculas al ser irradiada.

Los cambios en la absorción debidos a modificaciones químicas se pueden obtener según ALEXANDER y HAMILTON (1960) por una representación gráfica, llevando $\lambda^4 \Delta$ frente a λ , siendo Δ la diferencia en absorción entre la proteína control y la irradiada. En esta gráfica, los agregados de proteínas solo producen leves oscilaciones en torno a una línea base y los cambios producidos por las modificaciones químicas producen ciertos máximos que pueden ser exactamente localizados.

En el trabajo de ROSEN se estudia especialmente como la radiación produce efectos intermoleculares e intramoleculares en las proteínas en una proporción que varía según las circunstancias. Utilizan en este estudio seroalbúmina humana de gran pureza. Por la importancia de este trabajo hacemos de él una especial reseña y aplicamos el método que propone, para el estudio de la difusión de la luz en los espectros de las proteínas que hemos examinado.

Estudian primero soluciones isoeleétricas de proteínas irradiadas. Determinan el espectro de absorción ultravioleta, de una solución de seroalbúmina humana al 0,1 %, libre de sal, en su punto isoeleétrico (5,4) antes y después de irradiar. De la resta de las dos

curvas obtienen el aumento (Δ) en la absorción por cada longitud de onda y llevan $\lambda^4 \Delta$ contra λ , es evidente, que excepto para una ligera irregularidad a 295 a 300 m μ , el valor de $\lambda^4 \Delta$ es constante sobre todo el rango. Tal resultado indica claramente la difusión Rayleigh por los agregados de proteína.

Un examen previo por ultracentrifugación había mostrado (ROSEN y col., 1957), que la dosis dada habría causado alrededor del 47 % de agregados en la proteína. Las medidas de pesos moleculares medios, le dieron resultados enteramente concordantes con las medidas de ultracentrifugación.

Tomaron como regla de trabajo que, cuando la cantidad $\lambda^4 \Delta$ era constante (dentro del rango del error experimental por encima del 15 %) para todo o casi todo el rango de longitud de onda aprovechable, podría tomarse como un índice de agregación de las moléculas de proteína y como una medida del peso molecular medio. Específicamente, una dosis dada de radiación, actuando en acción indirecta y causando en las proteínas una cantidad determinada de agregación conducirá a un valor de Δ para cada longitud de onda independiente de la concentración de proteína inicial.

Cuando la dosis de radiación se aplica en forma continuada, la agregación de la proteína llega a la turbidez y la proteína se precipita. En posteriores irradiaciones la difusión de la luz es tan grande que

es muy poca la que atraviesa la solución. Se ha encontrado que con luz ultravioleta, el aumento en la absorción aparente es inicialmente proporcional a la dosis, pero que a dosis más altas esta proporcionalidad no se cumple.

Realizan también la experiencia con soluciones de proteínas a varios valores de pH añadiendo ClH o NaOH . Obtienen las gráficas $\lambda^4 \Delta$ contra λ para dos soluciones de seroalbúmina humana irradiada por rayos X a valores de pH fuera del punto isoelectrico.

Discuten las modificaciones que se introducen en la difusión.

Como final en el trabajo indican que la acción de las radiaciones ionizantes sobre seroalbúmina en soluciones acuosas diluidas, es afectada por los radicales libres producidos en la radiolisis del agua, BARRON y FINKELSTEIN (1952); ROSEN y col., (1957). Los resultados que presentan muestran que la reacción entre los radicales libres y una molécula de proteína, puede conducir a una agregación intermolecular parcialmente reversible de moléculas, o a un cambio intramolecular irreversible en la proteína reaccionante. La extensión en la cual los efectos intermolecular e intramolecular ocurren separadamente, depende del pH y de la fuerza iónica de la solución, el efecto intermolecular parece que está determinado por la frecuencia de la colisión de las moléculas de proteína en solución.

La situación puede explicarse por la hipótesis de que el efecto producido por rayos X sobre proteínas en solución, es un proceso de dos etapas; la primera es la reacción entre la molécula de proteína y un radical libre formado en la radiolisis del solvente, el cual produce un estado reactivo de la molécula de proteína.

La segunda etapa es la reacción de este compuesto inter o intramolecularmente. Se debe suponer que cuando son posibles ambas partes de la reacción, la intermolecular es mucho más probable a las concentraciones indicadas en este estudio, esta reacción, sin embargo, puede tener lugar en una colisión solo durante el momento de contacto. Cuando la frecuencia de la colisión se reduce (por moléculas cargadas que se repelen una a otra), la reacción intramolecular se hace relativamente más probable. Una hipótesis similar de un mecanismo de dos etapas ha sido propuesto por EIDUS y col. (1958), para explicar los efectos del oxígeno en la irradiación de soluciones de miosin.

El espectro de absorción da muy poca indicación de la naturaleza química, de los estados intermedios o de los productos finales de la proteína desnaturalizada. BARRON y FINKELSTEIN (1952) indicaron que los cambios a longitudes de onda mayores de $240 \text{ m}\mu$ en el espectro de seroalbúmina después de la irradiación, eran enteramente debidos a la oxidación de la tirosi-

na, dando dihidroxifenilalanina. Los resultados de estos autores muestran que este no es el caso, y aún la pequeña parte del aumento en la absorción que es debida a un cambio intramolecular, puede no ser debida a un cambio en tirosina. La diferencia entre el espectro de absorción de tirosina y dihidroxifenilalanina o tirosina irradiada, muestra un pico agudo a 285 m μ según ROSEN, en un trabajo no publicado, mientras que en la proteína irradiada aparece un pico pequeño, revelado solo por indicación matemática, y que se manifiesta a los 295-300 m μ .

D - II. Radiosensibilidad y radioprotección química.

II-d₁. Generalidades.

La idea de administrar sustancias químicas como medio para reducir los efectos de la radiación no es completamente irracional como parecía al principio.

La acción de las radiaciones ionizantes sobre el material proteico da lugar a cambios fisico-químicos que originan alteraciones en los sistemas biológicos, proteger pues a la materia viva sobre estas alteraciones constituye el objetivo de la protección química contra la radiación.

Si se irradia una solución que contiene dos sustancias capaces de reaccionar con los radicales formados por la irradiación, sobre todo en soluciones diluidas, dichos efectos se repartirán entre las dos sustancias, o bien recaerán principalmente sobre aquella que tenga grupos más sensibles para la radiación.

Por el 1949, en tres países independientemente, Norte-América, Bélgica y Gran Bretaña, descubrieron sustancias que cuando las inyectaban a ratones inmediatamente antes de ser irradiados, los animales sobrevivían a dosis que sin esta protección hubieran muerto todos ellos.

Como el número de protectores químicos es ilimitado, fué necesario elaborar una teoría de trabajo para determinar los compuestos que debían ser ensayados. En los tres laboratorios antes indicados estas teorías

fueron completamente diferentes, como lo fueron también los compuestos ensayados, y el resultado fué que cierto número de compuestos químicos al parecer sin ninguna relación en su constitución tenían capacidad para proteger a mamíferos contra la radiación.

Aunque probablemente ninguna de estas teorías previamente trazadas fueran exactas, sirvieron para enfocar la atención hacia las sustancias que verdaderamente son más radioprotectoras.

Después de cinco años de trabajo se llegó a una investigación sistemática y desde este momento se ha desarrollado un gran progreso sobre la radioprotección química más efectiva que aquella de las primeras escuelas de radioprotección.

Estimuló estos estudios la búsqueda de radioprotectores como una posible defensa militar y civil contra los explosivos atómicos y así en casi todos los laboratorios radiobiológicos se han probado un gran número de compuestos químicos y se ha medido su capacidad de protección contra las radiaciones atómicas.

Los términos de protección y de agentes protectores se han utilizado en organismos vivos y en sistemas biológicos complejos.

El término protección química es frecuentemente utilizado para denotar cualquier reducción en el daño de la radiación llevada a cabo por medios químicos. Para la mayoría de los compuestos protectores el

efecto es solo observado cuando el agente está presente en el organismo durante la exposición. Por esto parece lógico restringir el término protección química a la reducción en lesiones de radiación obtenidas por administración del agente antes de la exposición (LATTARJET y GRAY, 1954). Aunque esta definición es puramente descriptiva, la mayoría de los investigadores más o menos tacitamente suponen que el término implica una reducción en las lesiones radioquímicas inmediatas.

BARRON en 1952 encontró que el -SH de las enzimas "in vitro" era oxidado por rayos X a la forma -S-S-, y que un tratamiento subsiguiente con compuestos que contienen -SH tales como cisteína o glutatión restauraban la actividad.

II-d₂. Sustancias radioprotectoras.

La primera sustancia encontrada fué la cisteína, aminoácido constituyente de la mayor parte de las proteínas. Mas tarde el profesor BACQ quien ha tenido una parte importantísima en el descubrimiento y estudio de sustancias radioprotectoras, encontró otro compuesto que parecía tener ventajas sobre la cisteína, aunque su protección no fuera grande, la mercapto-etilamina a la que dió el nombre de Becaptan.

BACQ y HERVE (1952) han examinado numerosas aminos y han encontrado que gran número de ellas son agentes protectores activos.

Las sustancias protectoras se han dividido en cinco grupos:

- 1.- Cianuros y sustancias relacionadas.
- 2.- Compuestos tiólicicos.
- 3.- Sustancias que causan anoxia.
- 4.- Aminas y sustancias que contienen el grupo NH_2 .
- 5.- Agentes quelatizantes y sustancias diversas.

El efecto de los agentes protectores puede en general expresarse cuantitativamente como "factor de reducción de dosis", es decir, la relación entre dosis de igual efecto en presencia y ausencia del agente protector.

Existen una serie de tioles y disulfuros químicamente relacionados con la cisteína y cisteamina que poseen una acción protectora pronunciada, grupo que ha sido el más estudiado. Estas sustancias se han ensayado contra la acción letal de la radiación en varias especies animales, y la efectividad mayor se ha encontrado en la administración de 100 mg/Kg de peso del cuerpo cuando se han aplicado "in vivo".

Estos compuestos generalmente son inyectados por vía intraperitoneal, de cinco a quince minutos antes de aplicar la radiación y se efecto dura alrededor de una hora. Algunos de estos compuestos se han aplicado también por vía oral y han sido eficaces.

Para probar la acción protectora de un agente, ordinariamente se elige un grupo de diez ratones, se apli-

ca el protector, se irradia con dosis letales de rayos X para que todos mueran en el plazo de dos semanas. Si el protector es débil, sobreviviran tres o cuatro de los diez irradiados, mientras que si es un buen protector se salvaran todos o casi todos.

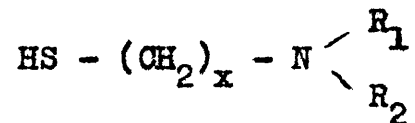
Las aminas son más activas que los aminoácidos correspondientes, especialmente las aromáticas.

Los agentes quelatizantes se encuentran entre los mejores protectores de un sistema "in vitro".

El BAL, mercaptoetilamina es uno de los mejores protectores como agente de quelación, puesto que contiene un grupo covalente -SH y otro grupo fuertemente ionizado, el NH_2 , que estan muy próximos. Trazas de diversos iones juegan un papel muy importante en la radioquímica de las soluciones acuosas.

El efecto protector de las sustancias de este grupo, está asociado con su capacidad para formar disulfuros de mezcla.

Se ha visto tambien que no todas las sustancias que contienen grupos -SH son agentes protectores, necesitan pues para ello una constitución básica en su configuración tal como por ejemplo:



(R_1 y R_2 son grupos alquilos y x no mayor de tres).

La mayoría de las sustancias que son activas "in

vivo", protegen "in vitro".

Los aminoácidos solo son ligeramente activos biológicamente, excepto triptofano, histidina y tirosina que son muy buenos protectores con el polimero, que se toma como tipo (ácido polimetacrílico), para estos estudios, la protección aquí parece derivarse de los grupos indol, imidazol y fenólico respectivamente, todos confieren actividad protectora "in vivo" e "in vitro".

ALEXANDER y col. (1955) comparan la protección de sesenta y siete sustancias químicas diferentes "in vivo" e "in vitro" y observan que la única característica de muchos de los protectores activos tales como aminas, compuestos azufrados, nitritos y cianuro, es la presencia de un solo par de electrones. Lo que implica que estos compuestos pueden adicionar un átomo de oxígeno (por ejemplo, en la reacción con un radical HO_2) para dar óxidos de amina, sulfonas, o sulfóxidos, nitratos y cianatos respectivamente.

En general, las etilaminas beta sustituidas (por ejemplo aminoácidos descarboxilados) son las más activas, aunque la etilamina es casi inactiva. La dihidroxifenilalanina (DOFA) es con la cisteína, el mejor protector en la serie de aminoácidos. Experimentos "in vitro" indican que los fenoles solos, son buenos protectores, aunque es de advertir que son demasiado tóxicos para probarlos "in vivo". Los grupos hidroxilos alifáticos, protegen también, y la correlación es parti-

cularmente sorprendente en la comparación de glucosa con fructosa. Los alcoholes de cadena larga forman peróxidos más fácilmente.

FRICKE y BROWNSCOMBE (1933) encontraron que la efectividad de los ácidos grasos de cadena lateral aumentaba con la longitud de la cadena.

La prueba más convincente desde el punto de vista fisiológico es que la presencia de un grupo sulfhidrilo solo, no produce protección, es el caso de la falta de protección de la ergotioneína.

La sustitución en el $-NH_2$ o en el $-SH$ de la mercaptoetilamina, lleva a una marcada pérdida en el poder protector. En el sistema polímero los derivados de cisteína por un grupo $-SH$ bloqueado, muestran alguna actividad, que se pierde cuando el grupo amino es también sustituido.

La gran actividad encontrada con compuestos quelatizantes puede ser debida al hecho de que los metales pesados tales como el cobre juegan una parte importante en la reacción de radiación inducida, o al hecho de que la constitución química que confiere poder quelatizante tenga también la reactividad química necesaria para la protección.

En el sistema polímero la acción protectora de los agentes quelatizantes no es debida a la extracción de trazas de metales sino a su reactividad química inherente. Una posible interpretación es que los agentes quelatizantes contienen un centro reactivo, po-

siblemente el grupo donador de electrones, que es altamente efectivo para la protección (por ejemplo por tener una alta reactividad para los radicales HO_2), pero que este grupo sea bloqueado al combinarse con cobre.

Se han estudiado más de cien sustancias como agentes protectores contra rayos X en dos sistemas completamente diferentes: en la mortalidad de ratones y en la degradación de soluciones diluidas en agua aireada de ácido polimetacrílico. En estos dos sistemas se encontró un paralelismo significativo de la acción protectora.

Los grupos $-\text{SH}$ no confieren por sí mismos propiedades protectoras al compuesto, y solo aquellos compuestos sulfhidrúlicos que contengan también grupos amino, son activos "in vivo". De un estudio de algunos derivados de beta-mercaptoetilamina, se ha deducido que son necesarios para que haya gran actividad protectora ambos grupos $-\text{SH}$ y $-\text{NH}_2$.

Los buenos protectores tienen la propiedad de ser muy reactivos con los radicales HO_2 , pero no todos los protectores reaccionan fácilmente con los radicales libres de moléculas orgánicas o con los OH .

II-d₃. Mecanismos de acción de las sustancias radioprotectoras.

Cuando un sistema biológico es expuesto a las radiaciones lo primero que ocurre es una absorción

de energía, que ordinariamente se utiliza en una reacción química. Por esta razón el primer paso será proteger los cambios químicos iniciales. Esta protección se puede efectuar:

1.- Añadiendo una sustancia que absorba la energía.

2.- Restaurar por adición de una sustancia el daño producido en la macromolécula inmediatamente después de la reacción primaria, y antes de que pueda existir cambio irreversible. En muchos casos no será esto posible puesto que la reacción primaria puede por sí ser irreversible, pero en otros, la reacción primaria por ejemplo, como la pérdida de un átomo de hidrógeno para dar un radical libre y en este caso el daño sí que puede ser reparado, puesto que las reacciones químicas de una molécula se dan rápidamente, la sustancia protectora debe estar presente antes de que comience la irradiación.

3.- Proteger un grupo vulnerable de una molécula con una sustancia que pueda extraerse después de la irradiación.

En los sistemas biológicos es sumamente difícil averiguar cual de estos tres procesos sigue el agente protector, puesto que los cambios químicos primarios no son fáciles de determinar. Se pueden obtener indicaciones valiosas por analogía con la protección en sistemas sencillos donde puede seguirse bien el proceso químico.

La acción protectora contra radiaciones se supuso, que estaba unida a la propiedad reductora; pero muchas sustancias reductoras, tenían poco o ningún efecto (BACQ y ALEXANDER, 1955).

Estudiando los efectos de la radiación sobre diferentes materiales ALEXANDER y FOX (1953), encontraron que el ácido polimetacrílico, sustancia de gran peso molecular, estaba degradada. Fué conveniente para estas experiencias usar soluciones de este material y seguir los cambios producidos por la acción indirecta de la radiación. Vieron que la ruptura de este polímero no se realizaba si a la solución se añadían otras sustancias, que podían considerarse como protectoras del polímero contra la radiación. Se llegó a descubrir por este medio que las mismas sustancias químicas obraban como protectoras en el sistema polímero-ratón, hecho que parecía ser algo más que una pura coincidencia. Después de haber analizado más de cien sustancias en los dos sistemas, llegaron a la conclusión de que se mostraban activas y con el mismo orden de efectividad. Las excepciones encontradas eran debidas a que el animal metaboliza rápidamente las sustancias, mientras que en la solución del polímero, permanecen inalteradas.

En un sistema artificial simplificado como el polímero, pensaron que este se degradaba por los radicales HO_2 formados en la solución y al añadir las sustancias protectoras se combinan con ellos y entran en

competición con las moléculas del polímero para la captura de los mismos. Otra alternativa es que reaccionan con un producto intermedio inestable durante la irradiación e impiden así la ruptura de cadenas del polímero, actuando como agente de transferencia de cadena. Esta posibilidad no era probable puesto que las aminas son activas como agentes protectores bien sea bajo forma de iones, o bien sea bajo forma de aminas libres, y solamente en este último caso pueden reaccionar como agentes de transferencia.

Si es correcto que el efecto protector se debe únicamente a una competición, debería ser proporcional a la concentración del protector. Vieron que esto no ocurría siempre, pues parecen intervenir otros factores, probablemente una reacción entre el polímero y el protector cuando están en solución. Se ha discutido la posibilidad de que la absorción juegue también su papel en la acción protectora de las aminas.

De estos estudios se han sacado las observaciones siguientes: 1ª. Que existe solamente protección en presencia de oxígeno o de aire, porque en ausencia de oxígeno no puede formarse el radical HO_2 en el agua. 2ª. Las sustancias químicas son total o parcialmente ineficaces para proteger los efectos de las radiaciones, tales como protones o partículas alfa que producen grandes densidades iónicas y en estos casos los radicales no pueden ser eliminados por competición. 3ª. La

protección que pueden dar las sustancias químicas es limitada, algunas sustancias pueden reducir la acción de la radiación a la mitad.

En general estos mecanismos pueden principalmente resumirse como sigue: (ALEXANDER y LORENTZ, 1958).

1ª. Protección por inactivación de radicales libres.

El efecto protector obtenido por inactivación de los radicales libres estará acondicionado a la concentración del protector en el medio de interés, y a su reactividad específica con los productos de la radiólisis. Parece a priori, que sobre esta base los compuestos farmacológicamente activos, ejerceran un efecto protector.

Es bien sabido que gran número de agentes protectores que contienen azufre, reaccionan rápidamente con los radicales libres del medio (BARRON y FLOOD, 1950), (SHAPIRO y ELDJARN, 1955), (SWALLOV, 1952), lo cual hizo suponer durante bastante tiempo, que la protección "in vivo" por estos compuestos pudiera ser explicada por este mecanismo. El hecho de que un cierto efecto de radiación se pueda reducir por estos agentes protectores, hizo que se considerara evidente el que tal efecto se efectuaba por una acción indirecta.

2ª. Protección por extracción de oxígeno.

El hecho de que "in vivo", tanto como "in vitro", la mayoría de las lesiones o trastornos de radiación se reducen cuando se irradia en ausencia de oxígeno ha

jugado un papel central en los intentos de explicación de como obran los agentes protectores (BURNETT y col. 1953), (GRAY, 1956), (HOLLAENDER y STAPLETON, 1953) y (PATT, 1953). El punto de vista de que los agentes protectores puedan ejercer su acción por reducir la tensión de oxígeno celular, ha sido sostenida por el encuentro de que el grado de protección es aproximadamente el mismo para la privación de oxígeno y para agentes protectores. Más tarde se ha encontrado que varios tioles protectores contrarrestaban la acción tóxica del oxígeno.

GRAY, ha medido la concentración de oxígeno en varios sistemas "in vitro" después de la adición de tioles protectores. De sus experimentos se deduce que los efectos protectores pueden adscribirse a una disminución progresiva de la tensión de oxígeno causada por oxidación espontánea del tiol añadido.

3º.- Protección por reemplazamiento.

Se ha considerado también la posibilidad de que los agentes protectores puedan funcionar como partes capaces de reemplazar constituyentes celulares, antes de que las funciones bioquímicas hayan sufrido un cambio irreversible (BACQ y HERVE, 1954), (LAGENDORF y KOCH, 1954). Parece ser que no existe evidencia experimental que sostenga esta hipótesis.

4º. Protección por alteración del metabolismo celular.

Los cambios en radiosensibilidad obtenidos por al-

teración de la composición química y metabolismo de las células del tejido, parece que constituyen un campo de investigación muy fructífero.

5ª. Protección por modificación química de las moléculas del blanco de ataque.

La posibilidad indicada (BACQ y HERVE, 1954), (PATT, 1953) de que los agentes protectores puedan recíprocamente de una forma u otra aumentar la radiorresistencia con las moléculas del blanco celular, no ha tenido apoyo experimental.

6ª. Protección por el mecanismo de mezclas de disulfuros.

Trabajos de laboratorio han mostrado (ELDJARN y PIHL, 1956), (ELDJARN y col., 1956), que los agentes protectores que contienen -SH y -S-S- llegan a unirse "in vivo" a los constituyentes del tejido a través de la formación de mezclas de disulfuros. Basándose en estudios radioquímicos, bioquímicos y químicos, se ha formulado un mecanismo para la protección química "in vivo" con los compuestos de cisteína-cisteína (ELDJARN y PIHL, 1956), (PIHL y col., 1957).

La modificación de los grupos -SH y -S-S- en el blanco, por formación de disulfuros de mezcla con los agentes protectores, representa una protección parcial de los átomos de azufre del blanco de impacto contra la acción indirecta de la radiación ionizante. Cuando un enlace disulfuro es atacado por radicales libres, uno de los átomos de azufre es oxidado

a ácido sulfónico o sulfínico, mientras que el otro es reducido a un grupo -SH. Puesto que un radical próximo puede atacar cualquiera de los dos átomos de azufre, se supone que un cincuenta por ciento del átomo de azufre del impacto original, será reconstituido como grupo -SH. De esta manera la formación de disulfuros de mezcla, se supone que reducen la probabilidad de alteración irreversible de moléculas del blanco de impacto:

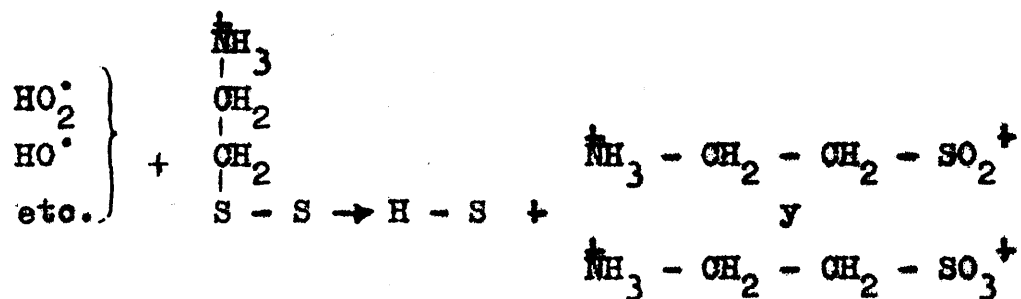


Fig. 1. Hipótesis de mezcla de disulfuros para la protección contra la acción indirecta de la radiación.

La combinación química del protector con la molécula de impacto en la forma de un disulfuro de mezcla, representa una protección parcial también del blanco de impacto contra la acción directa de la radiación ionizante. En una molécula orgánica ionizante (ionizada), la carga puede emigrar hasta que suceda la ruptura de un enlace susceptible de ello (ENGELHARD y EIKENBERG, 1955). La teoría supone que el enlace disulfuro de mezcla, sirve como fuente fundamental del reapareamiento de electrones de la ionización original (Fig. 2). De nuevo, de la subsiguiente ruptura del enlace disulfuro

de mezcla, se cree, que resultara la formación de un grupo -SH. La formación de disulfuros de mezcla se considera que suministra las posibilidades adicionales para la disipación de la energía de radiación, en una forma no deleterea.

La evidencia experimental principal que soporta el mecanismo de disulfuros de mezcla, ha sido discutida extensamente (ELDJARN y PIEHL).

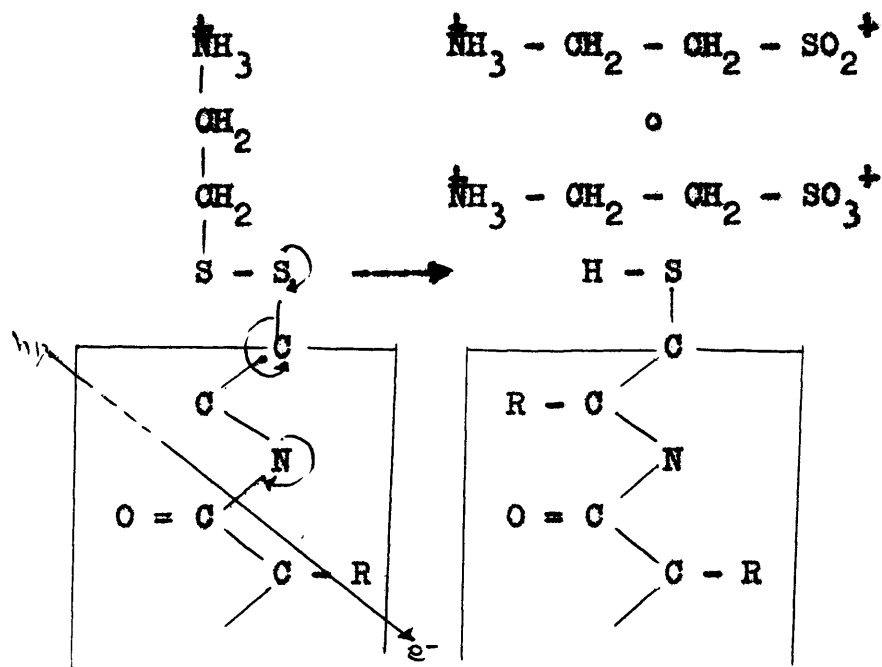


Fig. 2. La hipótesis de disulfuros de mezcla para la protección contra la acción directa de la radiación.

Existe un alto grado de relación entre la potencia protectora de tioles y su capacidad para formar disulfuros de mezcla con los grupos de azufre biológicos. Estudios termodinámicos "in vitro" han demostrado que una serie de tioles protectores (entre ellos

AET) forman grandes cantidades de disulfuros de mezcla con cisteína y glutatión oxidado, que fueron utilizados como prototipo de disulfuros celulares.

Lo mismo ocurre para la interacción de los disulfuros protectores con cisteína y glutatión reducido. Por otra parte, un número de tioles no protectores no forman disulfuros de mezcla con los compuestos modelo. Aparentemente se requiere la presencia en la molécula de un grupo amina, además de un grupo -SH o -S-S-, que puede dar una interpretación lógica a la estabilidad termodinámica del disulfuro de mezcla.

El mecanismo de disulfuros de mezcla presupone que los compuestos protectores reaccionan rápidamente con las moléculas del impacto. Esto se sigue del hecho de que la mayoría de las sustancias protectoras son activas cuando se dan inmediatamente antes de la exposición a la radiación. Se ha encontrado que a pH 7,4 y 37°C la formación de disulfuros de mezcla entre los compuestos protectores y los disulfuros biológicos tiene lugar en pocos minutos.

El punto de vista de que la formación temporal de enlaces disulfuros adicionales puede proteger una molécula orgánica contra choques directos por servir como fuente de electrones capaz de restaurar las ionizaciones, ha sido sostenido por GORDY y col. (1958).

Estos investigadores sacan la conclusión de sus estudios con proteínas en el estado seco: "todas las veces que la radiación arranca un electrón para dejar

un lugar o vacante en cualquier punto dado de la proteína, este lugar es rápidamente llenado por un electrón tomado de un grupo de cistina. Este mecanismo previene la ruptura de enlaces y probablemente disminuye grandemente el daño de la radiación".

La correlación observada entre capacidad protectora y la proporción y extensión de la formación de disulfuros de mezcla, representa la única explicación para la relación entre la estructura química y capacidad protectora de los compuestos del grupo cisteína-cisteína.

El papel fundamental de los grupos -SH en procesos bioquímicos, esta bien establecido, los grupos -SH y -S-S- son particularmente vulnerables tanto a la acción directa como indirecta de la radiación ionizante (BARRON y DICKMAN, 1949), por lo tanto la hipótesis de los disulfuros de mezcla, tiene una base lógica para el mecanismo de protección contra la acción, tanto directa como indirecta de las radiaciones ionizantes; pues se deduce que el agente protector intercepta la radiación (DRAKE y col., 1957), (SHAPIRO y ELDJARN, 1955).

Bajo el punto de vista fisico-químico sobre la interpretación de la protección química, como una reducción de dosis verdadera, los datos experimentales sobre el mecanismo de disulfuros de mezcla, proporcionan evidencia sobre el éxito de tal protección y bajo este punto de vista la presencia del protector parece ser que no influye en la ionizaciones iniciales de las moléculas del blanco de impacto.

Según la base de la hipótesis de disulfuros de

mezcla, se puede suponer que las moléculas del blanco de impacto llevan en la proximidad de los grupos -S-S- o -SH accesibles, otros grupos cargados negativamente (carboxilo, fenol o grupos hidroxilos) capaces de estabilizar la formación de disulfuros de mezcla con el protector. Hipótesis que podrá servir como guía en el futuro para estas investigaciones.

Actualmente, los compuestos más estudiados y utilizados son el AET y cisteamina, ambos son químicamente estables y se pueden administrar oralmente. Se ha encontrado que el AET protege a mones y perros, pero la toxicidad del producto es tan alta en estas especies, que el compuesto tiene que ser administrado en pequeñas dosis, aumentando la cantidad en un período de varios días, antes de que los niveles protectores sean alcanzados. Los efectos en el hombre del AET y otros derivados de cisteamina, actualmente están siendo estudiados.

El mecanismo fisicoquímico de la protección según BACQ y ALEXANDER (1955), es que las entidades químicas formadas en el agua pueden reaccionar con una macromolécula vital (por ejemplo RH) para dar un radical libre (R[•])



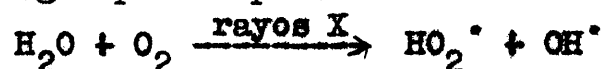
este radical puede luego conducir a la pérdida de la actividad biológica. En presencia de oxígeno la reacción será



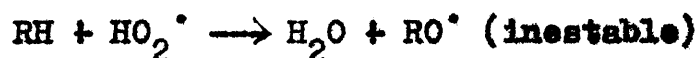
que puede dar lugar a un radical peroxilo cuya inestabilidad es bien conocida. El protector químico añadido (PH) puede luego combinarse con cualquier R^\bullet o ROO^\bullet para dar un producto estable, que retenga actividad, o bien actúe como un agente de transferencia que convirtiera de nuevo a los radicales libres a su forma original,



En el mecanismo de la protección del sistema polimero, se tiene la evidencia (ALEXANDER, 1953), de que la degradación del ácido polimetacrílico en solución acuosa diluida se lleva a cabo por los radicales HO_2^\bullet formados en el agua por el proceso:



La ruptura de la cadena principal del ácido polimetacrílico, es improbable que se realice por disociación directa al combinarse con el radical libre, pero probablemente envuelve la formación de un estado intermedio de un compuesto inestable que se descompone:



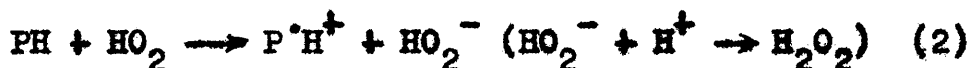
La protección puede por lo cual ocurrir en dos formas: el agente protector (PH) puede competir con el polímero para el radical HO_2^\bullet , o puede combinarse con el compuesto intermedio inestable para dar un compuesto estable,



Este último proceso es conocido como una reacción de transferencia, y de estas reacciones de transferencia existen muchos ejemplos, particularmente en polimerización. Entre los agentes de transferencia más efectivos están los compuestos -SH, y en menor extensión las aminas. Todas las sustancias que tengan un átomo de hidrogeno reactivo, es de suponer que pasasen más o menos por una reacción de este tipo. Sin embargo se ha objetado contra el punto de vista de que una reacción de transferencia se verifique en la protección. Primeramente, solo las aminas no ionizadas, pueden actuar como agentes de transferencia; las sales amónicas son completamente inactivas, aún algunas de las aminas más efectivas tienen valores de pK mayores de 10^6 y estarán totalmente en la forma catiónica a pH 7. Sin embargo, se ha demostrado que la acción protectora de las aminas es independiente del pH y que la anilina, por ejemplo, es tan activa ionizada como no ionizada. Segundo, derivados de tiourea, triptamina hidroclorehidrica, y otras sustancias buenas protectoras no actúan como agentes de transferencia en reacciones de polimerización (FISCHER y GOUTIER-PIROTTE, 1954), (BACQ, 1953). Tercero, todos los compuestos de -SH están lejos de ser agentes de transferencia, y solo algunos son buenos protectores (LORENZ, 1952).

La propiedad común de los agentes protectores parece ser la alta reactividad con los radicales HO_2 .

Químicamente la reacción entre un agente protector (PH) y un radical HO_2 puede ocurrir de las siguientes formas:



No ha sido posible decidir por cual de estas reacciones los diferentes agentes protectores se combinan con los radicales HO_2 .

Ningún paralelismo parece existir entre la inhibición de polimerización por competición para los radicales libres OH y la acción protectora (ALEXANDER, 1953).

Hay un estrecho paralelismo en las series de los ácidos grasos con relación a la protección y el aumento de formación de H_2O_2 en soluciones acuosas aireadas. Este último proceso puede interpretarse como una reacción del soluto con HO_2 en sentido opuesto a los radicales OH.

Acción química y biológica de los compuestos -SH, protectores.

12. El compuesto protector cisteína, cisteamina o cualquier compuesto similar disminuye la presión parcial de oxígeno y con ello reduce el efecto de la radiación. Un efecto similar se alcanza por la captura de radicales (HO_2 , H_2O_2). GRAY (1955) discutió este

problema en el Congreso de Cambridge, y de acuerdo con sus medidas, la cisteína disminuye rápidamente el contenido de oxígeno de la solución, y al mismo tiempo ella se oxida.

2ª. Es posible para los compuestos protectores reaccionar con los grupos -SH en la célula y enmascarar estos por la formación de disulfuros de mezcla de corta vida, Indicación de ELDJARN y PIHL (1955).

3ª. El compuesto protector por su propia reactividad puede reducir la oxidación que se produce en la célula, o bien puede sustituir a los compuestos destruidos. Debe considerarse esta posibilidad, aunque los compuestos protectores no son efectivos cuando se dan después de la irradiación.

En todos los mecanismos posibles se supone que el compuesto protector reacciona de una cierta forma con el medio que protege. En el primero hay una oxidación a disulfuro, y las condiciones precisas para ello, pueden estudiarse fácilmente en modelos experimentales, particularmente en catálisis con metales pesados. Contra este tipo de reacción hay la formación de disulfuros de mezcla de un tipo totalmente distinto de reacción que la formación de disulfuros bajo oxidación.

Es posible que los compuestos protectores, por su capacidad para reducir, retarden o eviten ciertos efectos oxidantes de la irradiación.

II-d₄. El bromuro del hidrobromuro de 2-amino-etiliso-
tiuronio (AET) como radioprotector.

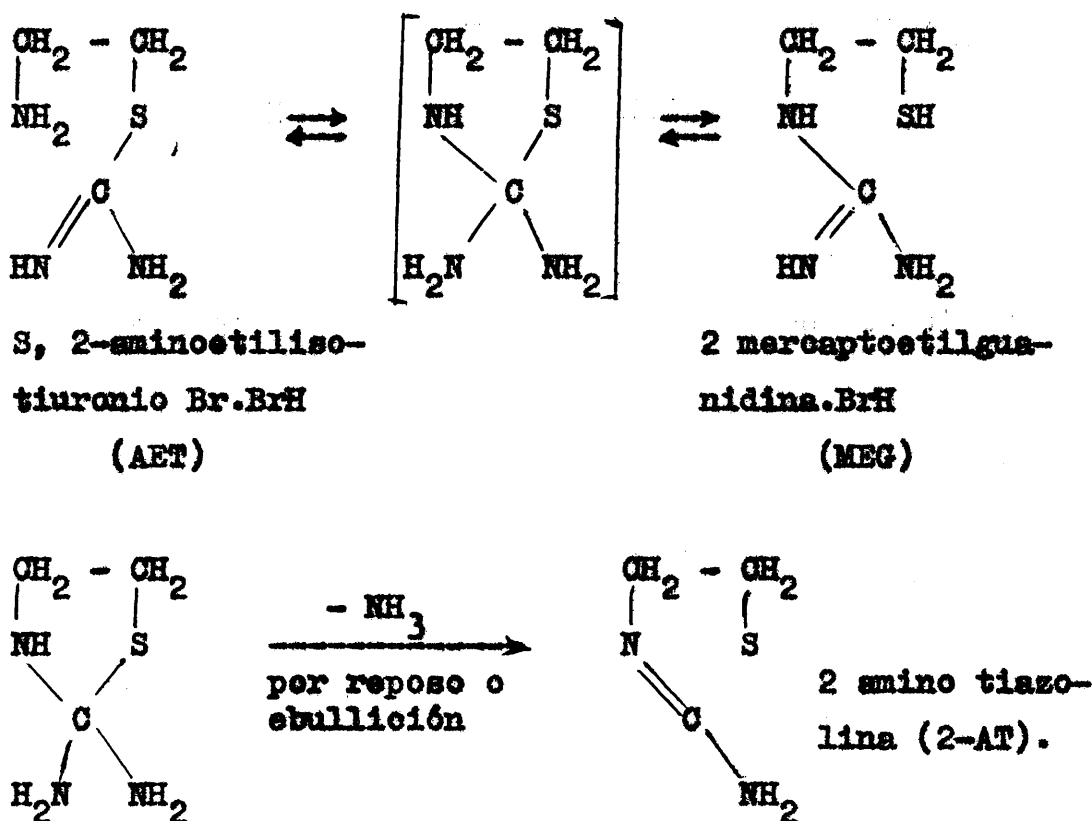
El AET fué descubierto por el Dr. David G. Doherty y los laboratorios Schwarz lo ofrecen como tabletas para investigación química con el nombre de antiradón.

Con este radioprotector un gran número de experiencias se han realizado con ratones y se ha visto que aumenta marcadamente el número de supervivientes cuando se administra antes de exponerlos a la radiación letal. Efectos parecidos se han conseguido en monos, y actualmente se están haciendo estudios en seres humanos. La protección suministrada por AET se cree que deriva de la formación de sulfhidrilos libres "in situ" que se combinan con radicales libres que destoxifican. Esta propiedad suministra posibilidades para otros estudios fisiológicos, como por ejemplo la actividad de enzimas.

Efectos farmacológicos del AET (DISTEFANO, y col., 1959).

El AET como un agente profiláctico contra los efectos letales de radiación ha dado lugar a que se estudie su acción farmacológica.

DOHERTY y col, (1955) demostraron que el AET y todos los compuestos de tiuronio que protegen contra los efectos letales de irradiación, dan prueba positiva de grupos -SH con nitroprusiato. Para explicar este fenómeno, se ha dicho que el AET existe en una variedad de formas (SHAPIRA y col., 1957).



Quando una solución acuosa de AET se hierve o se deja, se forma 2-AT que da reacción positiva de grupos -SH con nitroprusiato y presenta alguna protección contra la irradiación; pero los compuestos que no puedan ciclarse en esta forma, producen un grupo sulfhidrilo libre que no protege contra la irradiación, por ejemplo, 4-aminobutilisotiuronio bromuro (ABT).

La facilidad de un compuesto para ciclarse y dar prueba positiva de grupos -SH con nitroprusiato, puede también relacionarse con su actividad farmacológica. Para probar esta hipótesis, se comparan ciertas acciones farmacológicas de (AET), bromuro 3-aminopropilisotiuronio (APT) y (2-AT), que dan con nitroprusiato reac-

ción positiva de grupos -SH, con (AET) que no da dicha prueba positiva de grupos -SH ni tiene efecto protector contra la radiación.

Las acciones del AET, APT, y algunas de las acciones de 2-AT, se atribuyen a la presencia de grupos sulfhidrilos libres.

AET, que no puede formar ningún grupo sulfhidrilo libre, es relativamente inactivo farmacológicamente.

Para el protector se requiere la estructura de que los átomos de azufre estén presentes o como grupos -SH libres, o como grupos disulfuros, el compuesto AET, así como otros protectores derivados de isotiuronio, son excepciones aparentes, puesto que sufren rápido cambio intramolecular bajo condiciones fisiológicas para dar derivados de cisteamina que poseen un grupo -SH libre (HAGEN y BLUMENFELD, 1956), (SHAPIRA, 1957).

ANDERSON y JOSEPH, (1959) prueban los efectos de la radiación sobre soluciones acuosas de sales de S-2-aminoetil tiuronio. Soluciones de sales de S-2-aminoetil tiuronio (I) formaban 2-mercaptoetilguanidina (II).

La destrucción de grupos -SH de (II) era directamente dependiente de la dosis de radiación. A altas dosis indican que puede haber una reacción en cadena por la radiosensibilidad de este compuesto.

La acción protectora de (I) envuelve no solo la sensibilidad de la radiación del grupo -SH libre, sino también la capacidad de unirse con moléculas biológicas radiosensibles y protegerlas del peligro de la radiación.

III - PARTE EXPERIMENTAL. RESULTADOS: TABLAS Y GRAFICAS

A - III. Obtención y análisis del ovomucide.

III-a₁. Obtención y purificación.

Hemos seguido en su mayor parte el procedimiento de FREDERICQ y DEUTSCH, con pequeñas modificaciones en cuanto a la purificación:

Se parte de 350 cc, de claras frescas (de huevos puestos unas 24 horas antes). Se homogenizan, se les ajusta el pH a 3,5 con SO_4H_2 1N, se añade 1 volumen de acetato sódico del 10 %, se vuelve a ajustar el pH a 3,5 con NaOH y se dejan en reposo unas 20 horas, después de este tiempo:

Decantar y centrifugar

Precipitado I

(descartar)

Solución

Se filtra y se añade solución de NaOH 0,5 N hasta pH 6; se pone a 0°C, se añaden 2 volúmenes de etanol del 95 %, preenfriado, temp. -6°C a -8°C y se deja a esta temp. varias horas. Se decanta y se filtra.

Precipitado II

Se considera como ovomucoide crudo. Se disuelve en agua a 0°C y se dializa contra agua destilada 4 días a 0°C y se ajusta el pH a 2,3. Se añade agua destilada y ClNa hasta una fuerza iónica de 0,02 y se ajusta con SO_4H_2 1N hasta pH 3,2. Se le añade 1 vol. de etanol del 95 % preenfriado y se deja unas cuantas horas a -6°C o -8°C y se centrifuga a 0°C.

Solución

(descartar)

Precipitado III

Se disuelve en agua y se liofiliza.

Solución

(descartar)

Ovomucoide purificado

Rendimiento:

ovomucoide obtenido ————— 1,2248 g.

densidad de la clara ——— 1,0285 g./cc.

350 cc. de claras x 1,0285 (densidad) = 360 g.

$$R \% = \frac{100 \times 1.225}{360} = 0,349$$

La pureza de la proteína se determinó por electroforesis y por curvas de solubilidad. La electroforesis se llevó en veronal y en fosfato bufferes a distintos pH, y dentro de la inhomogeneidad electroforética del ovomucoide, la fracción obtenida manifestaba una gran pureza.

III-a₂. Análisis elemental y determinación de grupos NH₂, exosaminas y aminoácidos, como índices para conocer los cambios de la proteína al ser irradiada.

Se determinó nitrogeno total por micro-kjeldahl y obtuvimos el 11,02 % quizás algo bajo con relación a lo indicado en la bibliografía, pero posiblemente la proteína tenía un 5 % de agua.

Para determinar exosaminas se ha seguido el procedimiento de ELSON y MORGAN; con las indicaciones de GUNNAR-BLIX (1948).

Se hidrolizaron 50 mg de ovomucoide con 5 cc. de ClH 2N, en tubo cerrado durante 14 horas a 100°C; una

vez filtrada la solución de los hidrolizados, se deja en reposo durante algún tiempo con carbón animal, se vuelve a filtrar y se neutraliza con NaOH, 4N utilizando como indicador rojo de metilo (viraja a pH 4,2 - 6,3). El volumen de esta solución se mide exactamente. De esta solución se toman 2 cc. y se acetila con 2 cc. de una solución de acetilacetona recién preparada (0,75 cc. en 25 cc. de una solución de carbonato sódico 1,25 N). La acetilación se hizo en tubo cerrado y en baño de agua a 96°C durante 20 minutos.

Enfriados los tubos a la temperatura ambiente, se les añadió a cada uno 20 cc. de alcohol de 96°. Se mezclan bien y se les pone 2 cc. del reactivo Ehrlich.

Después de 45 minutos de añadido el reactivo de color, se hicieron las lecturas en el fotocolorímetro. (SPAKKER-PHOTOELECTRIC ABSORTIOMETER H-760) filtros Kodak 3 y 4.

La escala patrón. Para determinación de exosaminas, se prepara una solución de glucosamina de 0,4mg/cc según la información bibliográfica, la sensibilidad del método está comprendida entre 0,042 mg./26 cc. a 0,170 mg./26 cc. de glucosamina.

Reactivo Ehrlich: 1,6 g. de p-dimetileminobenzaldehído, en 30 cc. de ClH concentrado y 30 cc. de alcohol de 96°.

Obtuvimos de glucosamina el 10,45 %.

Para determinar grupos NH_2 , según MOORE y STEIN (1948) se prepara el siguiente reactivo: 0,8 g. de $\text{Cl}_2\text{Sn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, disuelto en 500 cc. de buffer citrato (21 g. de ácido cítrico. $1\text{H}_2\text{O}$, NaOH 1N y agua hasta 500 cc.) a pH 5. Al que se le añade otra solución preparada con 20 g. de ninhidrina en 500 cc. de metilcellosolve (etanol -2 metoxy).

Esta solución se satura de N_2 y se guarda en nevera en frasco tapado.

Se añade 1 cc. del anterior reactivo a 1 cc. de las muestras de proteína preparadas al 0,1 %. Se calientan los tubos a ebullición en baño de agua durante 20 minutos, se dejan enfriar y se mezclan rápidamente con isopropanol del 50 % y se leen a 570 m μ dentro de los 15 minutos después de haberlos quitado del baño, frente a un blanco tratado de la misma forma y sin proteínas.

Estos valores se llevan a una curva patrón preparada previamente con alanina.

Se obtuvieron para el ovomucoide 2,8 μ de NH_2 /cc.

Se determina el contenido en aminoácidos cualitativamente por cromatografía, según DURRUM (1955), en cámara de butanos-acético-agua, encontrando fenilalanina, cistina, tirosina, lisina, leucina, alanina, arginina y metionina. El triptofano se ha determinado colorimétricamente por el método de GRAHAM (1947). Se toman de 10 a 20 mg. de ovomucoide y 35 mg. de gelatina, se calientan a reflujo con 2 cc. de NaOH 1N du-

rante 2 horas, se enfria esta mezcla a la temperatura ambiente y se le añade con agitación 0,5 cc. de p-dimetilaminobenzaldehído al 2,5 % en ácido sulfúrico del 10 %; 0,2 cc. de nitrato sódico del 2 % y 28 cc. de ácido clorhídrico concentrado. Estas soluciones se dejan en reposo durante 30 minutos y se diluyen a 100 cc. con alcohol del 50 %.

Se miden así preparadas en colorímetro o en espectrofotómetro a 550 $m\mu$.

Hicimos varias determinaciones y en todas obtuvimos resultados negativos.

III-a₃. Espectro de absorción en el ultravioleta del ovomucoide, diversos aminoácidos y glucosamina.- Determinación de la relación tirosina a triptofano existente en el ovomucoide.

Todos los espectros que hemos obtenido de la proteína y de sus componentes se han determinado en un espectrofotómetro BECKMAN D.U. y las curvas se han dibujado llevando las longitudes de onda contra absorción específica. Resultados que quedan reseñados en las tablas y gráficas de la sección III-a₁, comparados con los obtenidos después de la irradiación.

La determinación de la relación tirosina a triptofano se realizó según el método de HOLIDAY (1936).

Se mide el espectro de la proteína al 0,1 % en NaOH 0,1 N antes y después de irradiar, cuyos resultados se tabulan en la sección III-c₂ y se calculan

por la formula:

$$\frac{M_{\text{tirosina}}}{M_{\text{triptofano}}} = \frac{0,592 D_{294,4} - 0,263 D_{280,0}}{0,263 D_{280,0} - 0,170 D_{294,4}}$$

Siendo D la densidad óptica de la solución a la longitud de onda 280 y 294,4 m μ .

B - III. Irradiación: fuentes, dispositivos y dosis.

III - B. IRRADIACION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS

III-b₁. Fuentes de irradiación.

1^o). Se utiliza Ra en agujas procedentes del Instituto del Cancer, y se irradia en dos dispositivos diferentes, gráficas nº 1 y 2.

2^o). Fuente de Co⁶⁰, de 26 curios en el Hospital de San Francisco de la V.O.T. Esta fuente, según calibración, tiene 420 r/h a 25,5 cm. El dispositivo que hemos utilizado para la irradiación, puede verse en la gráfica nº 3.

3^o). Fuente de Cs¹³⁷, instalada en los campos del ENGIN (Alcala de Henares) que supervisan los Ingenieros del Instituto de Investigaciones Agronómicas.

La bomba tiene forma de cilindro hueco, para aprovechar simultaneamente los campos externo e interno. El envase de la fuente es tambien cilindrico de hierro y de plomo, tal que la radiación en la superficie no pasa de 10 mr/h. Por el interior del envase puede deslizarse una pieza cilindrica de hierro con la cámara para muestras en su parte central. Todas las piezas estan cubiertas por fuera con chapa de acero inoxidable, así como el cilindro armadura que contiene la capsula del isotope.

Como es lógico todo el sistema tiene un manejo a distancia desde una caseta control fuera del campo.

Nosotros hemos irradiado las muestras en la parte interior de la fuente en la forma que puede verse en la gráfica nº 4.

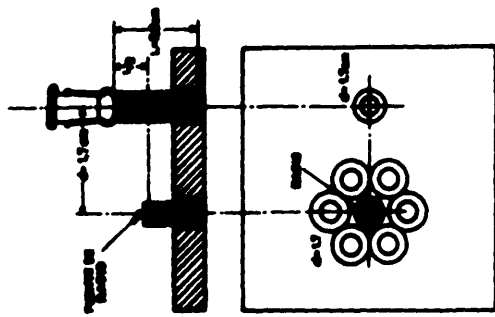
Protección de plomo

Tubos de vidrio

Solución de uranio²³⁸

Tubo de plástico

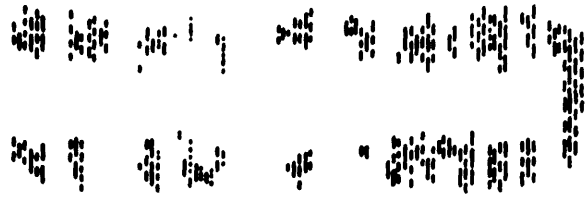
Agujas de



Dispositivo para la irradiación de sistemas líquidos expuestos a los rayos γ del Ra ; d , distancia entre el centro de la fuente y el centro de la muestra. L , altura del líquido en los tubos.

$$r / hr = \frac{\text{Equivalentes(mg)} Ra \times 64 \times \tan \theta^{-1} (L/2d)}{d^2 L/2d} \text{ (doais en rantgen/hora)}$$

Grdf. 1



Dispositivo para irradiar dentro del liquido

Grdf. 2

La dosis en el centro alcanza los 125.000 r/h. La intensidad teórica del campo externo supone unos 800 r/h a un metro de distancia.

III-b₂. Dosimetría y dosis aplicadas.

Para dosis de 1.000 a 100.000 r, hemos utilizado dosímetros de sulfato ferroso, preparado según WEISS (1952).

Se colocan en el dosímetro 5 cc. de la solución 10^{-3} M de sulfato ferroamónico y se pone a irradiar a la vez que las muestras. Después de la irradiación se efectúa la colorimetría del ión férrico formado. Previamente obtuvimos la curva patrón del ión férrico para la colorimetría del sulfocianuro. El reactivo de color se preparó poniendo, 1 cc. de la solución de sulfocianuro 1N y enrasado a 5 cc. con sulfúrico 0,8N.

De los 5 cc. de solución de sulfato ferroamónico irradiados en el dosímetro se toman 2 cc., se le añaden 2 cc. de ácido sulfúrico 0,8N y 1 cc. de la solución de sulfocianuro amónico 1N y se leen frente a un blanco en el fotocolorímetro a 4.800 \AA . Se lleva a una gráfica en ordenadas, la absorción correspondiente y en abscisas los $\mu\text{M Fe}^{+++}/\text{l}$, formados.

T A B L A I

Nº muestras	cc. solución patrón Fe ⁺⁺⁺	Fe ⁺⁺⁺ μ M/l	Lectura en el colorímetro, 4.800 Å.
Blanco	0	0	0
1	0,2	40	0,218
2	0,5	100	0,581
3	1,0	200	0,936
4	1,5	300	1,092
5	2,0	400	1,127
6	2,5	500	1,130

Colorimetría del sulfocianuro.

Posteriormente calculamos las dosis aplicadas en función de G, siendo G el número de moléculas formadas por 100 eV, BROWNELL (1956).

Factores que hay que tener en cuenta:

1ª). 32,5 eV por par de iones en aire.

2ª). $1,61 \times 10^{12}$ pare de iones por roentgen por gramo de aire.

3ª). $6,06 \times 10^{23}$ número de moléculas gramo, por mol.

4ª). Densidad del aire.

Cuando se mide la producción de ión férrico (A) en μ M/l/r, se puede convertir en nº de moléculas de ión férrico formadas por cc. y por roentgen, por la expresión: $6,06 \times 10^{23} \times 10^{-9} \times A$, o bien $6,06 \times 10^{14} \times A$ mole/cc/r

Para las energías del fotón del Ra y del Co⁶⁰, se

considera que el sulfato ferroamónico y el agua, absorben casi enteramente por el proceso Compton. 1 gramo de la solución de sulfato ferroamónico absorberá aproximadamente la misma energía por roentgen que absorbe el aire:

$$1,61 \times 10^{12} \times 32,5 \text{ eV}$$

Puesto que 1 cc. de sulfato ferroamónico 10^{-3} M pesa 1,23 gramos, la energía absorbida por cc./r será igual a: $1,61 \times 10^{12} \times 32,5 \times 1,23 \text{ eV} = 52,3 \times 10^{12} \times \text{densidad}$

$$G = \frac{6,06 \times 10^{14} \times A \times 10^2}{52,3 \times 10^{12} \times \text{densidad}} = \frac{1.158,7 \times A}{\text{densidad}} = \frac{1.158,7 \times A}{1,23}$$

Se ha determinado G por el método colorimétrico para radiación gamma y tiene el valor de $15,6 \pm 0,3$ (HOCHANADEL y GHORMLEY) y $15,8 \pm 0,3$ (LAZO y col.); $15,45 \pm 0,11$ determinado por SCHULER y ALLEN es probablemente el de mayor exactitud según la revisión de PRICE (1958).

Tomemos para nuestros cálculos un valor para G = 15,5

Despejando A de la fórmula anterior tenemos:

$$A = \frac{15,5 \times 1,23}{1.158,7} = 0,0164 \text{ M/l/r}$$

El número de roentgens que ha recibido el dosímetro será:

$$n^{\circ} \text{ de r} = \frac{\mu \text{M/l (formación de Fe}^{+++})}{0,0164}$$

La Tabla II recoge las lecturas colorimétricas del ión férrico formado en relación de las dosis aplicadas.

T A B L A II

Dosis	Lecturas a 4.800 Å	µM/l (Fe ⁺⁺⁺) 2 cc.	µM/l (Fe ⁺⁺⁺) totales (en 5 cc)	roentgens calculados
1ª	0,049	8	20	1,21 x 10 ³
2ª	0,229	40	100	6,10 x 10 ³
3ª	1,020	216	540	3,29 x 10 ⁴
4ª	1,090	300	750	4,57 x 10 ⁴

Cálculo de las dosis recibidas por las muestras líquidas según el dispositivo de irradiación utilizado, Gráfica 1 (BROWNELL, 1956).

$$r/hs = \frac{\text{mg. de Ra} \times 3,4 \times \text{tang.}^{-1} (L/2d)}{d^2 \times (L/2d)}$$

d (distancia del tubo a la fuente de Ra) = 1,7 cm.

L (altura del líquido en el tubo) = 3,8 cm.

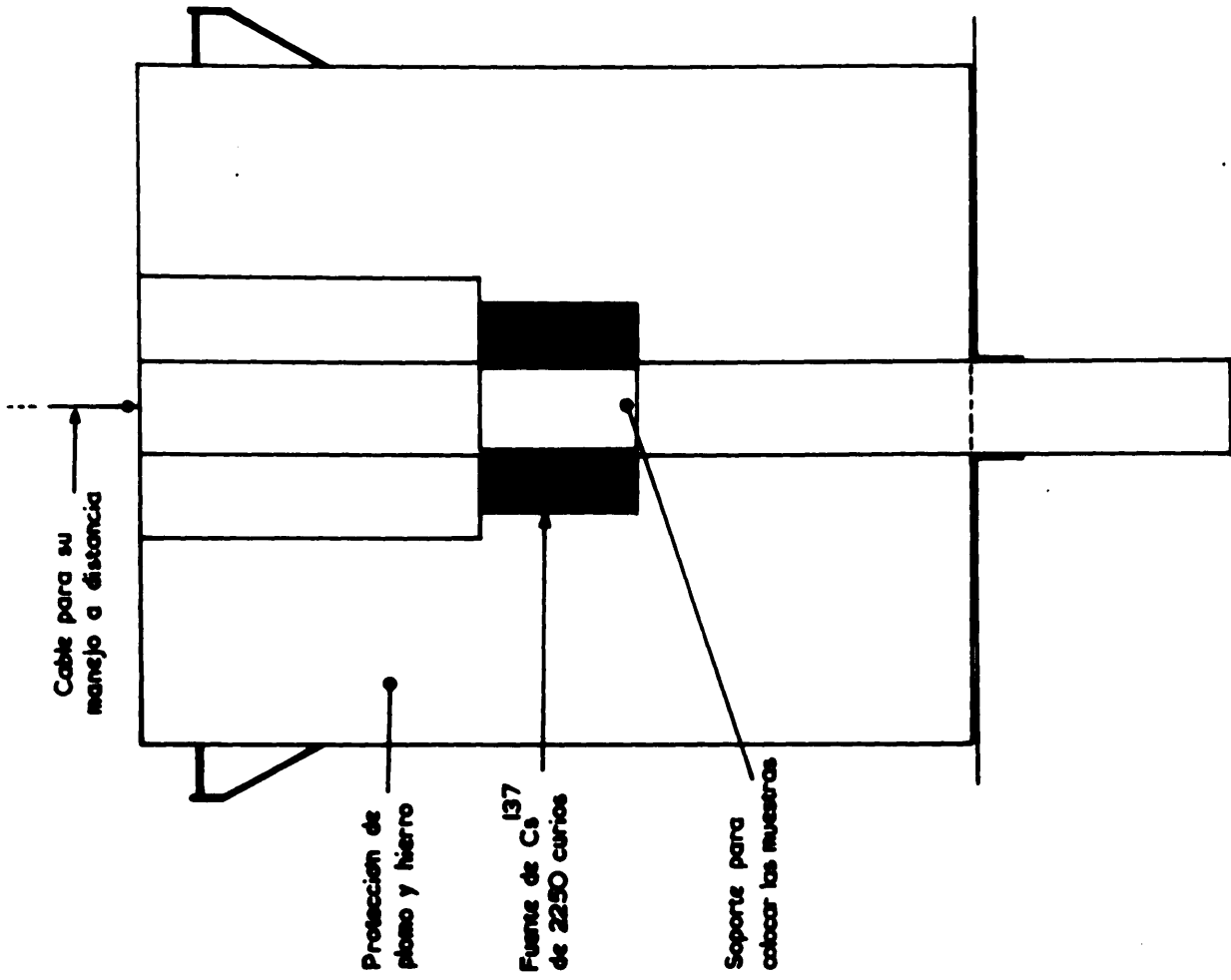
L/2d = 1,176

tang⁻¹ (arco tangente expresado en radianes L/2d =

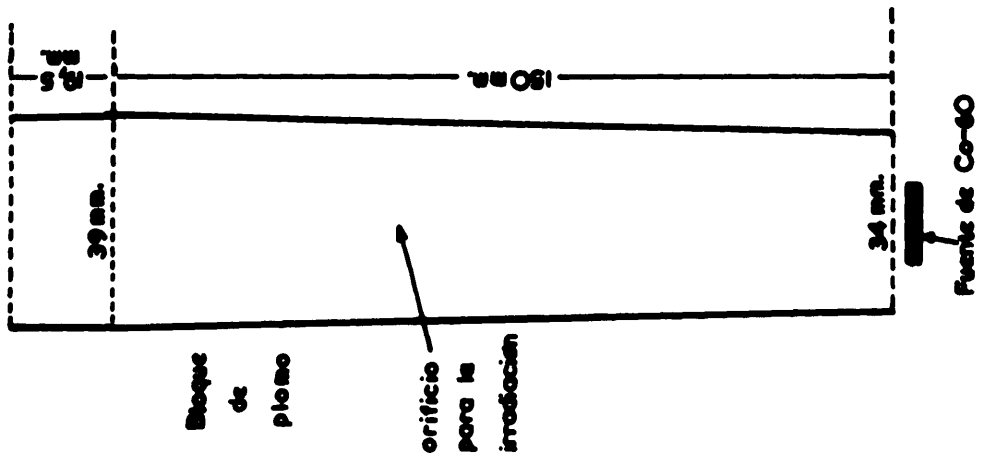
0,84 radianes.

$$r/hs = \frac{8,4 \times 0,84}{2,89 \times 1,117} \times \text{mg. Ra}$$

r = 2,185 x mg Ra x horas.



Dispositivo para irradiación interna
Gráf. 4



Gráf. 3

T A B L A III

Dosis	mg Ra	horas de irradiación	dosis parciales	dosis total
1ª	200	1,75		760 r
2ª	200	17,40		7607 r
3ª	200	183,25		80102 r
4ª	200	102,90	44967 r	
"	300	52,00	34086 r	
"	350	24,50	18735 r	
"	400	254,00	224618 r	322406 r

Dosis aplicadas con el dispositivo, Gráf. nº 2.

Se utiliza la misma formula anterior.

L (altura del líquido en el tubo) = 10,6 cm.

d (distancia del centro de la fuente de irradiación a la mitad del líquido irradiado) = 1,4 cm.

$$L/2d = \frac{10,6}{2,8} = 3,7857$$

arco tangente 3,7857 = 1,3124 radianes.

$$r/h = \frac{\text{mg Ra} \times 8,4 \times 1,3124}{7,42} = 1,486 \times \text{mg Ra}$$

r = 1,486 x mg Ra x horas.

Como la irradiación duró largo periodo de tiempo y la proteína estaba a mayor concentración, se encontraba totalmente desnaturalizada; no se obtuvieron los espectros, ni se determinaron los demás índices.

Cálculo de dosis: fente de Co⁶⁰, dispositivo gráfica nº 3.

Según la calibración de esta fuente en el lugar que estaba irradiada, daba 420 r/hora/25,5 cm. distancia.

$$r/h = \frac{1}{h} \frac{ND^2}{(d+x)^2} \quad dx = \frac{ND^2}{d(d+h)}$$

$$N = 240 \text{ r/h}$$

$$D = 25,5 \text{ cm}$$

d = distancia del tubo que contiene la solución a la fuente de Co⁶⁰.

h = altura del líquido en el tubo.

1ª dosis:

$$n^{\circ} r = \frac{420 \times 25,5^2 \times 17}{3,24 (3,24 + 10,5)} = 1,04 \times 10^5 \text{ r}$$

$$d = 3,24 \text{ cm}$$

$$h = 10,5 \text{ cm}$$

tiempo = 17 horas.

2ª dosis:

$$n^{\circ} r = \frac{420 \times 25,5^2 \times 17}{0,4 (0,4 + 10,5)} = 1,064 \times 10^6 \text{ r}$$

$$d = 0,4 \text{ cm}$$

$$h = 10,5 \text{ cm}$$

tiempo = 17 horas.

Fuente de Cs¹³⁷, dispositivo según la Gráfica nº 4.

Como ya hemos indicado la irradiación se ha efectuado en el interior de la fuente donde se recibe la mayor eficiencia. Esta fuente está calibrada para dosis desde 0 a 125.000 r/h.

Según la calibración que tienen hecha de dicha fuente, nosotros hemos aplicado las siguientes dosis:

1ª dosis: 10^5 r/1 hora.

2ª dosis: 2×10^6 r/20 horas.

C - III. Irradiación de aminoácidos y glucosamina.

C - III. Irradiación de aminoácidos.

III-c₁. Espectro de absorción en el ultravioleta de diversos aminoácidos y de glucosamina, irradiados con diferentes dosis y su comparación con los espectros normales.

Se han obtenido los espectros de absorción de varios aminoácidos y de glucosamina antes y después de irradiar y a las dosis indicadas. Estos resultados van tabulados en la Tabla IV y gráficas nº 5 a nº 12.

Con la fuente de Ra se aplicó la dosis de 68.718 r en un dispositivo que se muestra en la Gráfica nº 1.

Con la fuente de Cs¹³⁷ aplicamos 2×10^6 r en el dispositivo ya indicado.

De glucosamina utilizamos dos muestras distintas, la que se irradió con Ra creemos que tenía menor pureza que la que se irradió con Cs¹³⁷, así es que los espectros normales de estas dos muestras son bastante distintos.

El espectro del triptofano presenta el máximo de absorción en la misma longitud de onda que el ovomucoide, por cuya razón nos ha parecido conveniente tenerlo en cuenta.

En la Gráfica nº 13 representamos el espectro ultravioleta de la hidrólisis ácida del ovomucoide con y sin triptofano, y en la Gráfica nº 14 hacemos una

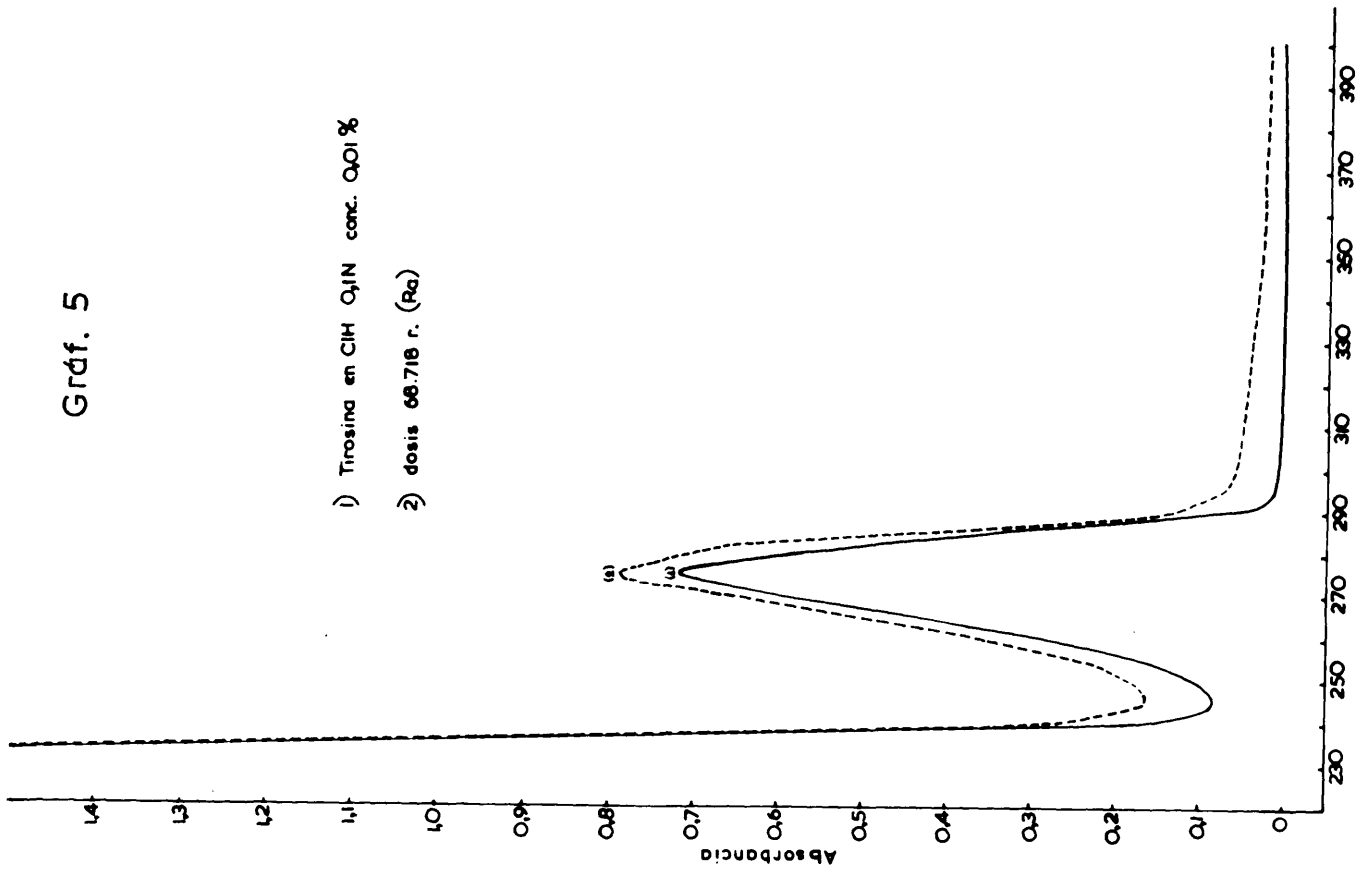
T A B L A IV

Modificaciones del espectro de absorción ultravioleta por la acción indirecta de la radiación gamma, en aminoácidos aromáticos y glucosaminas

	DOSIS en r.-	ABSORBANCIA mínima	λ en m μ	ABSORBANCIA máxima	λ en m μ	BANDA ESPECTRAL
Glicina	Control					hasta 330
"	68718					hasta 340
Metionina	Control					hasta 255
"	68718					hasta 255
-fenilalanina	Control	0,194	232	1,01	258	232 - 310
"	68718	0,575	236	1,35	257	237 - 295
Tirosina	Control	0,083	246	0,720	275	247 - 298
"	68718	0,165	246	0,700	275	247 - 305
Triptofano	Control	0,096	243	0,256	278	245 - 310
Glucosamina	Control	0,160	245	0,283	275	245 - 310
"	68718	0,105	240	0,158	282	240 - 330
Glucosamina	Control					hasta 248
"	2 x 10 ⁶					hasta 360
Acido Aspártico	Control					240 - 300
"	2 x 10 ⁶					240 - 300

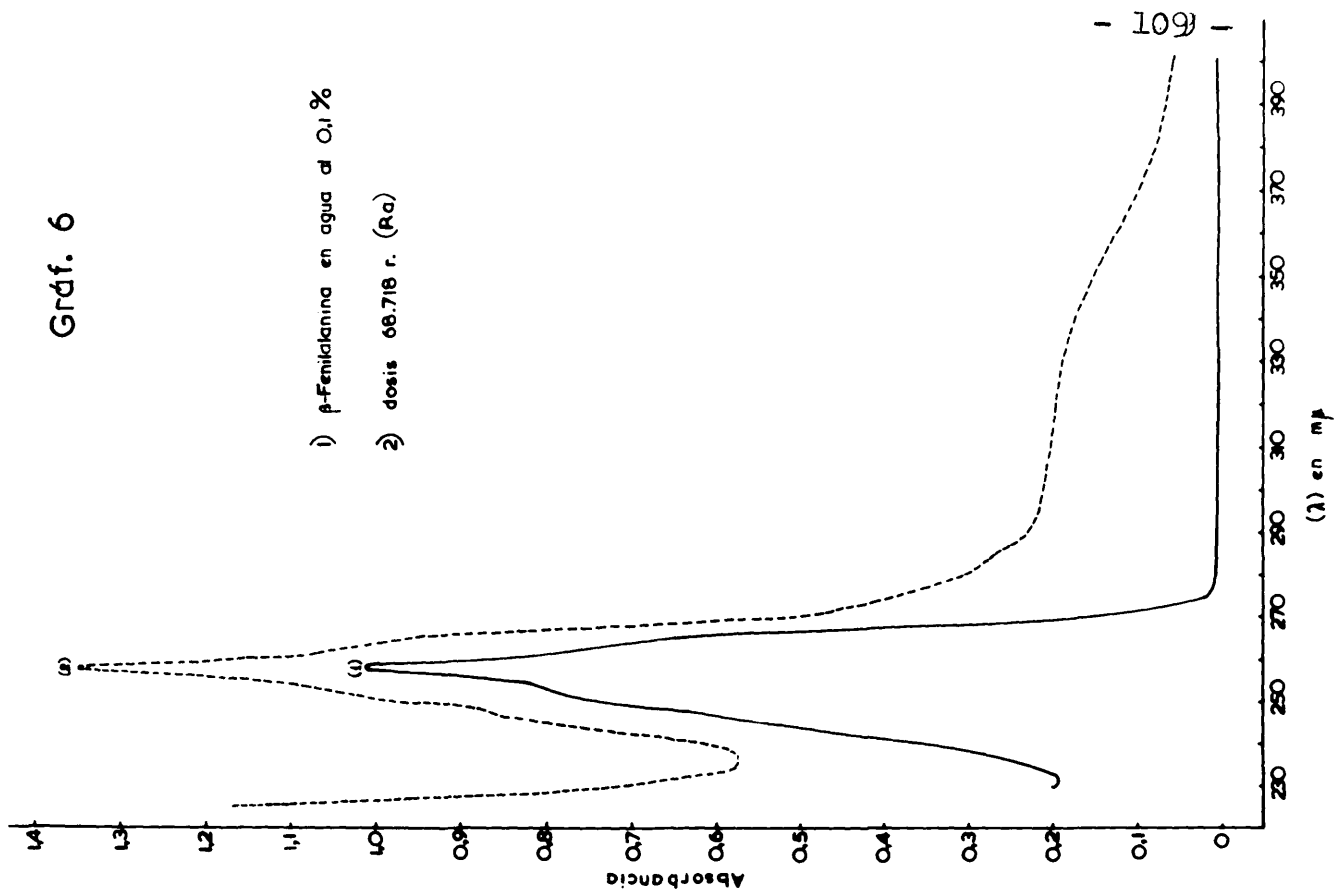
Gráf. 5

- 1) Tirosina en ClH O₃N conc. 0,01 %
- 2) dosis 68.718 r. (Ra)



Gráf. 6

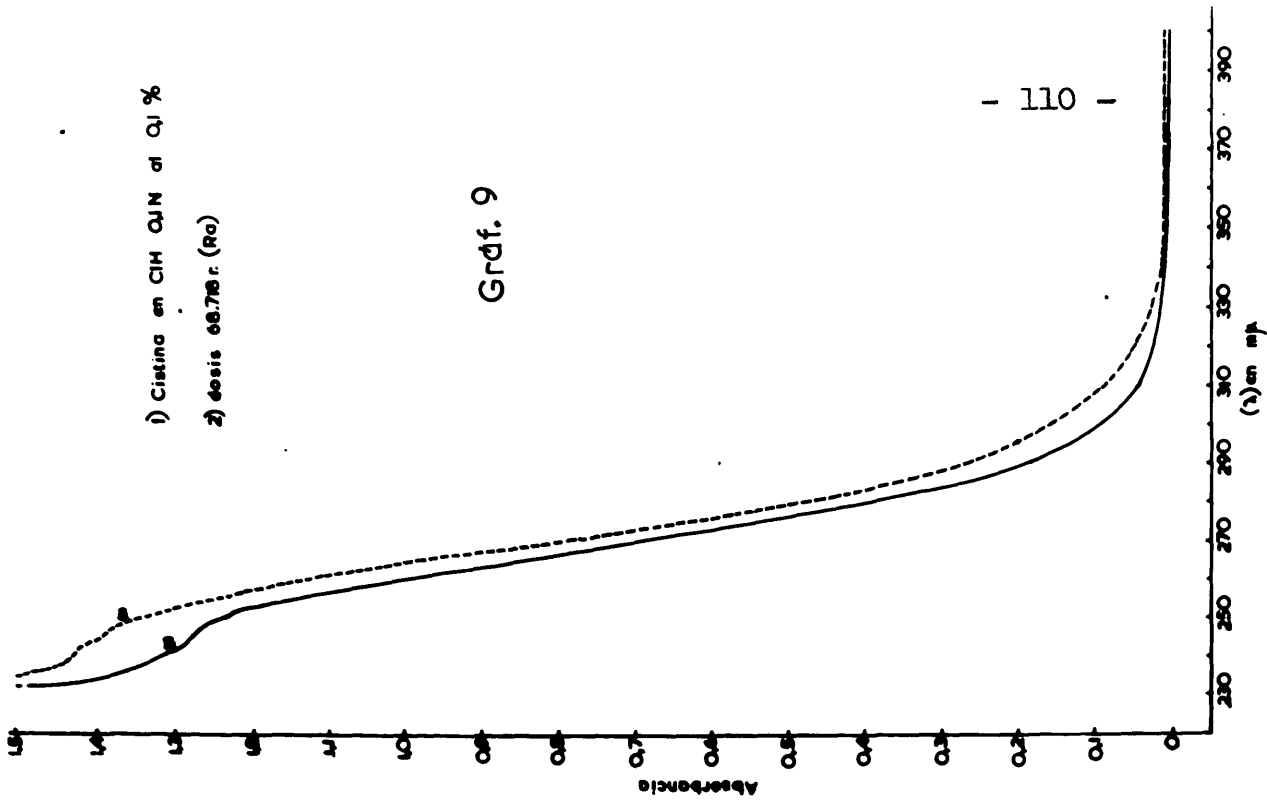
- 1) β-Fenilalanina en agua al 0,1 %
- 2) dosis 68.718 r. (Ra)



109

- 1) Cistina en ClH OJN al 0,1 %
- 2) dosis 66.718 r. (Ra)

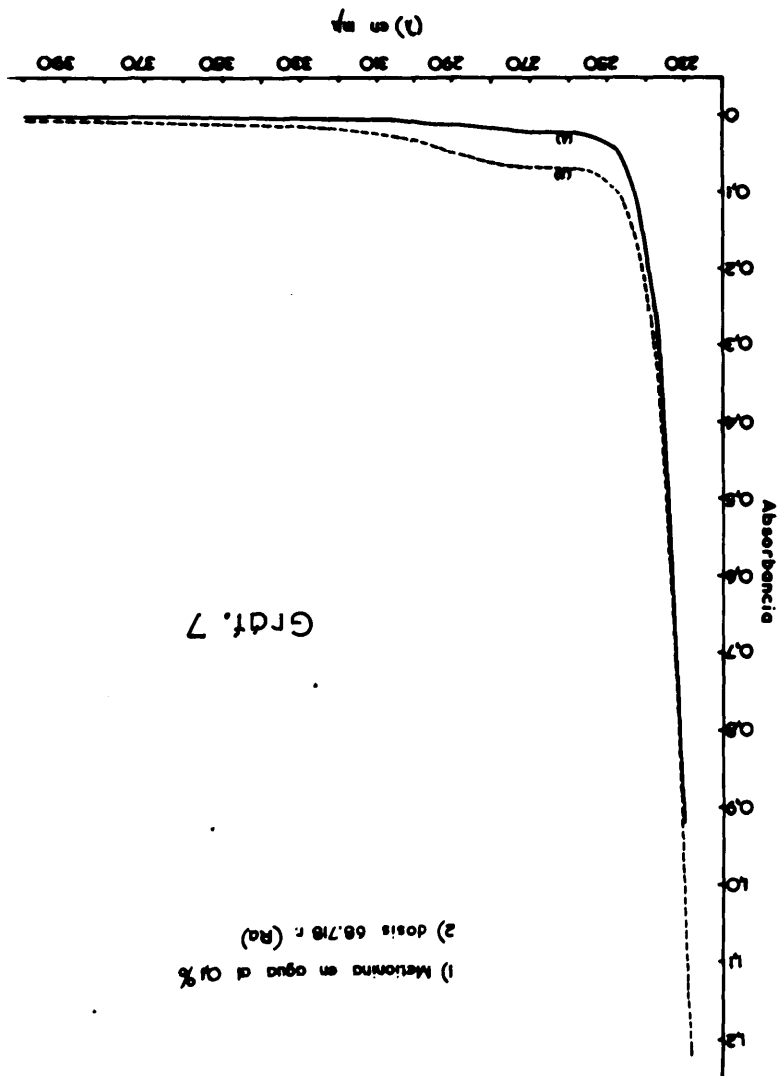
Grdf. 9



- 110 -

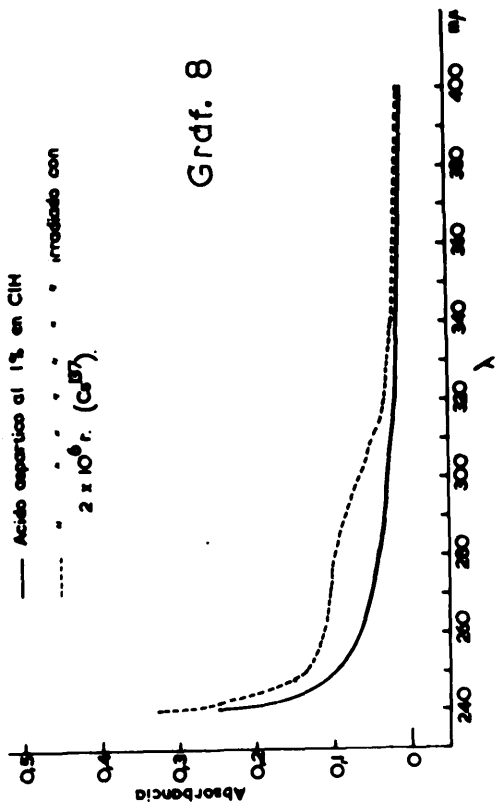
- 1) Metionina en agua al 0,1 %
- 2) dosis 66.718 r. (Ra)

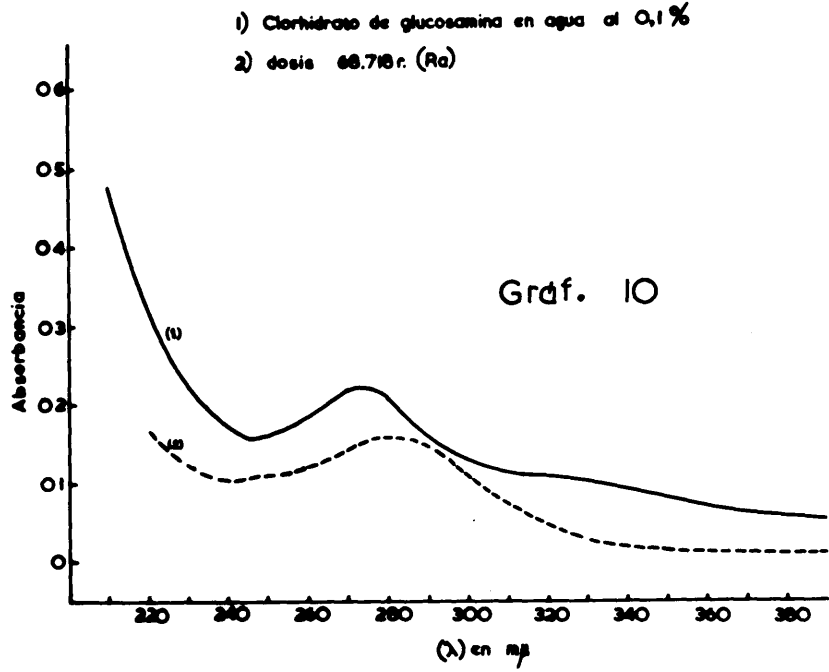
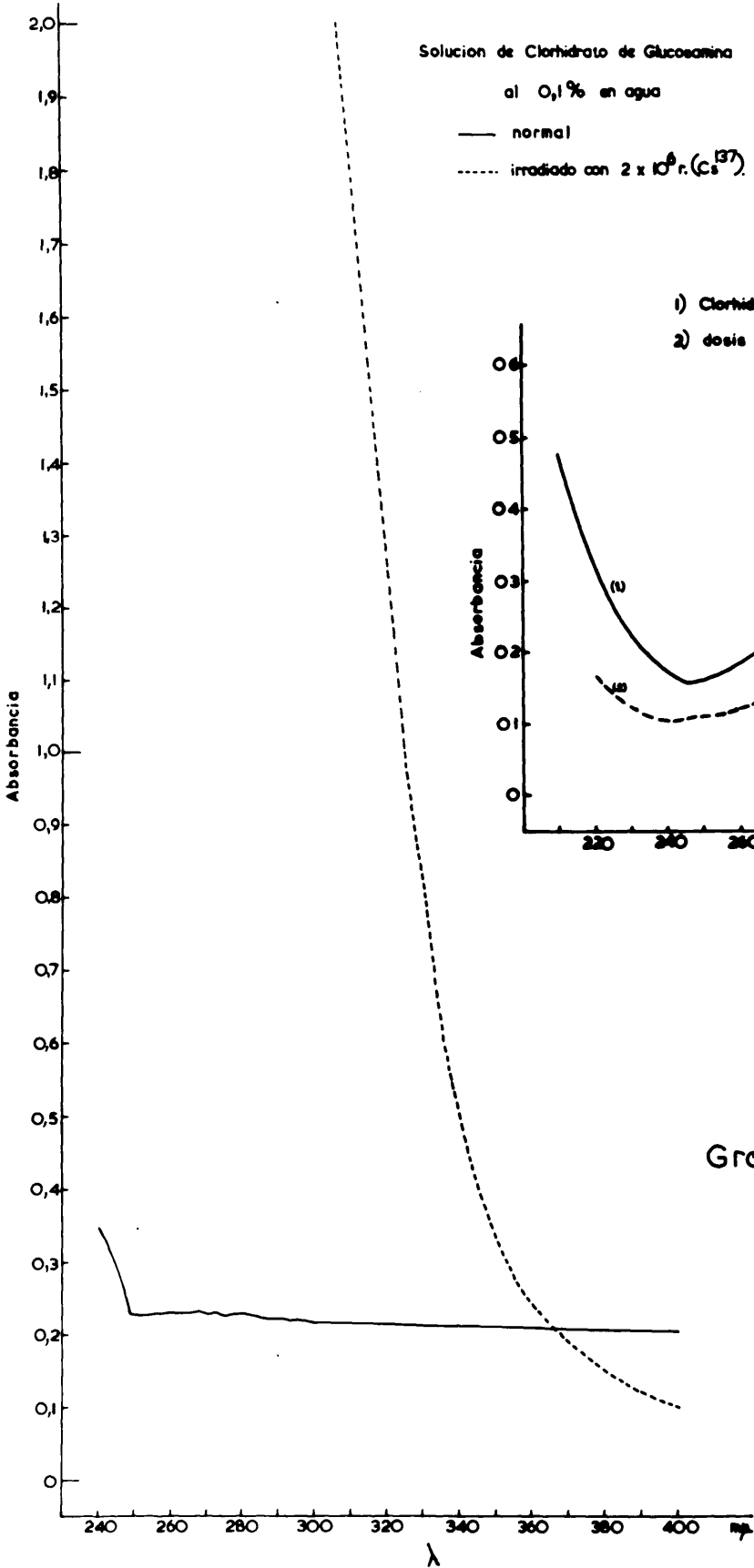
Grdf. 7

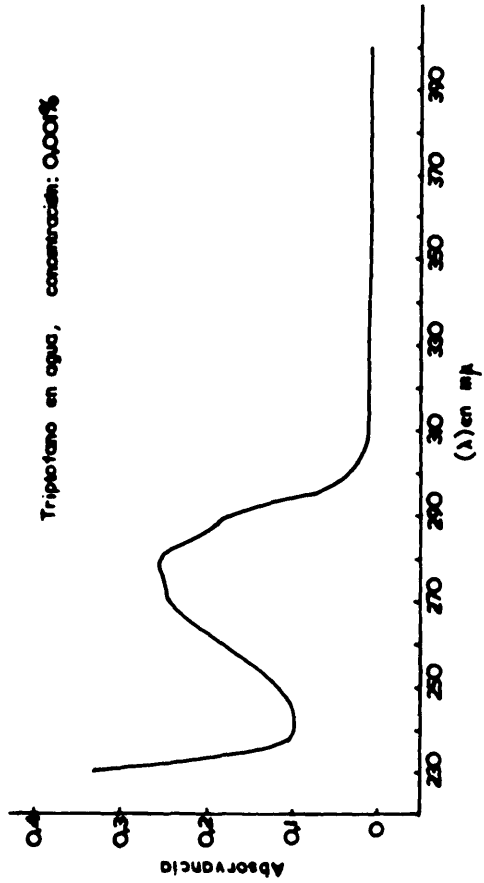


- Acido aspartico al 1% en ClH
 - - - - - 2 x 10⁶ r. (Co⁶⁰) irradiado con

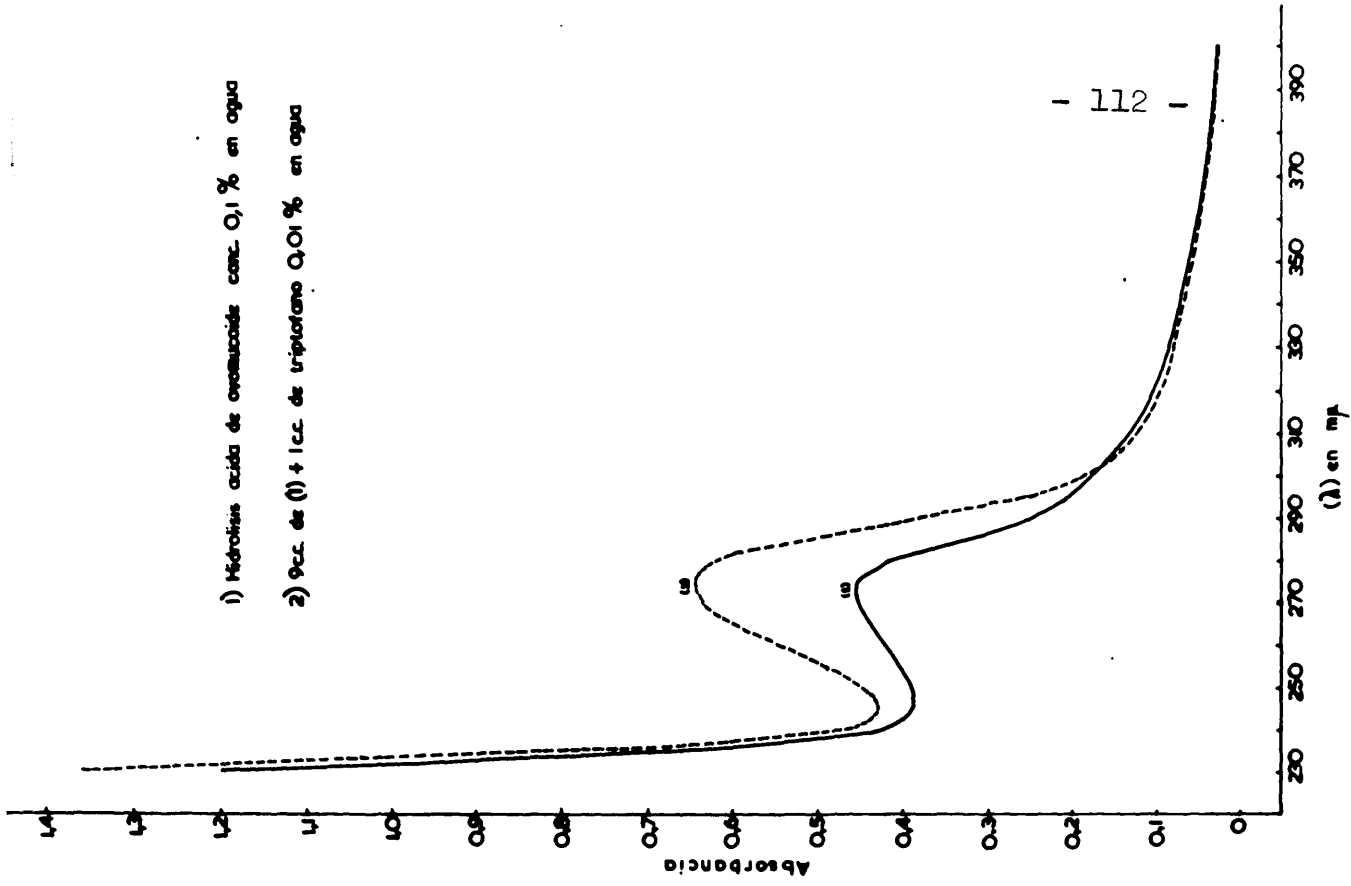
Grdf. 8

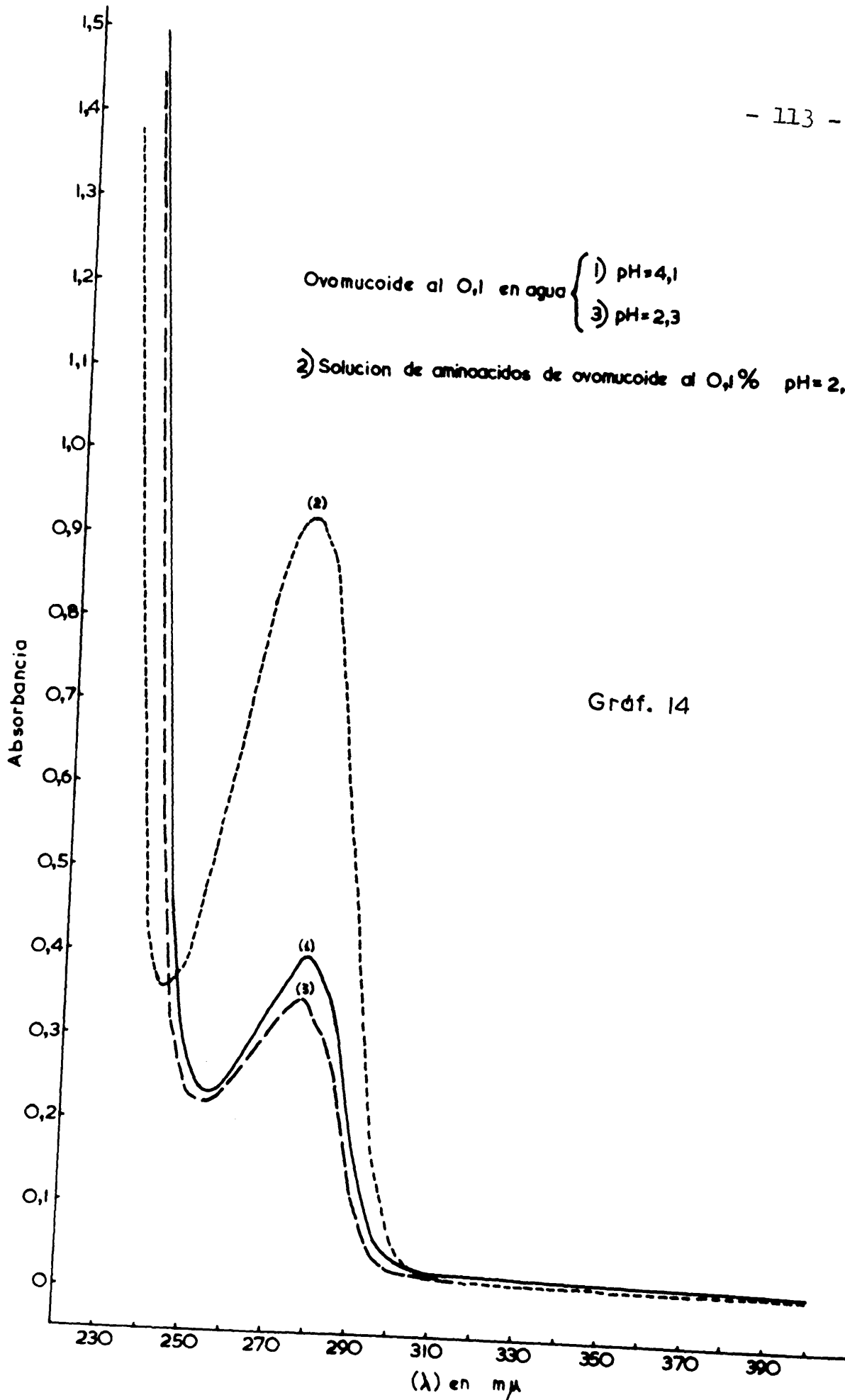






- 1) Hidrolisis acida de ovalbumina conc. 0,1 % en agua
- 2) 9cc. de (1) + 1cc. de triptofano 0,01 % en agua





comparación del espectro normal del ovomucoide con el obtenido de una mezcla sintética de los aminoácidos que lo forman, en la proporción dada por ROMANOFF.

Tabla IV bis.

III-c₂. Determinación de la relación tirosina-triptofano en el ovomucoide después de la irradiación.

Según lo indicado en el párrafo III-a₃, para calcular esta relación hemos utilizado la fórmula

$$\frac{M_{\text{Tirosina}}}{M_{\text{Triptofano}}} = \frac{0,592 D_{294,4} - 0,263 D_{280,0}}{0,263 D_{280,0} - 0,170 D_{294,4}}$$

Siendo las densidades ópticas antes y después de irradiar:

Antes de irradiar	Después de irradiar
$D_{280,0} = 0,460$	$D_{280,0} = 1,15$
$D_{294,4} = 0,613$	$D_{294,4} = 0,987$

valores que sustituidos en la fórmula anterior dan:

antes de irradiar

$$\frac{M_{\text{Tirosina}}}{M_{\text{Triptofano}}} = 14,5$$

después de irradiar

$$\frac{M_{\text{Tirosina}}}{M_{\text{Triptofano}}} = 2,08$$

TABLA IV bis

Comparación de los espectros del ovomucoide con los de la mezcla sintética de aminoácidos, de la hidrólisis ácida del ovomucoide y de la influencia del triptofano.

	pH	Absorbancia (mínima)	λ en m μ .	Absorbancia (máximo)	λ en m μ .	Banda es- pectral m μ .
Ovomucoide 0,1%	4,1	0,235	256	0,400	277	256-305
"	2,3	0,221	254	0,348	276	254-300
Sol. aminoácidos ov	2,3	0,358	244	0,924	276	244-310
Hidrólisis ácida de ovomucoide		0,385	247	0,455	274	247-310
Sec hidrol. ácida ov + lec trip. 0,01%		0,428	246	0,645	275	246-310

III-c₃. Análisis de la difusión Rayleigh en los espectros de las muestras anteriores.

Hemos comparado los espectros obtenidos de las diferentes sustancias antes y después de irradiar para poder determinar los cambios intra e intermoleculares que han tenido lugar durante la irradiación.

Se representa gráficamente la función $\lambda^4 \Delta$ frente a λ , siendo Δ la diferencia de absorción en el espectro de las sustancias antes y después de la irradiación y λ la longitud de onda a estas diferencias.

En las tablas V y VI, gráfica 15, correspondientes a metionina y cistina, se observa que estas no manifiestan prácticamente a las dosis que han sido irradiadas, ningún cambio; sin embargo la beta-fenilalanina a la misma dosis está francamente alterada. Tabla VII, Gráfica 15.

La tirosina manifiesta un pequeño cambio intramolecular, Tabla VIII, Gráfica 15; pero el ácido aspártico correspondiente a la Tabla IX, Gráfica 15, se ve que a pesar de haber sido sometido a una dosis de radiación de 2×10^6 r está casi inalterado.

En las Tablas X y XI, Gráfica 15, correspondientes a la glucosamina, se ve que a pequeñas dosis hay disminución en la absorción, ahora bien, no tenemos seguridad de la pureza de este producto. Con otra nueva muestra de glucosamina más pura sometida a una dosis de 2×10^6 r, aparece como una sustancia extraordinariamente sensible a la radiación, y está alterada.

T A B L A V

Análisis de la difusión Rayleigh

Metionina en agua al 0,1 %. Dosis: 68.718 r (Ra)

λ	Δ	$\lambda^2 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
240	0,030	33,18	0,995
245	0,045	36,03	1,621
250	0,050	39,06	1,953
255	0,045	42,28	1,903
260	0,045	45,70	2,056
265	0,050	49,32	2,466
270	0,045	53,14	2,391
275	0,045	57,19	2,574
280	0,045	61,47	2,766
285	0,040	65,98	2,639
290	0,030	70,73	2,122
295	0,025	75,73	1,893
300	0,025	81,00	2,025
305	0,020	86,54	1,731
310	0,020	92,35	1,847
320	0,010	104,86	1,049
330	0,010	118,59	1,186
340	0,010	133,63	1,336

T A B L A VI

Cistina en OLN 0,1N al 0,1 %. Dosis: 68.718 r (Ra)

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
240	0,123	33,18	4,081
245	0,110	36,03	3,963
250	0,105	39,66	4,102
255	0,090	42,28	3,805
260	0,100	45,70	4,570
265	0,095	49,32	4,685
270	0,085	53,14	4,517
275	0,080	57,19	4,575
280	0,080	61,47	4,917
285	0,090	65,98	5,938
290	0,070	70,73	4,951
295	0,065	75,73	4,923
300	0,058	81,00	4,698
305	0,050	86,54	4,327
310	0,040	92,35	3,694
320	0,025	104,86	2,621
330	0,015	118,59	1,779

T A B L A VII

-fenilalanina en agua al 0,1 %.Dosis: 68.718 r (Ra)

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \times 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
240	0,2775	33,18	9,207
245	0,2650	36,03	9,548
250	0,2550	39,06	9,961
255	0,3400	42,28	14,376
260	0,2700	45,70	12,338
265	0,2900	49,31	14,302
270	0,3500	53,14	18,600
275	0,3675	57,19	21,018
280	0,2925	61,47	17,979
285	0,2650	65,98	17,483
290	0,2200	70,73	15,560
295	0,2100	75,73	15,904
300	0,2050	81,00	16,605
305	0,2000	86,54	17,307
310	0,1975	92,35	18,240
320	0,1900	104,86	19,923
330	0,1850	118,59	21,940
340	0,1700	133,63	22,718
350	0,1475	150,06	22,134
360	0,1200	167,96	20,155
370	0,0925	187,41	17,336
380	0,0750	208,51	15,639
390	0,0600	231,34	13,881
400	0,0525	256,00	13,440

T A B L A VIII

Tirosina al 0,01 % en ClH 0,1N. Dosis: 68.718 r (Ra)

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^2 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^2 \Delta$
240	0,105	33,18	3,484
245	0,0825	36,03	2,973
250	0,0750	39,06	2,930
255	0,0700	42,28	2,959
260	0,0625	45,70	2,856
265	0,0600	49,32	2,960
270	0,0625	53,14	3,322
275	0,0700	57,19	4,003
280	0,0800	61,47	4,917
285	0,0850	65,98	5,608
290	0,0775	70,73	5,481
295	0,0600	75,73	4,544
300	0,0500	81,00	4,050
305	0,0475	86,54	4,111
310	0,0450	92,35	4,156
315	0,0450	98,46	4,431
320	0,0400	104,86	4,194
330	0,0350	118,59	4,151
340	0,0300	133,63	4,009
350	0,0250	150,06	3,752
360	0,0200	167,96	3,359
370	0,0175	187,42	3,280
380	0,0175	208,51	3,649
390	0,0150	231,34	3,470
400	0,0125	256,00	3,200

T A B L A IX

Aspartico al 1 % en OIH. Dosis: 2×10^6 r (^{137}Cs)

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
240	0,08	33,18	2,65
245	0,06	36,03	2,16
250	0,05	39,06	1,95
255	0,05	42,28	2,11
260	0,045	45,70	2,06
265	0,05	49,32	2,47
270	0,05	53,14	2,66
275	0,055	57,19	3,15
280	0,055	61,47	3,38
285	0,055	65,98	3,63
290	0,045	70,73	3,18
295	0,045	75,73	3,41
300	0,035	81,00	2,84
305	0,03	83,54	2,51
310	0,0275	92,35	2,54
320	0,015	104,86	1,57
330	0,015	118,59	1,78
340	0,025	133,63	0,67

T A B L A X

Clorhidrato de Glucosamina en agua al 0,1 %

Dosis: 68.718 r (Ra).

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^2 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^2 \Delta$
240	0,0650	33,18	2,15
245	0,0550	36,03	1,98
250	0,0500	39,06	1,95
255	0,0600	42,28	2,54
260	0,0600	45,70	2,74
265	0,0700	49,32	3,45
270	0,0800	53,14	4,25
275	0,0650	57,19	3,72
280	0,0525	61,47	3,23
285	0,0275	65,98	1,81
290	0,0150	70,73	1,06
295	0,0100	75,73	0,76
300	0,0225	81,00	1,82
305	0,0300	86,54	2,60
310	0,0400	92,35	3,69
315	0,0525	98,46	5,17
320	0,0625	104,86	6,55
330	0,0800	118,59	9,49
340	0,0725	133,63	9,69
350	0,0650	150,06	9,75
360	0,0600	167,96	10,08
370	0,0500	127,42	9,37

T A B L A S X I

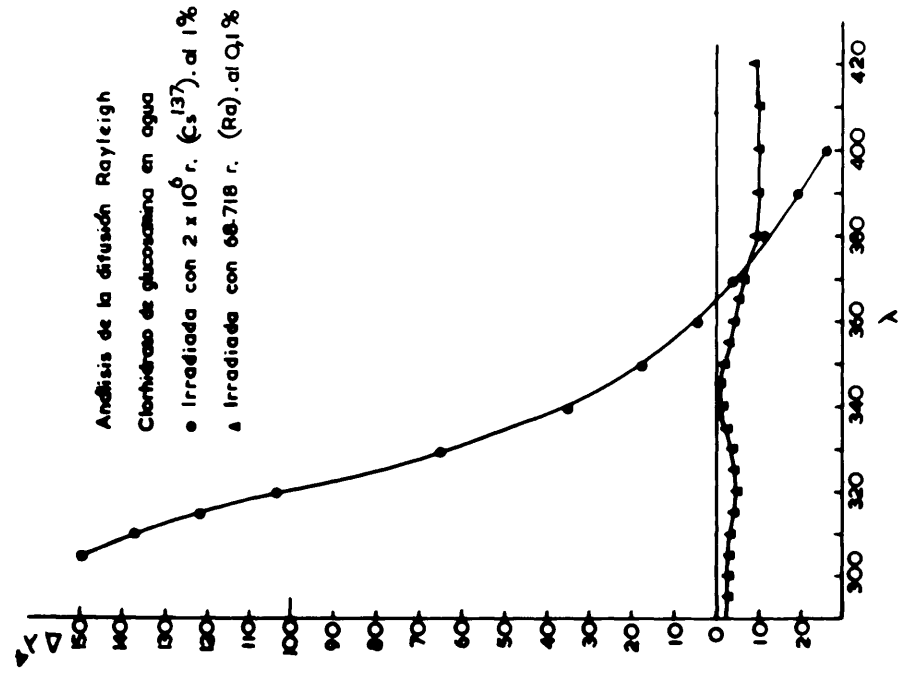
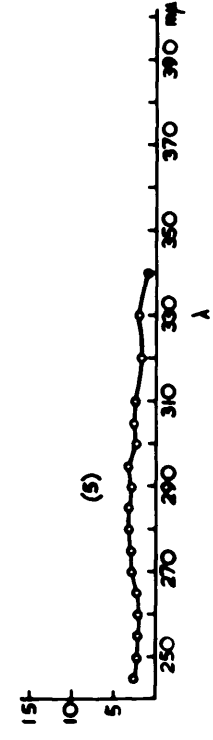
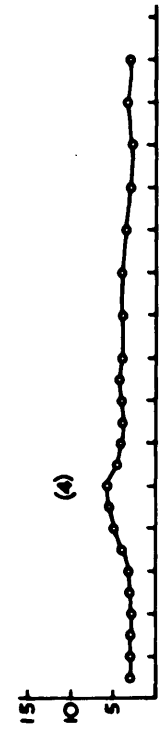
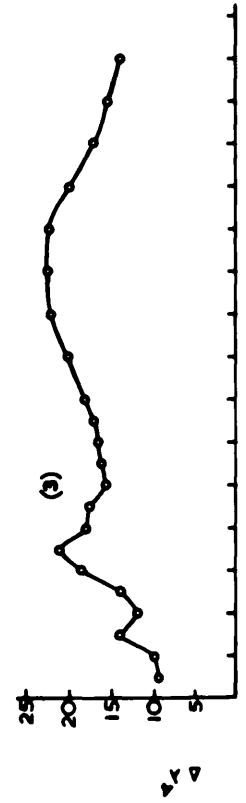
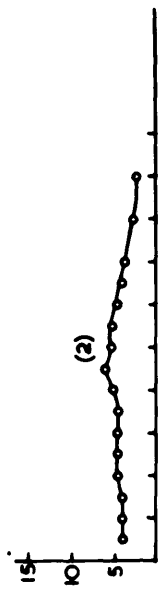
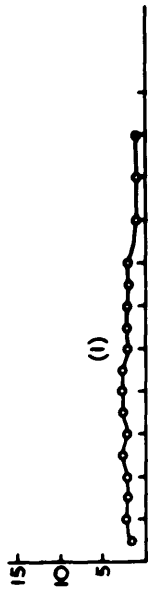
Clorhidrato de Glucosamina al 1 % en agua. Dosis: 2×10^6 r
(Cs¹³⁷) Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
305	1,785	83,54	149,11
310	1,485	92,30	137,14
315	1,235	98,46	121,59
320	0,985	104,86	103,28
330	0,550	118,59	65,23
340	0,265	133,63	35,41
350	0,115	150,06	17,26
360	0,025	167,96	4,20
370	-0,020	187,42	-3,75
380	-0,055	208,51	-11,47
390	-0,085	231,34	-19,66
400	-0,102	256,00	-26,11

Gráf. 15

Análisis de la difusión Rayleigh

- Diferencia de extinción entre las curvas irradiadas y sin irradiar
- 1) Metionina al 0,1% en agua. Dosis 68.718 r (Ra)
 - 2) Cistina " " en CIH. " 68.718 r (Ra)
 - 3) Fenilalanina " " en agua. " 68.718 r (Ra)
 - 4) Tirosina al 0,01% en CIH. " 68.718 r (Ra)
 - 5) Acido Aspartico al 0,5% en CIH. " 2×10^6 r (C_s^{137})



Análisis de la difusión Rayleigh
 Glucosa de glucosamina en agua
 • Irradiada con 2×10^6 r. (C_s^{137}), al 1%
 ▲ Irradiada con 68.718 r. (Ra), al 0,1%

D - III. Radiosensibilidad del ovomucoide comparada con la de la seroalbúmina bovina, ovoalbúmina y glicoproteína bovina (fracción VI).

D - III. Radio-sensibilidad del ovomucoide comparada con la de la seroalbúmina bovina, ovoalbúmina y glicoproteína bovina (fracción VI).

III-d₁. Determinación de grupos NH₂ y glucosamina en las proteínas anteriormente indicadas, antes y después de irradiar.

Según recopilación bibliográfica las proteínas en cuestión tienen la siguiente composición en aminoácidos y carbohidratos, que recogemos para poder discutir posteriormente la influencia que dichos constituyentes pudieran tener en la radiosensibilidad de las proteínas. De la glicoproteína bovina (fracción VI), no tenemos más datos que los determinados por nosotros en exosemina y grupos NH₂, Tabla XII.

Se determina el pH de las soluciones de proteínas antes y después de irradiar, y los resultados quedan tabulados en la Tabla XIII.

La Tabla XIV recoge los resultados obtenidos en exosemina, antes y después de irradiar, y se establece la comparación del contenido en las cuatro proteínas. Observando que a la dosis de 10⁵ r, prácticamente no se modifican. A dosis de 2 x 10⁶ r; francamente disminuye en todos.

En la Tabla XIV están también recogidos los resultados del análisis de grupos NH₂ en el ovomucoide y las restantes proteínas, antes y después de irradiar. Obser-

T A B L A X I I

Constituyentes por ciento de las proteínas irradiadas según:

Constituyentes	Ovealbúmina FHVOLD (1951)	Ovumocoide FHVOLD (1951)	Seroalbúmina STEIN y MOORE(19
Alanina	5,8; 6,7	2,3	6,25
Arginina	5,9; 5,6	3,7	5,90
Acido Aspártico	9,4; 8,6; 7,4	13,0	10
Cistina-Cisteina	1,33; 1,78; 2,0	6,7; 4,0; 6,3	
Cisteina	1,0; 1,28; 1,41		5,91
Acido Glutámico	16,1; 14,0; 16,9	6,1	16,5
Glicina	3,2	3,8	1,82
Histidina	2,3; 1,5; 1,6	2,2	4,0
Hidroxiprolina		0	
Isoleucina	7,7; 7,0	1,4	2,61
Leucina	10,1; 9,2; 9,6	5,1	12,27
Lisina	6,6; 6,1; 5,0	6,0	12,83
Metionina	5,2; 4,85	0,9; 1,4	1,81
Fenilalanina	7,8; 6,3; 5,4	2,9	6,59
Prolina	4,0; 3,0	2,7	4,75
Serina	8,7; 10,3; 8,1	4,2	4,23
Triptofano	1,2	0,3; 1,6; 2,0	0,58
Treonina	4,1; 3,6; 4,48	5,5	5,83
Tirosina	3,9	3,4	5,06
Valina	7,1; 8,9	6,0	5,92
N-total	15,8	13,3; 13,5	
N-amino	0,7	0,68	
N-amido	1,1; 1,23; 1,4	1,0	
S	1,5; 1,62	2,2; 2,3	0,95
P	0,099; 0,13	0	
Manosa	1,8	9,7; 12,5; 10,2	
Glucosamina	0,9; 1,4	17,0; 12,6; 12,5; 13,5	

TABLA XIV

Variación de los grupos NH₂ y de la Glucosamina en proteínas irradiadas. Ca¹³⁷.

	--- GRUPOS NH ₂ ---			
	Ovomucoide	Ovoalbúmina	Glicoproteína bovina	Seroalbúmina bovina
Normal	2,8 NH ₂ /cc	4,7 NH ₂ /cc	6,0 NH ₂ /cc	8,75 NH ₂ /cc
Irradiada con 10 ⁵ r	2,8 NH ₂ /cc	4,9 NH ₂ /cc	10,9 NH ₂ /cc	9,40 NH ₂ /cc
Irradiada con 2x10 ⁶ r	4,0 NH ₂ /cc	5,5 NH ₂ /cc	11,5 NH ₂ /cc	10,1 NH ₂ /cc
	--- GLUCOSAMINA ---			
	Ovomucoide	Ovoalbúmina	Glicoproteína bovina	Seroalbúmina bovina
Normal	10,45 %	1,38 %	1,30 %	0,155 %
Irradiada con 10 ⁵ r	10,60 %	1,24 %	1,57 %	0,160 %
Irradiada con 2x10 ⁶ r	4,40 %	0,70 %	0,71 %	0,10 %

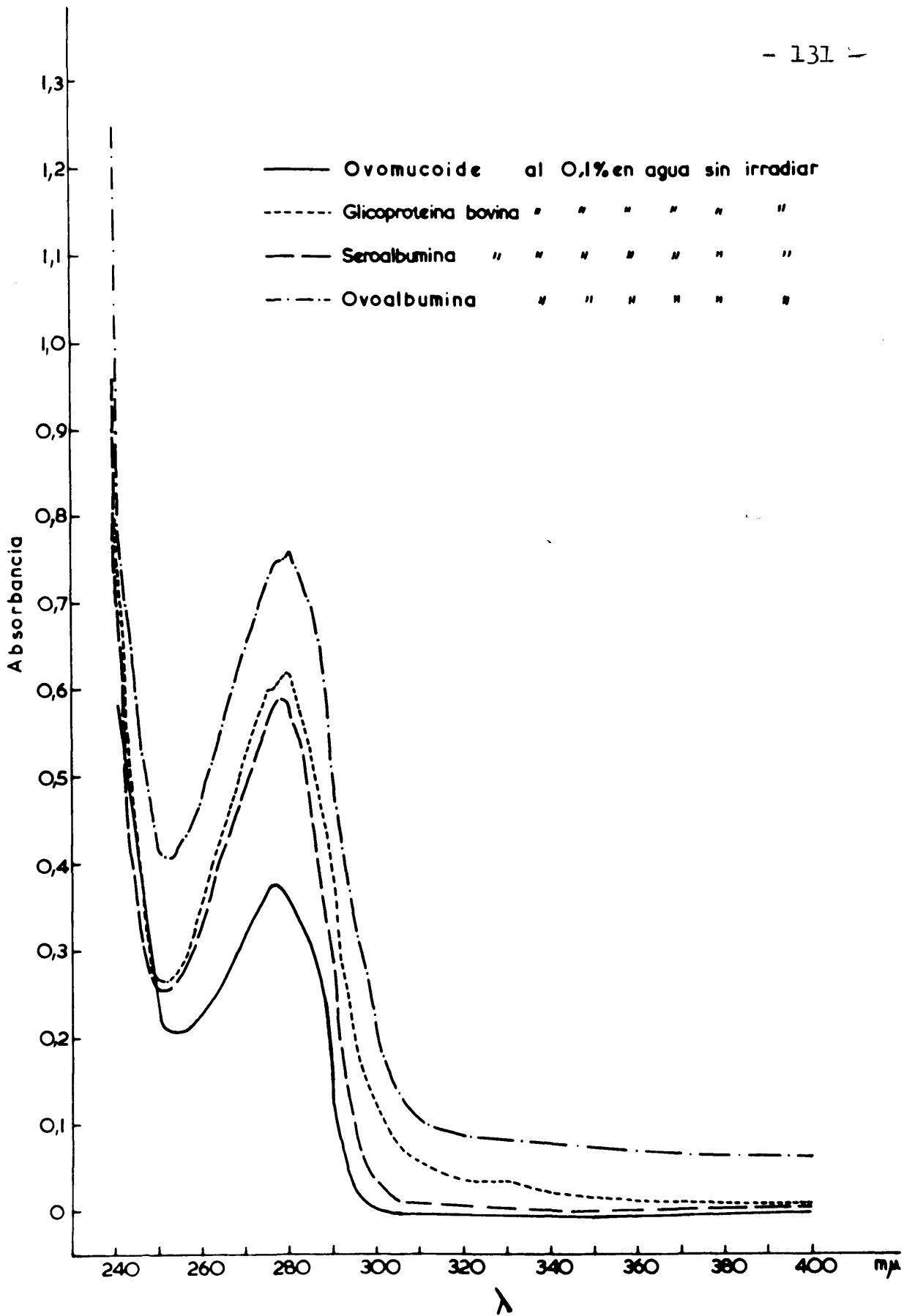
vamos que para la dosis de 10^5 r los grupos NH_2 en el ovomucoide y en la ovoalbúmina no varían en relación con los normales, sin embargo en la dosis de 2×10^6 r existe aumento de los mismos, inversamente a lo que ocurre con la glucosamina. En la glicoproteína y seroalbúmina hay aumento de grupos NH_2 aún a dosis de 10^5 r.

III-d₂. Espectro de absorción en el ultravioleta de dichas proteínas antes y después de irradiar.

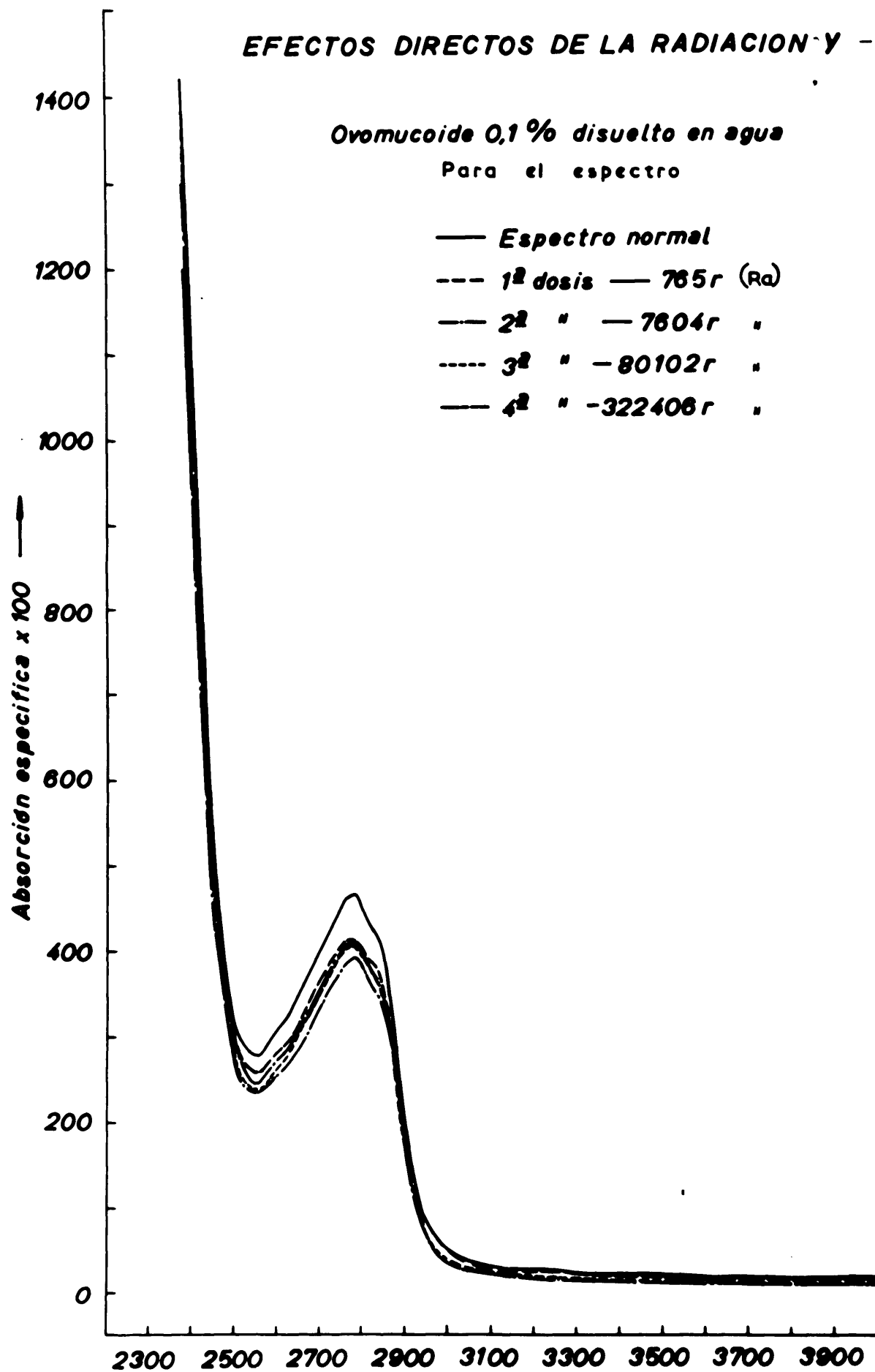
Obtuvimos primero los espectros normales de las cuatro proteínas que llevamos en la misma Gráfica, nº 16, observando que el que presenta menor absorción es el ovomucoide y el de mayor la ovoalbúmina, teniendo una absorción intermedia muy similar las dos proteínas bovinas. Probablemente el ovomucoide presenta menor absorción, por su pequeño contenido en triptofano, que contribuye específicamente al máximo de absorción.

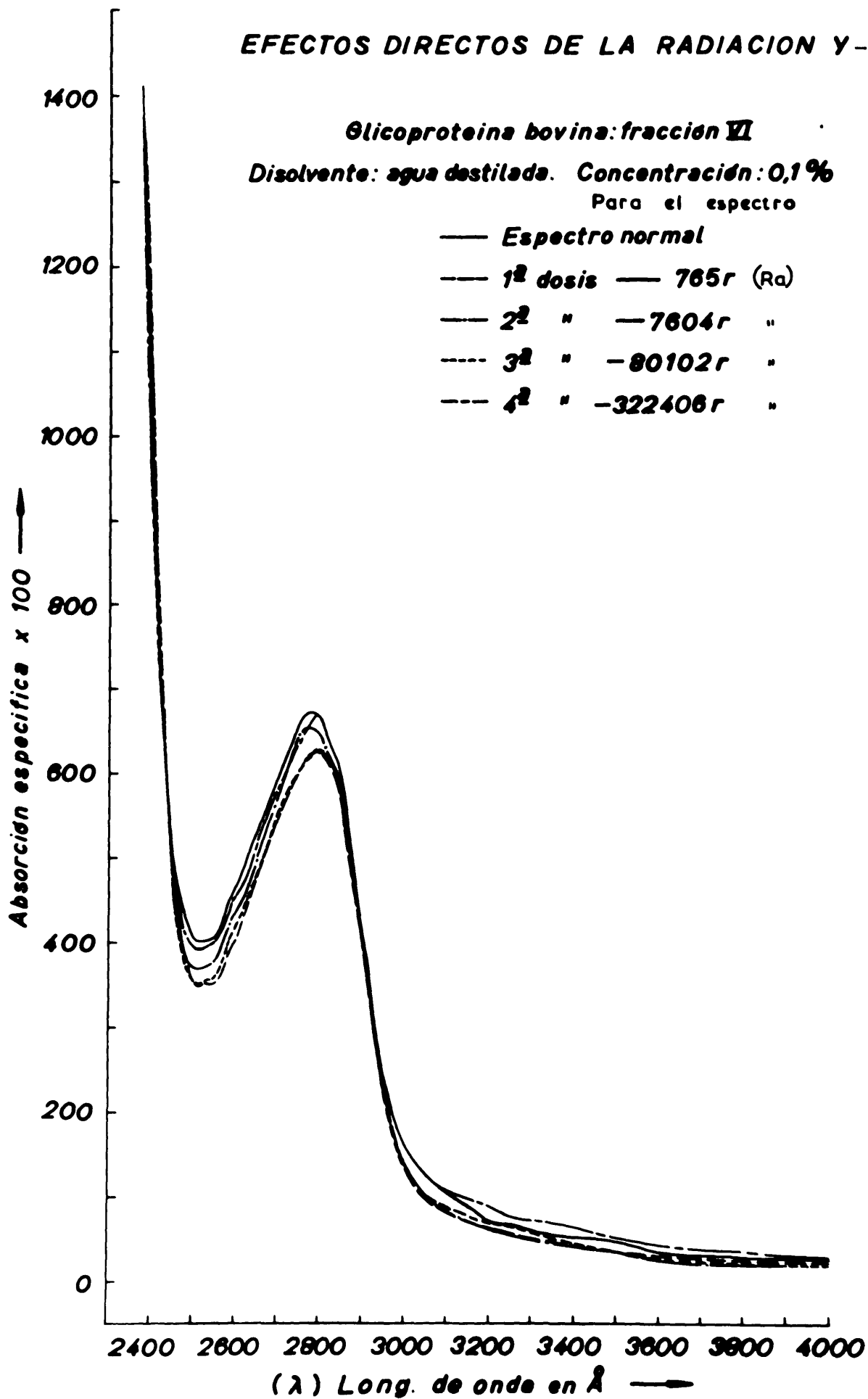
Obtuvimos también el espectro del ovomucoide y de la glicoproteína, irradiados en estado sólido, siguiendo los efectos de la acción directa de la radiación.

En las Gráficas 17 y 18 se puede observar que a las dosis aplicadas, prácticamente solo existe pequeña disminución en la absorción y los efectos de la radiación son poco marcados como era de preveer, según lo indicado cuando se irradia en acción directa.



Gráf. 16





Seguidamente comparamos a la misma dosis los efectos de la irradiación en soluciones acuosas de estas dos proteínas, Gráficas 19 y 20, Tablas XV y XVI.

De la comparación de estas dos gráficas se deduce que los efectos son mayores en la glicoproteína y que debe existir en el ovomucoide algún factor natural que lo proteja.

Hemos obtenido también y van en la misma gráfica, nº 21, los espectros de las cuatro proteínas irradiadas con 10^5 r (Cs^{137}) en una hora, donde francamente se ve que la menos sensible ha sido el ovomucoide y la más la seroalbúmina que a esta dosis se encuentra totalmente desnaturalizada.

En la siguiente gráfica, nº 22, se recogen los espectros de las mismas proteínas irradiadas a una dosis de 2×10^6 r (Cs^{137}) en 20 horas; se observa que las proteínas están todas desnaturalizadas, pero en mayor intensidad la seroalbúmina y ovoalbúmina, presentando ambas turbidez en las soluciones, sobre todo la seroalbúmina.

Se advierte que estas dos proteínas son las de menor contenido en carbohidratos.

TABLA XV

Modificaciones del espectro de absorción ultravioleta por la acción indirecta de la radiación gamma. OVOMUCOLIDE.

Dosis en roentgen	Abs. espec. (mínimo)	Log. de onda Å	Abs. espec. (máximo)	Log. de onda Å	Banda espectral
Control	0,274	2560	0,465	2780	2400-3100 Å
765	0,235	2560	0,405	2770	2400-3100 Å
7604	0,255	2550	0,415	2770	2400-3100 Å
86102	0,475	2550	0,665	2780	2400-4000 Å
322406	0,775	2560	0,850	2760	2400-4000 Å

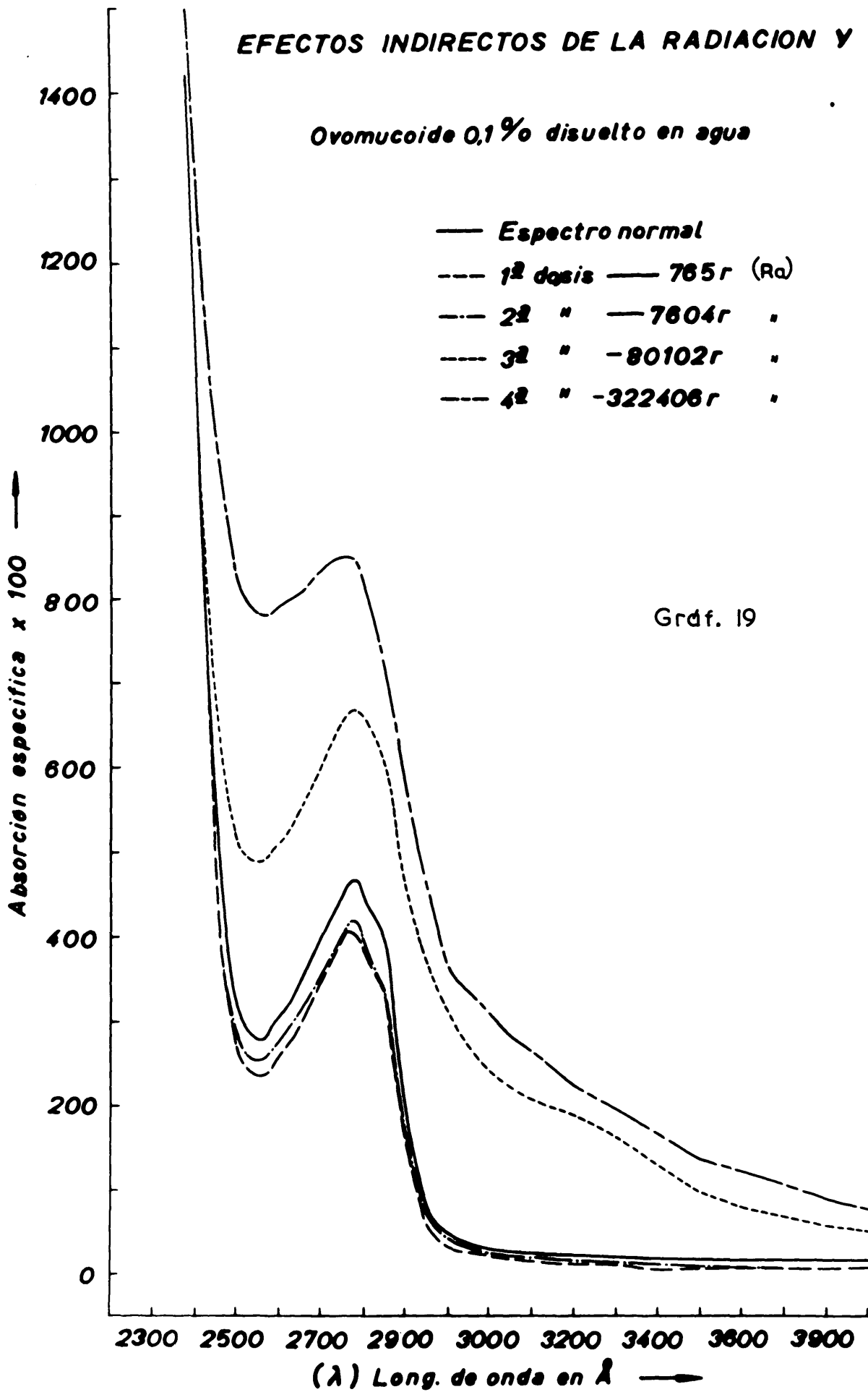
TABLA XVI

Modificaciones del espectro de absorción ultravioleta por acción indirecta de la radiación gamma. GLICOPROTEINA BOVINA. Frac. VI.

Dosis en roentgen	Abs. espec. (mínimo)	Log. de onda Å	Abs. espec. (máximo)	Log. de onda Å	Banda espectral
Control	0,380	2520	0,670	2790	2400-3500 Å
765	0,425	2530	0,710	2750	2400-3500 Å
7604	0,435	2530	0,600	2750	2400-3500 Å
80102	0,590	2540	0,755	2780	2400-3900 Å
322406	1,100	2550	1,950	2760	2400-4000 Å

EFFECTOS INDIRECTOS DE LA RADIACION Y

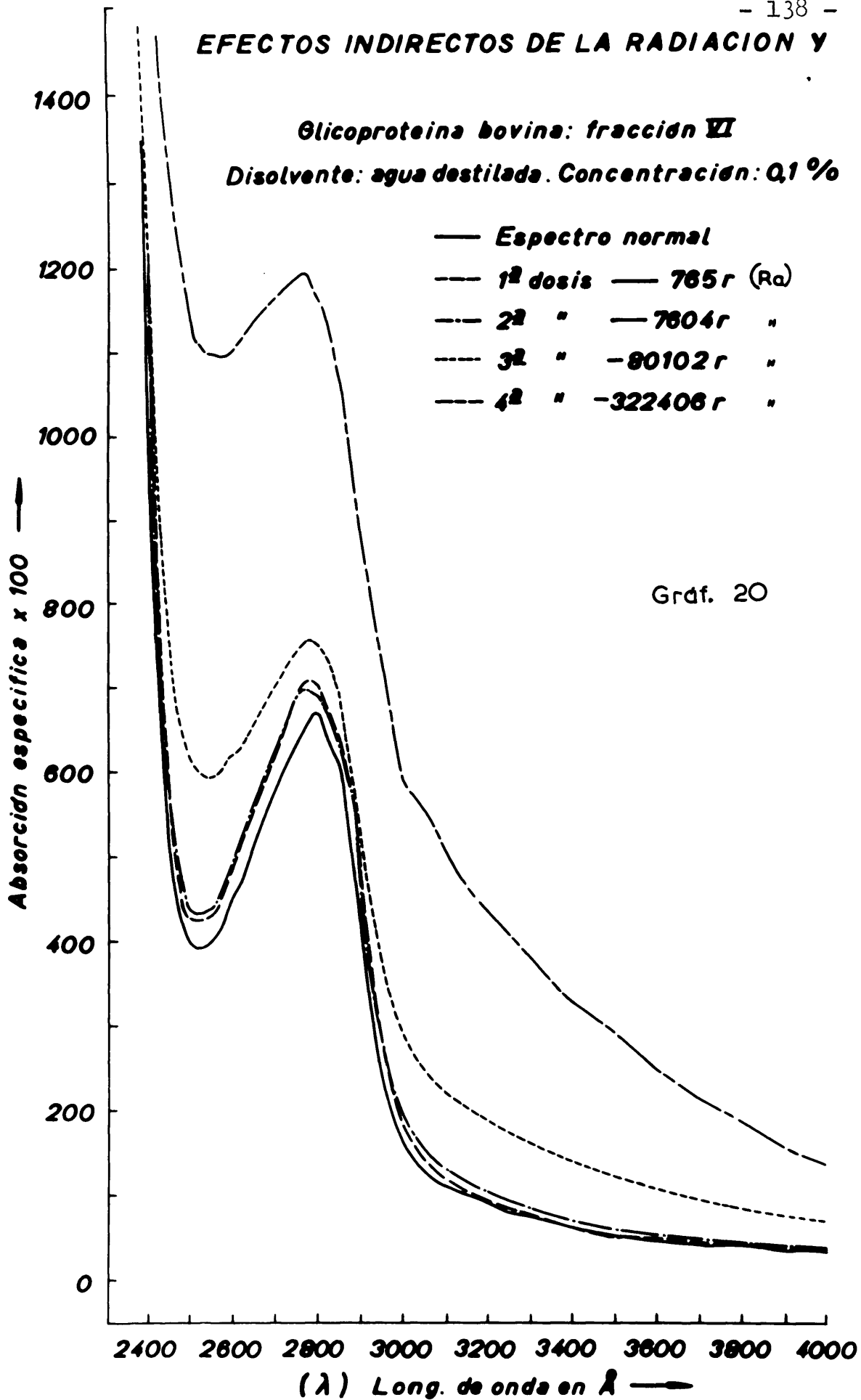
Ovomucoide 0,1% disuelto en agua

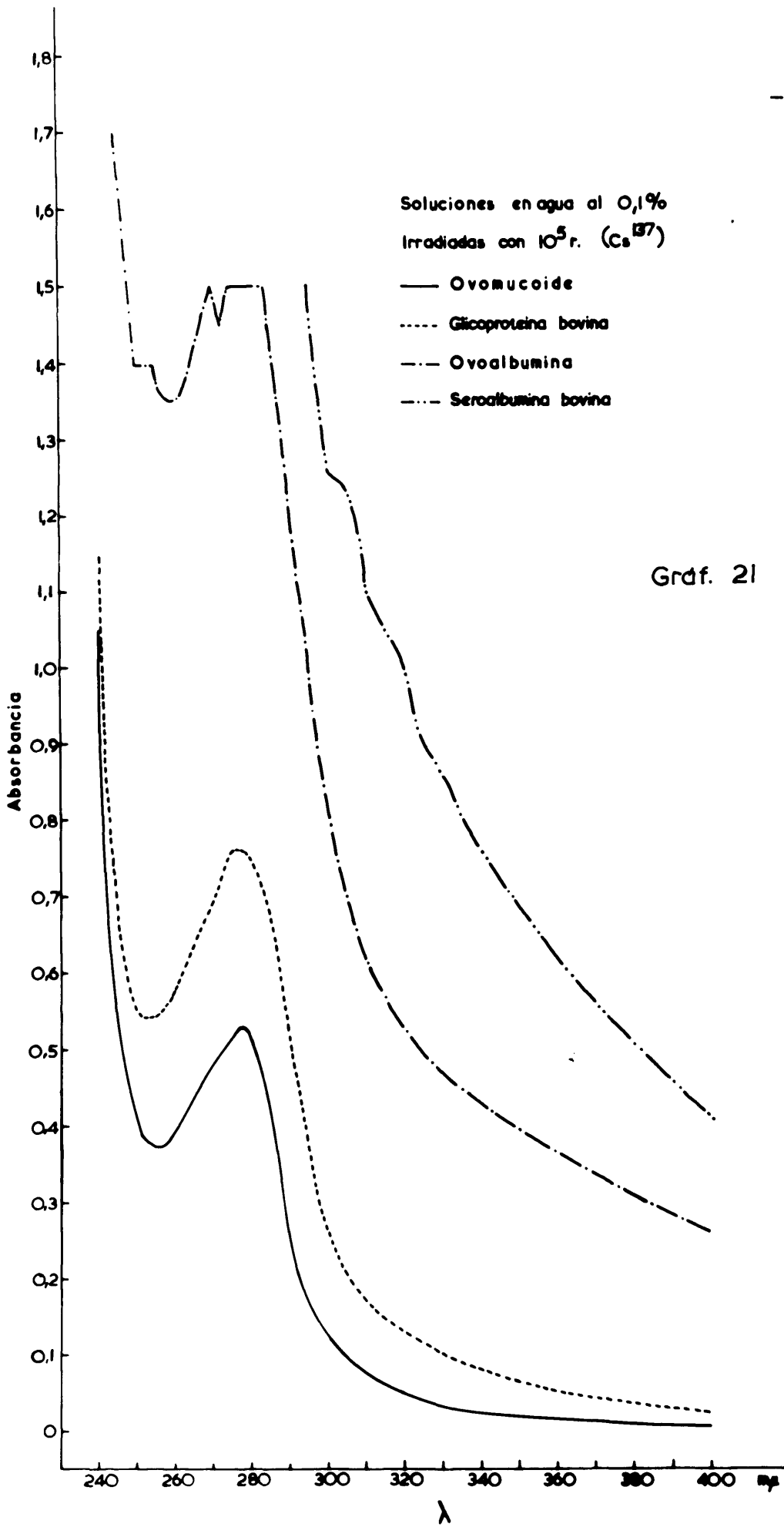


EFFECTOS INDIRECTOS DE LA RADIACION Y

Glicoproteina bovina: fracción VI

Disolvente: agua destilada. Concentracion: 0,1 %



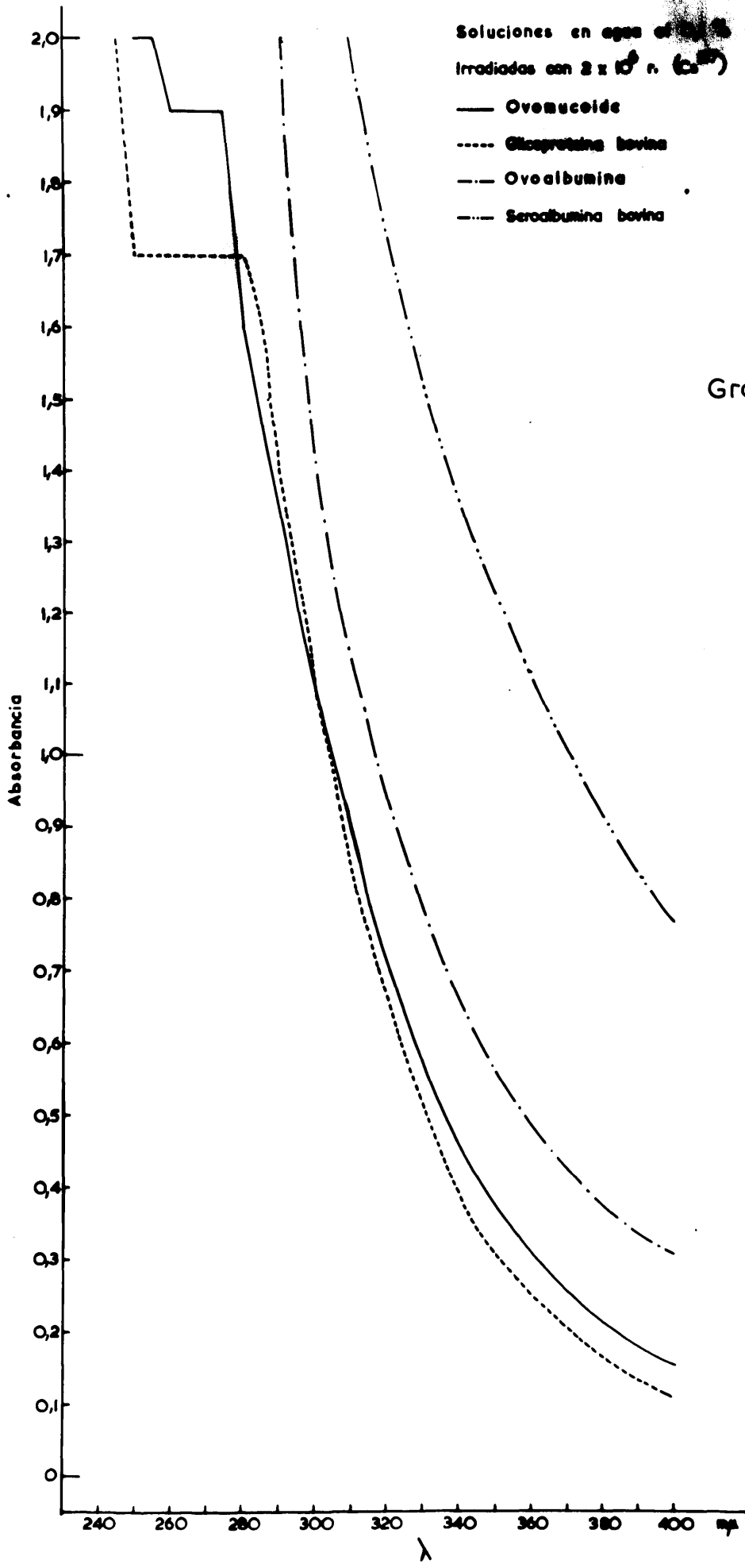


Soluciones en agua de Ca^{2+}
Irradiadas con 2×10^6 r. (Ca^{2+})

- 140 -

- Ovomucoide
- Glisoproteína bovina
- - - Ovoalbumina
- · - · - · Seroalbumina bovina

Grdf. 22



E - III. Radioprotección de estas proteínas por el hidrobromuro del bromuro de 2-amino-etil-isotiuronio (AET).

E - III. Radioprotección de estas proteínas por el hidrobromuro del bromuro de 2-amino-etil-isotiuronio.

III-e₁. Espectro de absorción en el ultravioleta del AET y del ovomucoide protegido por el AET a las distintas dosis de radiación.

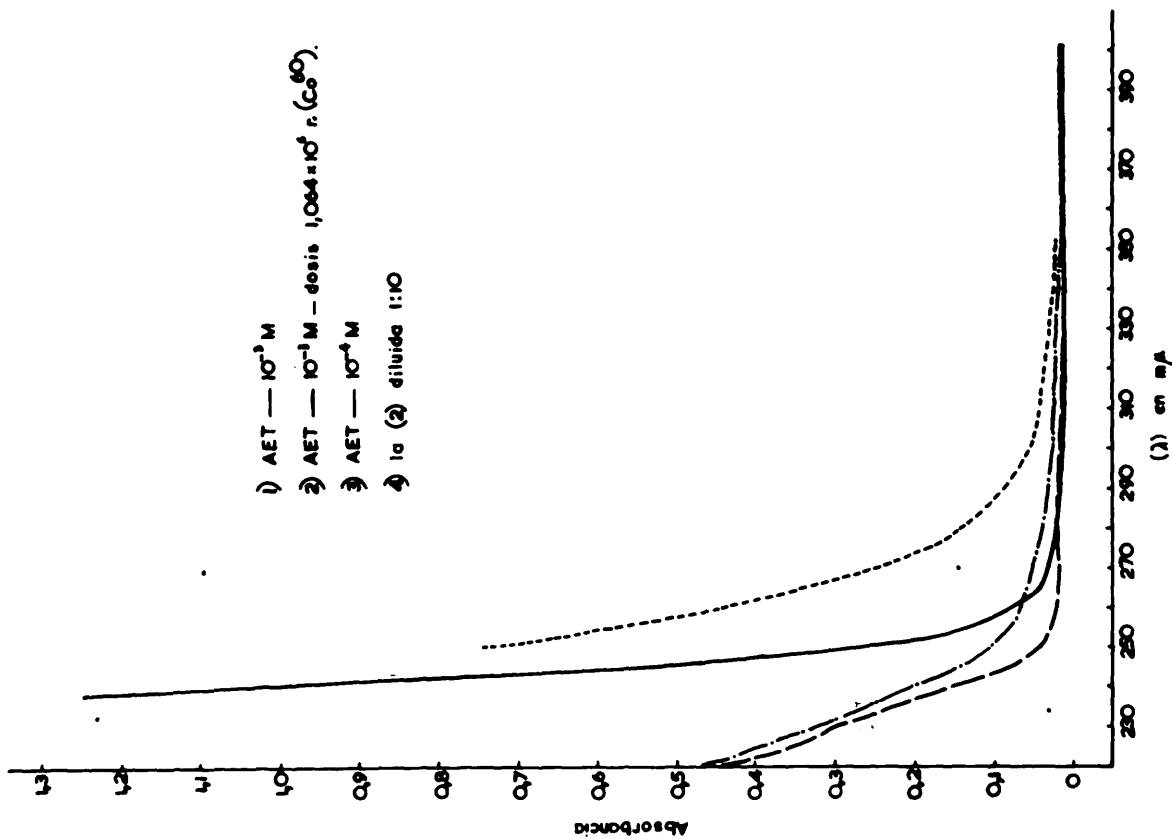
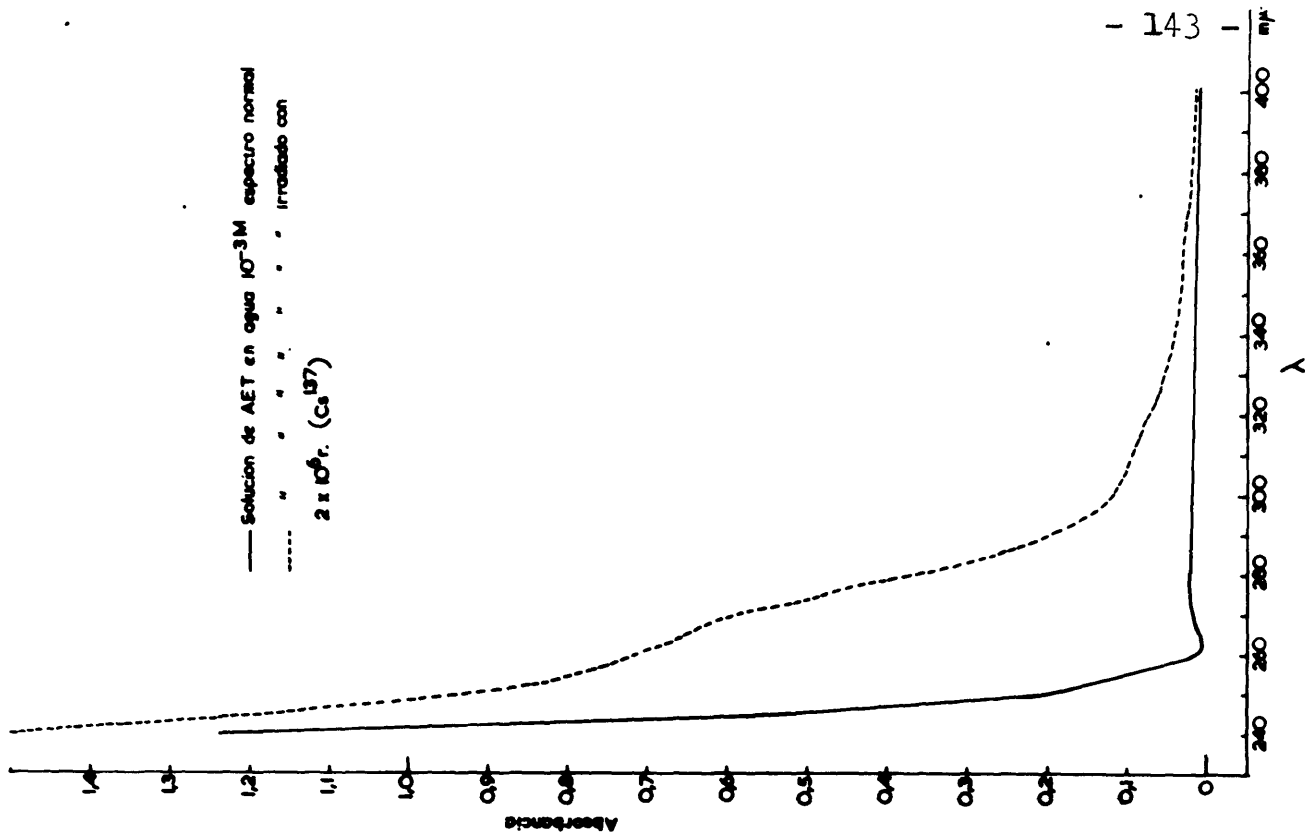
En las Gráficas 23 y 24 se recogen los espectros en el ultravioleta del AET sin irradiar e irradiado a diferentes dosis, se ve un aumento regular en la absorción.

En cuanto al ovomucoide protegido por el AET, irradiado con Co⁶⁰, la proteína queda totalmente protegida como se ve en la Gráfica 25.

En el caso de la Tabla XVII y Gráfica 25 se observan los mismos cambios que en el ovomucoide solo, pero menos pronunciados porque la proteína está protegida por el AET.

III-e₂. Análisis de la difusión Rayleigh del AET irradiado, del ovomucoide y del ovomucoide protegido por el AET.

Las Tablas XVIII, XIX y XX correspondientes a las medidas de la difusión Rayleigh del AET (Gráfica 26) indican la gran sensibilidad de este compuesto a la radiación y sus excelentes propiedades como protector.



Gráf. 23

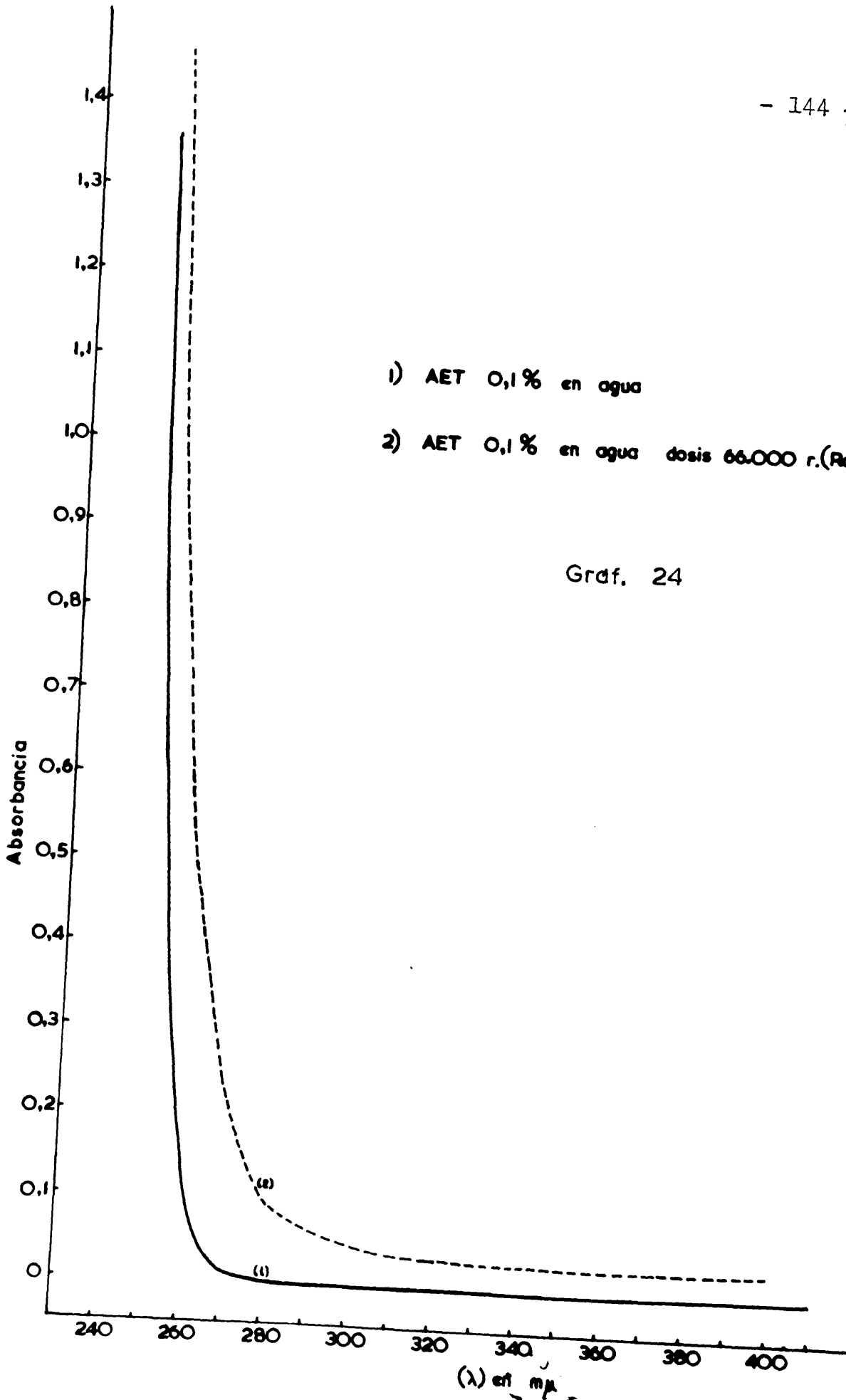
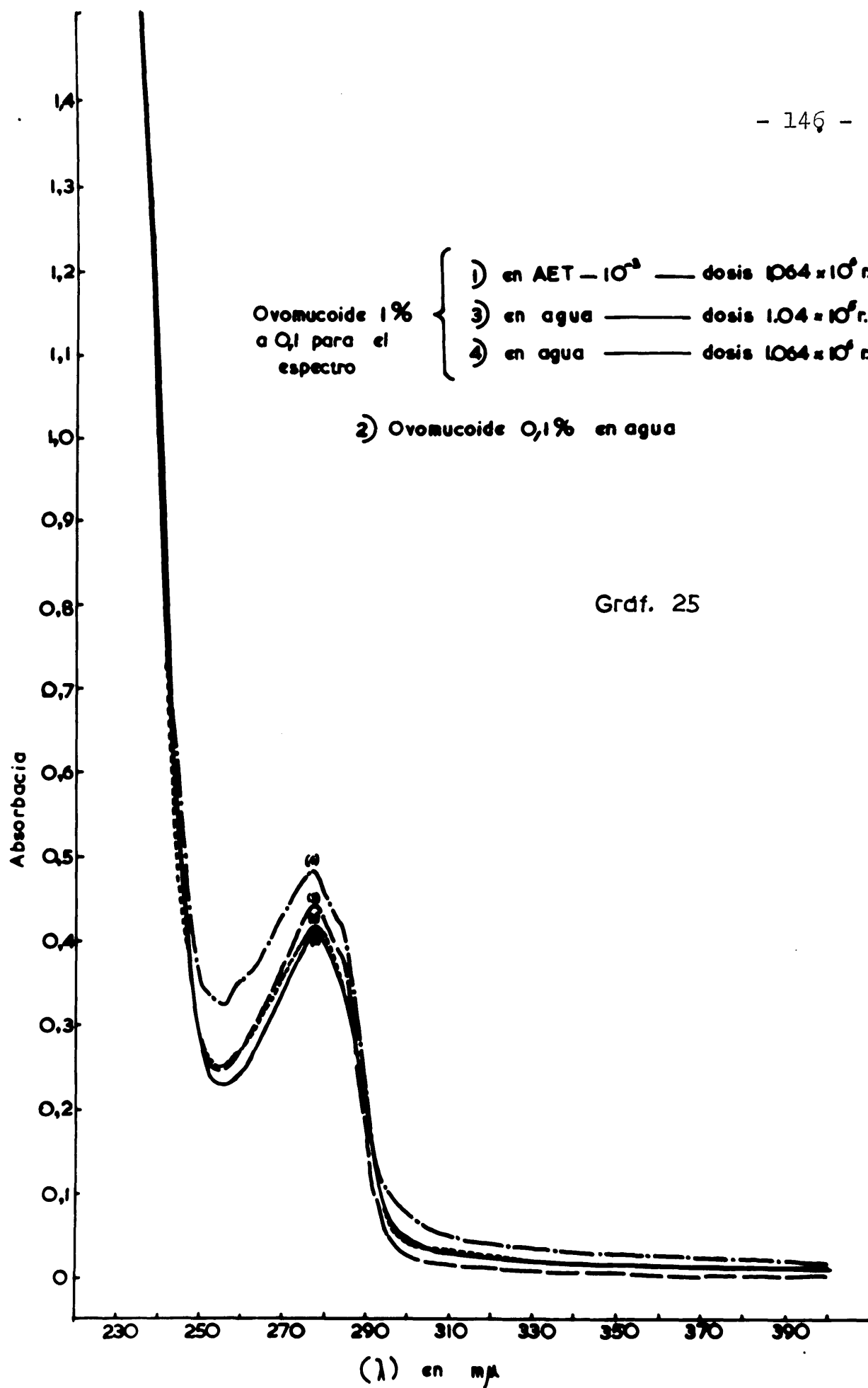


TABLA XVII

Modificaciones en el espectro de absorción ultravioleta del ovomucoide irradiado al 1% con Co⁶⁰ con y sin protector.

Ovomucoide 1%	Dosis en roentgen	Absorb. mínimo	λ en m μ	Absorb. máximo	λ en m μ	Banda espectral en m μ
Ovomucoide 1%	Control	0,250	256	0,420	278	256 - 305
"	1,04 x 10 ⁵	0,245	256	0,440	278	256 - 300
"	1,06 x 10 ⁶	0,323	256	0,482	277	256 - 310
Ovomucoide 1% en AKF 10 ⁻³ N.	1,06 x 10 ⁶	0,226	256	0,410	276	256 - 305



T A B L A XVIII

AET 10^{-3} . Dosis: $1,064 \times 10^6$ r ($0e^{60}$)

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
250	0,48	39,06	18,75
255	0,45	42,28	19,03
260	0,38	45,70	17,37
265	0,31	49,32	15,29
270	0,23	53,14	12,09
275	0,16	57,19	9,15
280	0,12	61,47	7,22
285	0,085	65,98	5,61
290	0,065	70,73	4,60
295	0,05	75,73	3,79
300	0,035	81,00	2,84
310	0,028	92,35	2,54
320	0,028	104,86	2,88
330	0,02	118,59	2,37

T A B L A XIX

AET 10^{-3} M en agua. Dosis: 2×10^6 r (Os^{137})

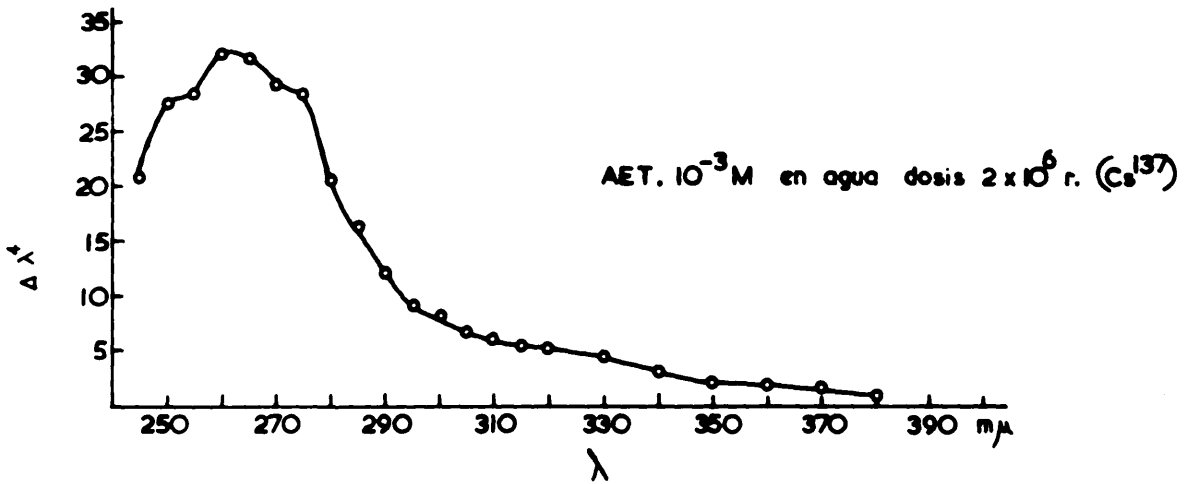
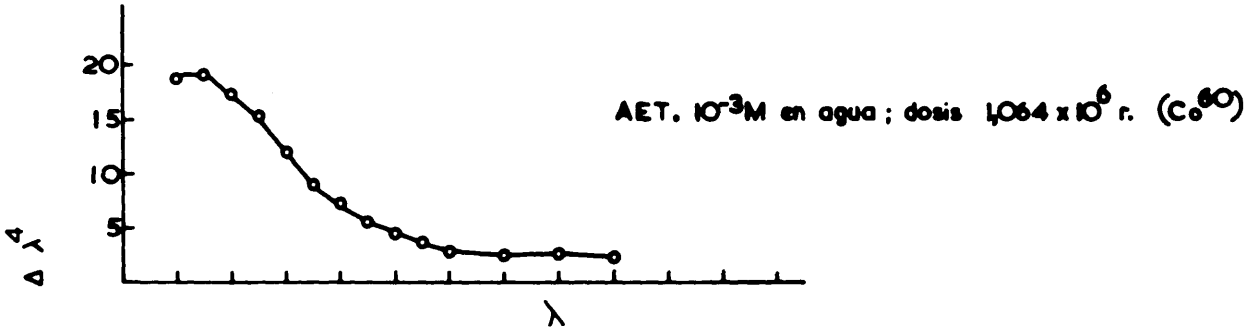
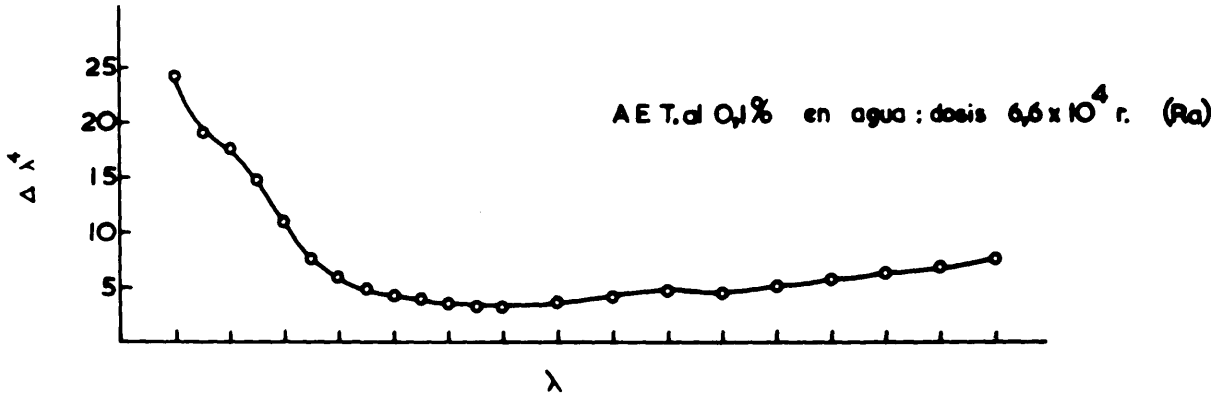
Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
240	0,26	33,18	8,63
245	0,58	36,03	20,90
250	0,750	39,06	37,54
255	0,68	42,28	28,75
260	0,705	45,70	32,22
265	0,64	49,32	31,56
270	0,55	53,14	29,23
275	0,455	57,19	26,02
280	0,335	61,47	20,59
285	0,245	65,98	16,16
290	0,17	70,73	12,02
295	0,125	75,73	9,47
300	0,10	81,00	8,10
305	0,08	83,54	6,68
310	0,07	92,35	6,46
320	0,05	104,86	5,24
330	0,04	118,59	4,74
340	0,025	133,63	3,34
350	0,015	150,06	2,25
360	0,015	167,96	2,52
370	0,010	187,42	1,87
380	0,005	208,51	1,04

T A B L A XX

AET 0,1 % en agua. Dosis 66.000 r (Ra)
Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
250	0,615	39,06	24,02
255	0,445	42,28	18,82
260	0,385	45,70	17,59
265	0,30	49,32	14,79
270	0,205	53,14	10,89
275	0,13	57,19	7,43
280	0,09	61,47	5,53
285	0,073	65,98	4,78
290	0,06	70,73	4,24
295	0,053	75,73	3,98
300	0,045	81,00	3,65
310	0,035	92,35	3,23
320	0,035	104,86	3,67
330	0,035	118,59	4,15
340	0,035	133,63	4,68
350	0,030	150,06	4,50
360	0,030	167,96	5,04
370	0,030	187,42	5,62
380	0,030	208,51	6,26
390	0,030	231,34	6,94
400	0,030	256,00	7,68



En la Tabla XXI y Gráfica 27 (nº 1), se observan grandes cambios intramoleculares, probablemente porque la proteína se desnaturaliza por estar largo tiempo sometida a pequeñas intensidades de radiación para conseguir la dosis requerida y temperatura ambiente relativamente alta.

En las Tablas XXII y XXIII y Gráfica 27 (nº 2 y 3) la proteína se ve que ha sufrido un pequeño cambio intramolecular casi anapreciable. En esta irradiación con Co^{60} los efectos obtenidos han sido menos marcados que con otras fuentes, cuando se han aplicado las mismas dosis, posiblemente porque la fuente de Co^{60} no estuviera bien calibrada.

En la Tabla XXIV y Gráfica 27 (nº 4), se observan cambios intermoleculares marcados. La sustancia fué irradiada con Cs^{137} , 10^5 r, durante una hora.

En la Tabla XXV y Gráfica 27 (nº 5), se observan cambios intramoleculares muy marcados, se ve que la proteína estaba practicamente alterada por efecto de la radiación. Había sido sometida a una dosis de 2×10^6 r de Cs^{137} durante 20 horas.

En la Tabla XXVI y Gráfica 27, nº 6, se observan cambios intermoleculares, pero menos marcados que en la Gráfica 27, nº 5, por estar la proteína protegida.

III-e₃. Radioprotección por el AET de las cuatro proteínas anteriores.

Se estudia primero por separado cada proteína, ob-

T A B L A XXI

Ovomucoide al 0,1 %, Dosis: 80.102 r (Ra)

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
245	0,15	36,03	5,40
250	0,195	39,06	7,61
255	0,21	42,28	8,87
260	0,205	45,70	9,36
265	0,20	49,32	9,86
270	0,20	53,14	10,63
275	0,205	57,19	11,72
280	0,215	61,47	13,21
285	0,22	65,98	14,51
290	0,245	70,73	17,32
295	0,28	75,73	21,21
300	0,26	81,00	21,06
305	0,24	83,54	20,77
310	0,21	92,35	19,39
315	0,195	98,46	19,20
320	0,18	104,86	18,87
330	0,165	118,59	19,57
340	0,14	133,63	18,71
350	0,11	150,06	16,51
360	0,08	167,96	13,44
370	0,065	187,42	12,18
380	0,055	208,51	11,46
390	0,045	231,34	10,41
400	0,035	256,00	8,96

T A B L A XXII

Ovomucoides irradiado al 1 %, y espectro al 0,1 %
Dosis $1,04 \times 10^5$ r (Co^{60})
Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
250	-0	0	-0
255	0,005	42,28	0,21
260	0	0	0
265	0	0	0
270	0,015	53,14	0,80
275	0,050	57,19	2,86
280	0,020	61,46	1,25
285	0,025	65,97	1,65
290	0	0	0
295	-0,015	75,73	-1,14
300	-0,015	81,00	-1,22
310	-0,011	92,35	-1,02
320	-0,010	104,85	-1,05

T A B L A I X I I I

Ovomucoide irradiado al 1 %, espectro al 0,1 %
 Dosis $1,064 \times 10^6$ r (Co^{60})
 Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^2 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^2 \Delta$
245	0,10	36,03	3,60
250	0,07	39,06	2,52
255	0,075	42,28	3,17
260	0,075	45,70	3,43
265	0,065	49,32	3,21
270	0,079	53,14	4,20
275	0,070	57,19	4,00
280	0,055	61,47	3,38
285	0,065	65,98	4,29
290	0,040	70,73	2,83
295	0,040	75,73	3,03
300	0,025	81,00	2,03
305	0,025	86,54	2,16
310	0,020	92,35	1,85
320	0,020	104,86	2,10
330	0,015	118,59	1,78
340	0,015	133,63	2,00
350	0,010	150,06	1,50
360	0,012	167,96	2,02

T A B L A XXIV

Ovomucoido al 0,1 %. Dosis: 10^5 r (Cs¹³⁷)

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^2 \times 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
240	0,340	23,18	11,28
245	0,140	36,03	5,04
250	0,170	39,06	6,64
255	0,170	42,28	7,19
260	0,165	45,70	7,54
265	0,170	49,32	8,38
270	0,155	53,14	8,24
275	0,155	57,19	8,86
280	0,145	61,47	8,91
285	0,140	65,98	9,24
290	0,140	70,73	9,90
295	0,140	75,73	10,60
300	0,115	81,00	9,32
310	0,085	92,35	7,85
320	0,060	104,86	6,29
330	0,045	118,59	5,34
340	0,035	133,63	4,68
350	0,025	150,06	3,75
360	0,025	167,96	4,20
370	0,020	187,42	3,75

T A B L A X I V

Ovomucoides al 0,1%. Dosis: 2×10^6 r (Os^{137})

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^4, 10^{-8}$	$\lambda^4 \Delta$
250	1,76	39,06	68,75
255	1,795	42,28	75,90
260	1,675	45,70	76,54
265	1,640	49,31	80,88
270	1,585	53,14	84,23
275	1,535	57,19	87,79
280	1,240	61,47	76,22
285	1,190	65,97	78,51
290	1,215	70,73	85,93
295	1,170	75,73	88,61
300	1,090	81,00	88,29
310	0,895	92,35	82,66
320	0,725	104,86	76,02
330	0,585	118,59	69,38
340	0,465	133,63	62,14
350	0,375	150,06	56,27
360	0,310	167,97	52,07
370	0,260	187,42	48,73
380	0,220	208,51	45,87
390	0,185	231,34	42,80
400	0,160	256,00	40,96

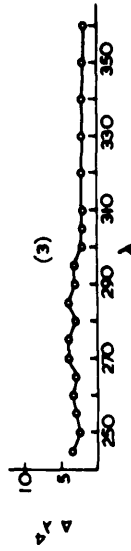
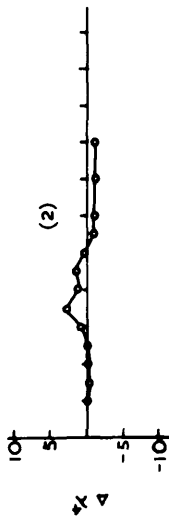
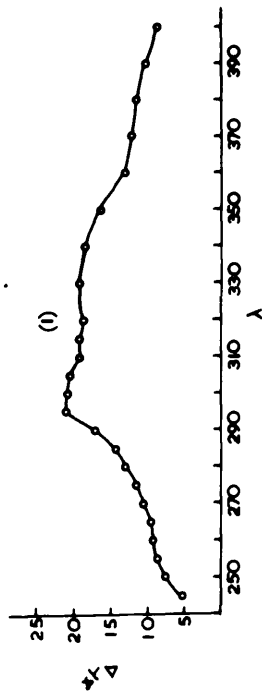
T A B L A XXVI

Ovomucoide al 0,1 % en AET $10^{-3}M$

Dosis: 2×10^6 r (^{137}Cs)

Análisis de la difusión Rayleigh

λ	Δ	$\lambda^2 \cdot 10^{-8}$	$\lambda^2 \Delta$
245	1,28	36,03	46,12
250	1,065	39,06	41,60
255	0,885	42,28	37,42
260	0,775	45,70	35,42
265	0,740	49,32	36,49
270	0,665	53,14	35,34
275	0,600	57,19	34,31
280	0,530	61,47	32,58
285	0,470	65,98	31,01
290	0,475	70,73	33,60
295	0,485	75,73	36,73
300	0,450	81,00	36,45
310	0,370	92,35	34,17
320	0,290	104,86	30,41
330	0,220	118,59	26,09
340	0,180	133,63	24,05
350	0,140	150,06	21,01
360	0,095	167,96	15,95
370	0,065	187,42	12,18
380	0,050	208,51	10,43
390	0,040	231,34	9,25
400	0,030	256,00	7,68

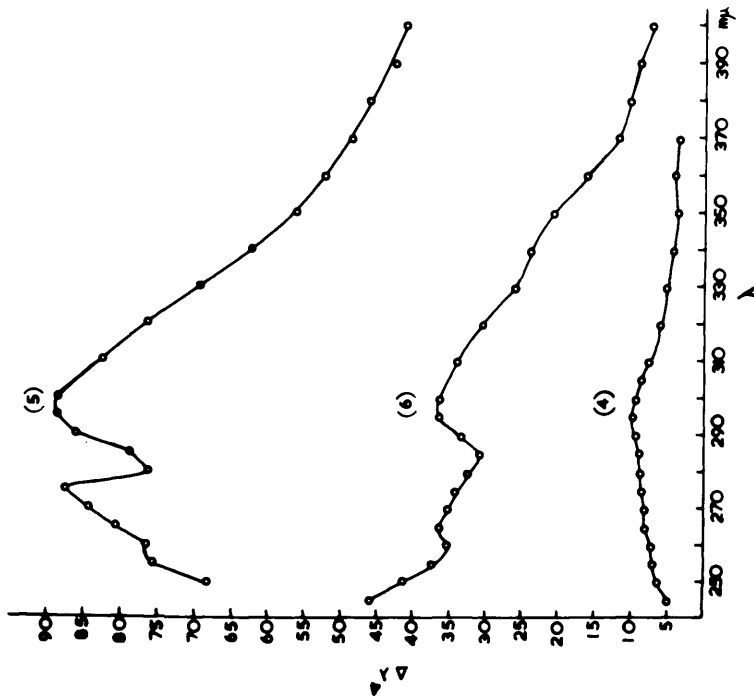


Análisis de la difusión Rayleigh

A) Diferencia de extinción entre las curvas irradiadas y las sin

irradiar

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1) Osmometría al 0,1% en agua : dosis | $\times 10^4$ r (Ra) |
| 2) " " " " " " " " " " " " " " " " | $1,04 \times 10^5$ r (C_{60}) |
| 3) " " " " " " " " " " " " " " " " | $1,064 \times 10^6$ r (C_{60}) |
| 4) " " " " " " " " " " " " " " " " | 10^5 r (C_{60}) |
| 5) " " " " " " " " " " " " " " " " | 2×10^6 r (C_{60}) |
| 6) " " " " " " " " " " " " " " " " | 2×10^6 r (C_{60}) con AET |



Gráf. 27

teniendo en la misma gráfica el espectro normal, sin y con protector, y los espectros después de irradiar a la dosis de 2×10^6 r, Cs^{137} , con y sin protector.

Ovomucoide ——— Gráfica 28

Glicoproteína ——— Gráfica 29

Ovoalbúmina ——— Gráfica 30

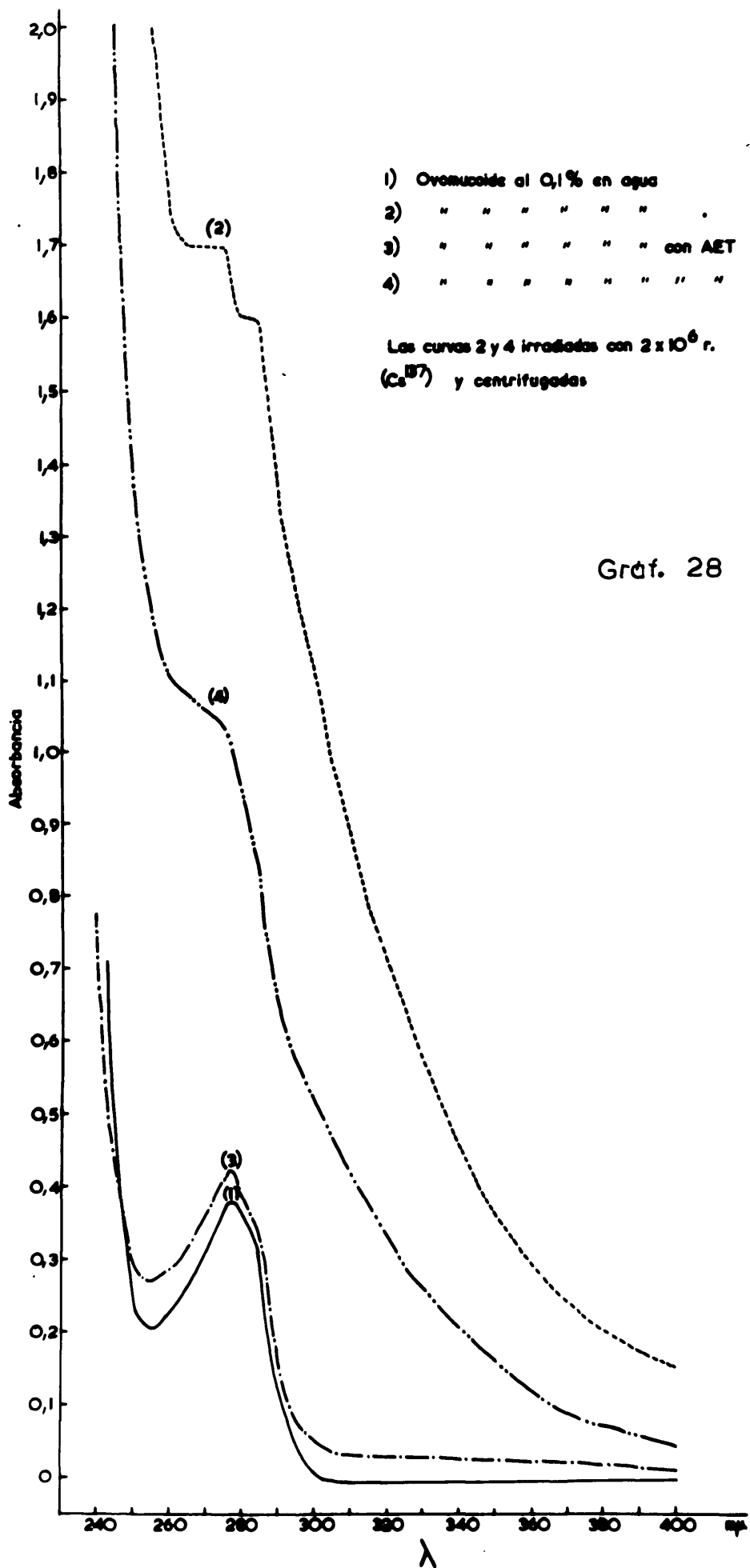
Seroalbúmina ——— Gráfica 31

En todos casos es manifiesta la acción del protector, pero se observa que esta acción sobre la glicoproteína es pequeña.

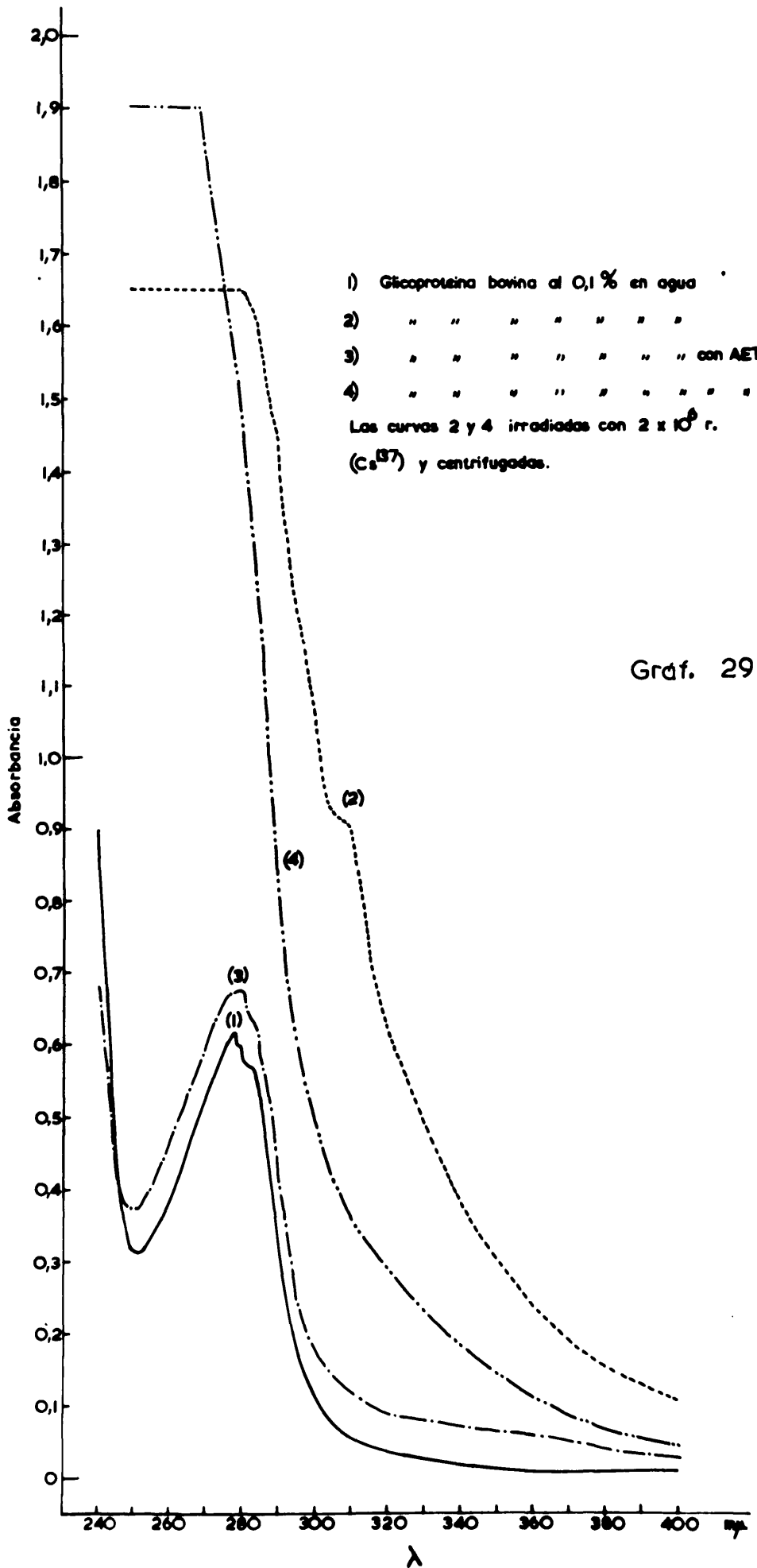
Por último, se comparan en la misma Gráfica, nº 32, los espectros de las cuatro proteínas protegidas por el AET, observando que la absorción siempre es más baja en el ovomucoide, pero que la glicoproteína es la que menos se protege, puesto que presenta la mayor absorción.

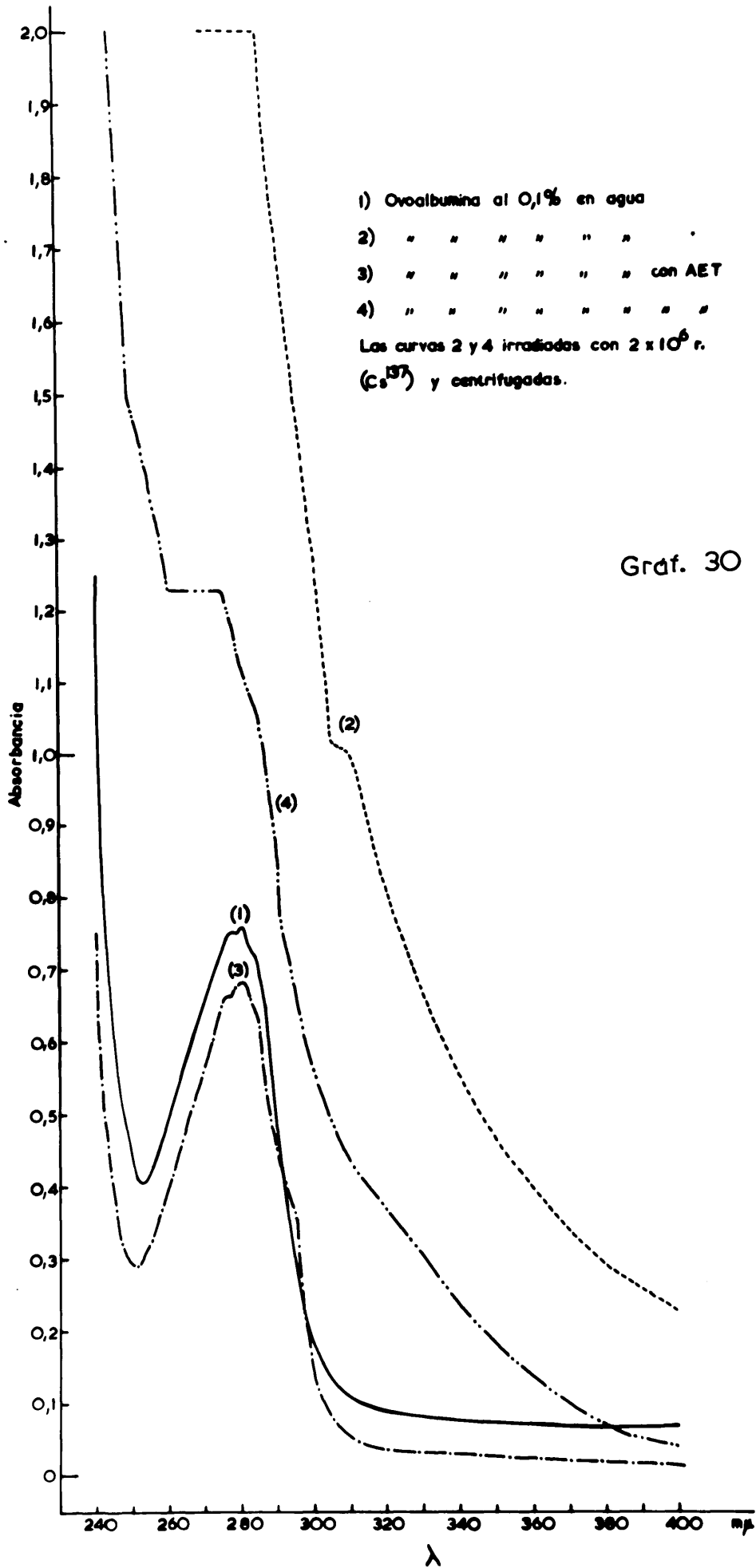
- 1) Ovomucoides al 0,1% en agua
- 2) " " " " " " "
- 3) " " " " " " " con AET
- 4) " " " " " " " " "

Las curvas 2 y 4 irradiadas con 2×10^6 r.
(Ca^{47}) y centrifugadas



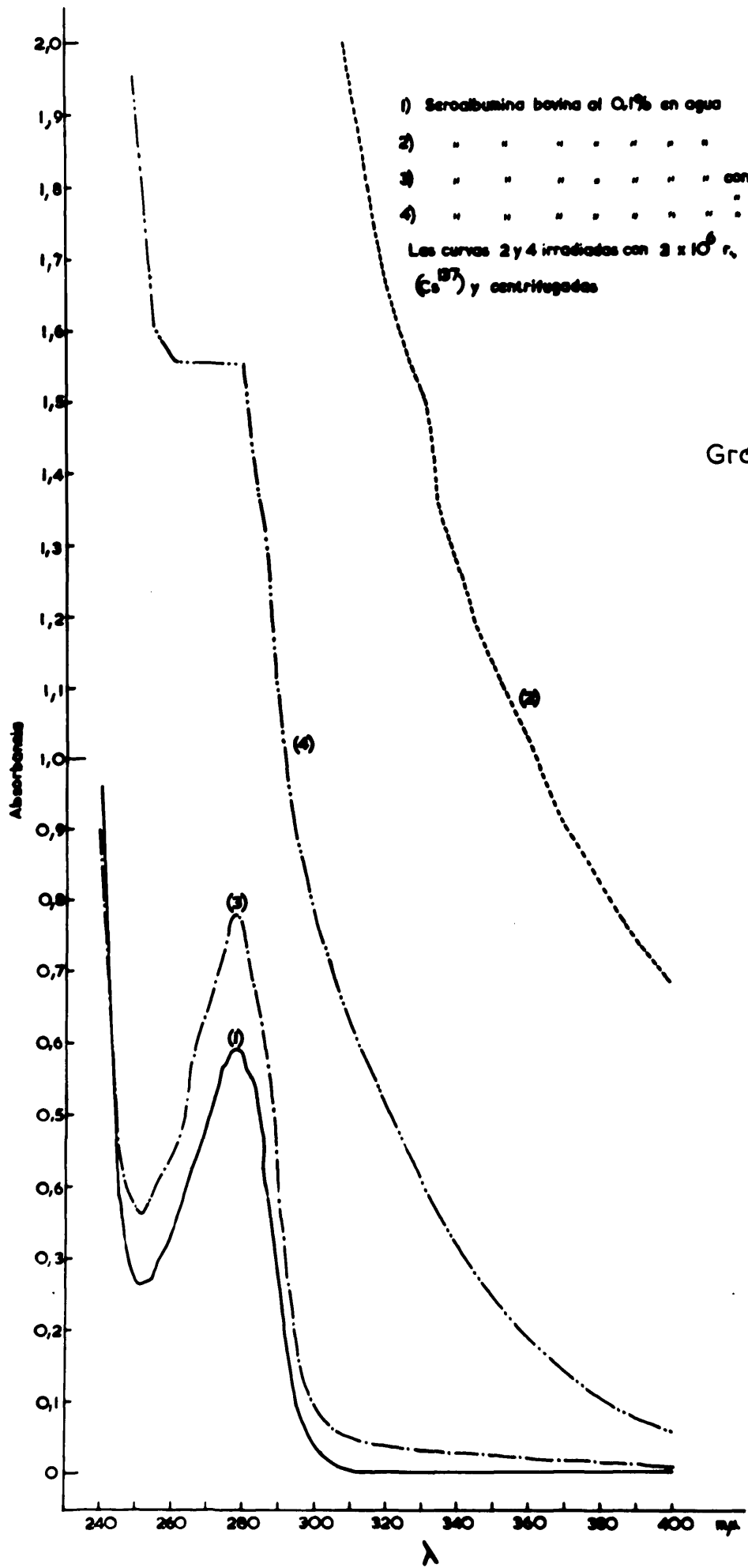
Gráf. 28



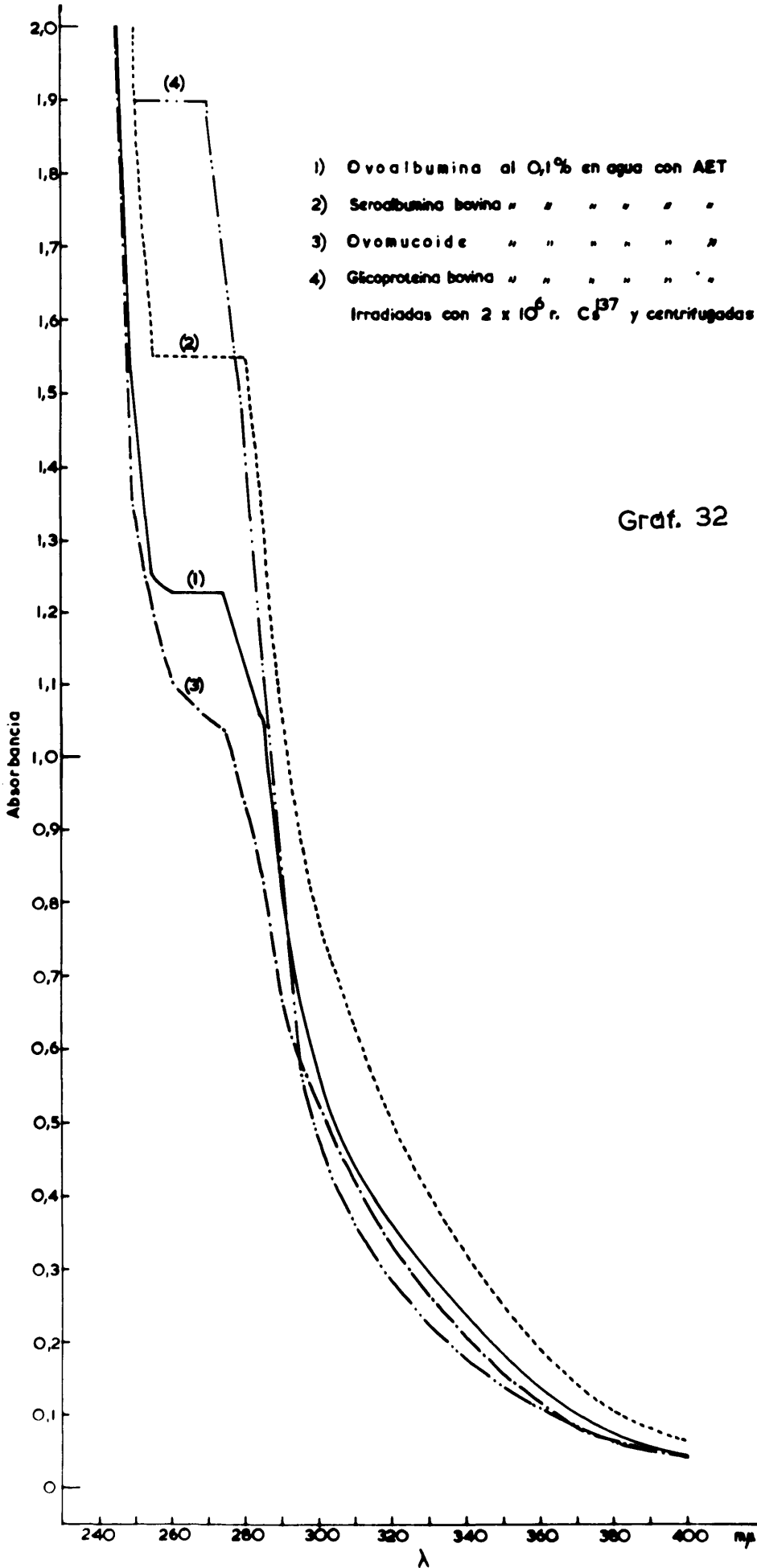


- 1) Seroalbumina bovina al 0,1% en agua
- 2) " " " " " " " " " "
- 3) " " " " " " " " " " con AET
- 4) " " " " " " " " " " " " " "

Las curvas 2 y 4 irradiadas con 2×10^6 r,
(^{60}Co) y centrifugadas



Gráf. 31



- 1) Ovalbumina al 0,1% en agua con AET
 - 2) Seroalbumina bovina " " " " " "
 - 3) Ovomucoide " " " " " "
 - 4) Glicoproteina bovina " " " " " "
- Irradiadas con 2×10^6 r. Cs^{137} y centrifugadas

Gráf. 32

IV - DISCUSION DE DATOS Y RESULTADOS

Comenzaremos por discutir los resultados del apartado III - C.

C - IV. Irradiación de aminoácidos y glucosamina.

Conforme con las indicaciones bibliográficas hemos encontrado que los aminoácidos aromáticos son los que manifiestan la absorción específica en el ultravioleta. En cuanto a la glucosamina no tenemos referencias bibliográficas sobre su espectro de absorción y sobre la influencia que en ella pudiera tener la radiación.

Nuestros resultados demuestran que el espectro de la glucosamina sufre al irradiar un cambio notable, según se muestra en la Gráfica de análisis de la difusión Rayleigh, en la que se observa que ha sufrido profundos cambios intramoleculares.

Según puede verse en la Tabla IV bis, la hidrólisis ácida del ovomucoide reproduce con bastante aproximación el espectro de la mezcla sintética de aminoácidos, y ambos espectros se diferencian bastante del ovomucoide. Existe un aumento en la absorción sin variación del máximo en el caso de la mezcla sintética, que pudiera ser debido a estructuras secundarias que exaltan el poder de absorción y a la supresión de grupos esterificados que también incrementan esta capacidad. En la Gráfica 14, se ve como al añadir tripto-

fano al ovomucoide, se exalta el máximo de absorción.

En cuanto a la relación tirosina/triptofano para el ovomucoide, que tiene un valor normal de 14,5 al irradiar con 2×10^6 r, baja al valor de 2,08, hecho debido probablemente a los cambios que experimenta la tirosina, ya que el triptofano existe en cantidad muy pequeña, si es que existe, y la tirosina tiene valor considerable.

Por el análisis de la difusión Rayleigh observamos que la fenilalanina, tirosina y glucosamina sufren cambios inter e intramoleculares muy marcados, Gráfica 15.

D - IV. Radiosensibilidad del ovomucoide comparada con la de la seroalbúmina bovina, ovoalbúmina y glicoproteína bovina (fracción VI).

Como se muestra en la Tabla XIV, las variaciones en grupos NH_2 y glucosamina al irradiar estas proteínas son inversas, es decir al aumentar los grupos NH_2 disminuye el contenido en glucosamina. Estas variaciones son más ostensibles en el ovomucoide y en la glicoproteína, lo cual parece demostrar que la abundancia en glucosamina está en relación con este hecho.

En cuanto a lo que se refiere a la radiosensibilidad de estas proteínas y en relación con sus manifestaciones en el espectro de absorción en el ultra-

violeta encontramos la mayor radiosensibilidad en la seroalbúmina, le sigue la ovoalbúmina y la glicoproteína y la menor la tiene el ovomucoide. El orden que siguen es el siguiente:

seroalbúmina > ovoalbúmina > glicoproteína > ovomucoide

Si observamos la Tabla XII nos encontramos menor cantidad de fenilalanina, tirosina y triptofano en el ovomucoide que en las demás proteínas y que como sabemos son los aminoácidos que más influyen en el espectro.

Por otra parte conocemos que en el ovomucoide existe gran cantidad de ácido aspártico y de carbohidratos que pudieran influir también en cuanto a la radiosensibilidad.

E - IV. Radioprotección de las proteínas indicadas por el hidrobromuro del bromuro de 2-amino-etilisotiuronio (AET).

Como puede verse en la Gráfica 23, 24 y 26 que representan los resultados del análisis de la difusión Rayleigh de las muestras de AET sometidas a distintas dosis de radiación, Tablas XVIII, XIX y XX, este radioprotector es muy sensible a la radiación, aún a dosis bajas ya se descompone y a dosis fuertes como se muestra en el análisis Rayleigh existen efectos intra

e intermoleculares, confirmandose por este estudio espectral, lo ya previsto por otros medios según se indica en la revisión bibliográfica, pág. 85, de la propiedad de este compuesto de ciclarse y de dar pruebas positivas de grupos -SH en sus transformaciones.

Un estudio comparativo de las curvas 5 y 6, Gráfica 27, referentes al análisis Rayleigh del ovomucoide protegido por el AET muestran disminución de los efectos intermoleculares así como también de los intramoleculares que se producen en menor escala.

Al hacer un estudio comparativo de los efectos de protección del AET en las cuatro proteínas indicadas, se ve que es mayor en la seroalbúmina y ovoalbúmina y menor en la glicoproteína y ovomucoide, con lo que parece demostrarse que protege más a aquellas que son más radiosensibles.

Después de estas consideraciones nos parece indicar que el ácido aspártico y los carbohidratos son factores de protección interna, el primero por su radioresistencia y el segundo por su radiosensibilidad, que actúan bien ellos o sus productos de descomposición como protectores del resto protéico.

V - CONCLUSIONES

V - CONCLUSIONES.

Se ha estudiado la radiosensibilidad y la radioprotección del ovomucoide, mucoproteína típica, comparandola con la de la seroalbúmina, ovoalbúmina y glicoproteína bovina, fracción VI. Se estudia también la radiosensibilidad de algunos aminoácidos y carbohidratos que entran en la composición del ovomucoide.

Se aplican diferentes dosis de radiación γ del Ra, Co^{60} y Cs^{137} .

Se analizan grupos NH_2 , glucosamina y los espectros de absorción en el ultravioleta por difusión Rayleigh, de las diversas sustancias, como índices para conocer los efectos de la radiación.

Se aplica como radioprotector el hidrobromuro del bromuro de 2-amino-etil-isotiuronio (AET) y se llega a las siguientes conclusiones:

- 1ª.- Los aminoácidos aromáticos son los más radiosensibles a los efectos del máximo de absorción en el ultravioleta.
- 2ª.- La glucosamina muy sensible a la radiación, disminuye en valor y se destruye al ser irradiada con dosis de 2×10^6 r, y su banda de absorción

en el ultravioleta se desplaza hacia mayores longitudes de onda.

- 3ª.- En el intento de agrupar en mezcla sintética los aminoácidos que forman el ovomucoide en la debida proporción, y medir su espectro se produce un aumento en la absorción, sin variar la posición del máximo.
- 4ª.- La relación tirosina/triptofano que tiene en el ovomucoide un valor de 14,5, al irradiar con 2×10^6 r. desciende a 2,08.
- 5ª.- El análisis de la difusión Rayleigh demuestra que se han producido cambios intramoleculares en los aminoácidos aromáticos y en la glucosamina durante la irradiación.
- 6ª.- La radiación origina incremento de grupos NH_2 en el ovomucoide y en la glicoproteína bovina, y en menor proporción sucede lo mismo en la ovoalbúmina y seroalbúmina.
- 7ª.- Las variaciones en exosaminas son inversas a las de los grupos NH_2 ; disminuye el valor normal en

más del 50 % en el ovomucoide, el 50 % en la glicoproteína y menos del 50 % en la ovoalbúmina y seroalbúmina cuando son irradiadas con 2×10^6 r.

- 8ª.- Los espectros de absorción en el ultravioleta de las cuatro proteínas se modifican ostensiblemente por la radiación y se caracterizan por el incremento del máximo y desplazamiento de la banda de absorción hacia mayores longitudes de onda, y estos cambios son más acentuados en la ovoalbúmina y seroalbúmina.
- 9ª.- El AET, es una sustancia muy sensible a la radiación, y sufre verdaderos cambios intramoleculares, dependientes de la dosis, como se deduce del análisis por difusión Rayleigh.
- 10ª.- El AET realiza en el ovomucoide una radioprotección efectiva contra la radiación haciendo que las modificaciones observadas en el análisis Rayleigh disminuyan notablemente cuando la proteína está protegida.
- 11ª.- Estudiando comparativamente el efecto protector

del AET en las cuatro proteínas, se ve que es más eficiente en la ovoalbúmina y seroalbúmina y menos en la glicoproteína y ovomucoide.

12^a.- Si se estudia la relación que existe entre la composición de estas proteínas, la radiosensibilidad y la radioprotección por el AET, podríamos indicar que el contenido en carbohidratos y en ácido aspártico son factores internos que explicarían la menor radiosensibilidad o mayor radioresistencia del ovomucoide.

VI - BIBLIOGRAFIA

VI.) BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, P. y FOX, M.
J. de Chim. Phys., 50, 415, (1953)

ALEXANDER, P.
Brit. J. Radiol. 26, 413, (1953)

ALEXANDER, P.; BACQ, Z. M.; COUSENS, S. P.; FOX, M.;
HERVE, A. y LAZAR, J.
Rad. Res. vol 2, nº 4, 392, (1955).

ALEXANDER, P.; FOX, M.; STACEY, K. A. y ROSEN, D.
Nature, 178, 846, (1956)

ALEXANDER, P. y LORENTZ, ELDJARN.
Pharm Rev., 10, 443, (1958)

ALEXANDER, P.; HAMILTON, L. D. G. y STACEY, K. A.
Rad. Res., 12, 510, (1960).

ALEXANDER, P. y HAMILTON, L. D. G.
Rad. Res., 13, 214, (1960)

ANDERSON, D. R. y JOSEPH, B. J.
Rad. Res., 10, 507, (1959)

ANSLOW, G. A., y LYMAN, E. R.
J. Optical Soc. Am., 31, 114, (1941).

ARNOW, S. E.
Phys. Revs., 16, 671 (1936)

AUGENSTINE, L. G.
Symp. Inform. Theory Biol., Gatlinburg, Tenn (1956),
287, (1958).

- BACQ, y ALEXANDER, P.
Fundamentals of Radiobiology., London Butterworths
Scientific Publications, 290, (1955).
- BACQ y HERVE.
J. Suisse de Med., 40, 1.018, (1952).
- BACQ, Z. M.
Bull. acad. roy. méd. Belg., 18, 426, (1953)
- BACQ, Z. M. y HERVE, A.
Strahlentherapie 95, 215, (1954).
- BARRON, E. S. G. y DICKMAN, S.
J. gen. Physiol., 32, 595, (1949).
- BARRON, E. S. G. y FLOOD, B.
J. gen. Physiol., 33, 229, (1950).
- BARRON, E. S. G.
Symposium on Radiobiology, Oberling College, 14 (1950);
Copyright, 216, (1952).
- BARRON, G.
Symposium on Radiobiology, (J. J. Makson, ed), John Wi-
ley, New York, 216, (1952).
- BARRON, E. S. G., y GASVODA, B.
U. S. Atomic Energy Commission Report ANL, 4333 (1949).
- BARRON, E. S. G. y FINKELSTEIN, P.
Arch. Biochem. and Biophys., 41, 212, (1952).
- BARRON, E. S. G.; AMBROSE, J. y JOHNSON, P.
Rad. Res., 2, 145, (1955).
- BLIX GUNNAR
Acta Chem. Scand. 2, 467, (1948).
- BLOCK, R. J.; DURRUM, E. L. y ZWEIG, G.
A manual of paper chromatography and paper electropho-
resis.- Academ. Press Inc., New york, 78, (1955).

BREGER, I.

J. Phys. Colloid. Chem., 52, 551, (1948).

BROWNELL HINE y BROWNELL GORDON L.

Radiation Dosimetry, Acad. Press. New York, 363, (1956).

BURNETT, W. T.; BURKE, A. W. y UPTON, A. C.

Am. J. Physiol., 174, 254, (1953).

CARROLL, W. R., MITCHELL, E. R. y CALLAMAN, M. J.

Arch. Biochem. and Biophys., 39, 232, (1952).

CLAESSON, I. M.

Ark. Kemi. 10, 1, (1956).

COLLISON.

Chem. Rev. 56, 538, (1956).

GRAMMER, J. L. y NEUBERGER, A.

Biochem. J., 37, 302, (1943).

DALE, W. M.

Biochem. J., 34, 1367, (1940).

DALE, W. M.

Brit. J. Radiol., 16, 171, (1943).

DRAKE, M. P., GIFFER, J. W., JOHNSON, D. A. y KOENIG, V.

J. Am. Chem. Soc., 79, 1395, (1957).

EIDUS, L. KH., KONDAKOVA, N. V. y OTAROVA, G. K.

Biofizika, 3, 215, (1958).

ELDJARN, L. y PIHL, A.

Progress in Radiobiology, ed. by S. Mitchell.- Oliver and Boyd, Edimburgh, 249, (1956).

ELDJARN, L., PHIL, A. y SHAPIRO, B.

Int. Conf. peaceful uses atom., Energy, Geneva 1955, Proc., 11, 335, United Nations, New York, (1956).

ELDJARN, L. y PIHL, A.

J. Am. Chem. Soc., 79, 4589, (1957).

- ELDJARN, L. y PIHL, A.
J. Biol. Chem., 225, 499, (1957).
- ENGELHARD, H y EIKENBERG, K. R.
Z. Naturf. 10 b, 622, (1955).
- FEVOLD HARRY L.
Adv. in Prot. Chem. VI, 195, (1950).
- FISCHER, P. y GOUTIER-PIROTTE, M.
Arch. intern. physiol., 62, 76, (1954).
- FRAENKEL-CONRAT y PORTER, R. R.
Biochem. et Biophys., Acta, 9, 557, (1952).
- FREDERICQ, E. y DEUTSCH, H. F.
J. of Biol. Chem., 181, 499, (1949).
- FRICKE, H. y BROWNSCOMBE, E. R.
J. Am. Chem. Soc., 55, 2358, (1933).
- GOODWIN, T. W. y MORTON, R. A.
Biochem. J., 40, 628, (1946).
- GORDY, W., ARD, W. B. y SHIEDS, H.
Proc. nat. Acad. Sci., Wash., 41, 983, (1955).
- GORDY, W. y SHIEDS, H.
Rad. Res., 9, 611, (1958).
- GRAHAM, Cl. E.; SMITH, E. P.; HIER, S. W. y KLEIN, D.
J. Biol. Chem., 168, 711, (1947).
- GRAY, L. H.
Progress in Radiobiology, ed. by J. S. Mitchell, Oliver
and Boyd, Edinburgh, 267, (1956).
- GRAY, L. H.
Annu. Rev. nuclear Sci., 6, 353, (1956).
- HAGEN, U. y BLUMENFELD, G.
Z. Naturf., 11 b, 607, (1956).

- HESSELVIK, Z.
Z. Physiol. Chem., 254, 144, (1938).
- HOLIDAY, E. R.
Biochem. J., 30, 1795, (1936).
- HOLLAENDER, A. y STAPLETON, G. E.
Physiol. Rev., 33, 77, (1953).
- JAYKCO, M. E. y GARRISON, W. M.
University of California Radiation Laboratory Report
UCRL, 3872, (1957).
- JOHNSON, G. R. A., SCHOLLES, G. y WEISS, J.
Science, 114, 412, (1951).
- JUTISZ, M.; KAMINSKI, M. y LEGAULT-DÉMARE, J.
Biochim. et Biophys. Acta, 23, 173, (1957).
- KENT y WHITEHOUSE.
Biochem. of the aminosugars. London, 126, (1955).
- LANGENDORFF, H. y KOCH, R.
Strahlentherapie, 95, 531, (1954).
- LATARJET, R., y LOISELEUR, J.
Compt. rend. soc. biol., 136, 60, (1952).
- LATARJET, R. y GRAY, L. H.
Acta Radiol., Sockh., 41, 61, (1954).
- LEVENE, P. A. y MORI, T.
J. Biol. Chem., 84, 49, (1929).
- LINEWEAVER, H. y MURRAY, C. W.
J. Biol. Chem., 177, 565, (1947).
- LOISELEUR, J.
Bull. soc. chim. biol., 25, 22, (1943).
- LOISELEUR, J.
J. Chim. Phys., 52, 625, (1955).

- LORENZ, W.
Fortschr. Gebiete Röntgenstrahlen (special member Wiesbaden Congress), 44, (1952).
- MEYER, K.
Adv. in Prot. Chem. II, 249, (1945).
- MIRKHAM y SMITH.
Biochem. J., 52, 552, (1952).
- MOORE, S. y STEIN, W. H.
J. Biol. Chem., 176, 367, (1948).
- PASSYNSKII, A. G.
Conf. Acad. Sci. U.S.S.R. (Session Div. Biol. Sci.): Peaceful Uses of Atomic Energy, 69, cited in Chem. Abstr., 49, 16002 i, (1955).
- PATT, H. M.
Physiol. Rev., 33, 35, (1953).
- PELAEZ, F. V.
Tesis doctoral. Madrid (1958).
- PHILLIPS, G. O. y MOODY, G. J.
Inter. J. of Apl. Rad. and Isot., VI, 78, (1959).
- PIHL, A. y ELDJARN, L.
Advances in Radiobiology, ed. by G. G. de Hevesy. Oliver and Boyd, Edinburgh, 147, (1957).
- PIHL, A. y ELDJARN, L.
Acta Chem. Scand., 11, 1.083, (1957).
- PLATZMAN, R. y FRANK, J.
Symposium on Information Theory in Biology. Pergamon Press, London. 262, (1958).
- PLATZMAND, R. y FRANK, J.
Symp. Inform. Theory Biol., Gatlinburg, Tenn., 262, (1956).
- POLLARD, E.
Adv. in Biol. and Med. Phys., 39, 53, (1953).

PRICE, W. J.

Nuclear Radiation Detection. New York. 86, 242, (1958).

PROCTOR, B. E. y BHATIA, D. S.

Biochem. J., 51, 535, (1952).

RHODES, M. B.; AZARI, P. R.; y FEENOCY, R. E.

J. of Biol. Chem., 230, 399, (1958).

ROMANOFF, A. L.

The avian egg. 6, (1949)

ROSEN, D.; ALEXANDER, P. y BROHULT, S.

Arch. Biochem. Biophys., 70, 266, (1957).

ROSEN, D.

Biochem. J., 72, 597, (1959).

ROTHERAM, M.; TODD, N. y WHITCHER, S. L.

Naturwissenschaften, 39, 450, (1952).

ROWBOTTOM, J.

J. Biol. Chem., 212, 877, (1955).

SAIDEL, L. J.; GOLDFARB, A. R. y MOSOVICH, E.

J. Biol. Chem., 193, 397, (1951).

SCHAUENSTEIN, E.

Faraday Society Discussion, nº 9, 491, (1950).

SCHOLES, G. y WEISS, J.

Nature, 167, 693 (1951).

SCHWEIGERT, B. S.

Inter. J. of Apl. Rad. and Isot., VI, 76, (1959).

SHAPIRA, R.; DOHERTY, D. G. y BURNETT, W. T.

Radiat. Res., 7, 22, (1957).

SHAPIRO, B. y ELDJARN, L.

Radiat. Res., 3, 255, (1955).

SPIEGEL-ADOLF, M.
Klin. Wochschr., 8, 1592, (1928).

SPIEGEL-ADOLF, M y KRUMPEL, O.
Biochem. Z., 208, 45, (1929).

SPIEGEL-ADOLF, M.
Arch. Pathol., 12, 533, (1931).

STACEY, K. A.
Light Scattering in Physical Chemistry.--London: Butterworth and Co. Ltd. (1956).

STEIN, W. H. y MOORE, S.
J. Biol. Chem., 178, 79, (1949).

STEIN, G. y WEISS, J.
J. Chem. Soc., 3256, (1949).

SWALLOW, A. J.
J. Chem. Soc., 1334, (1952).

WHITCHER, S. L.; ROTHERAM, M. y TODD, N.
Nucleonics, 11, 30, (1953).

WHITE, Ph. D.; HANDLER, Ph. D.; SMITH, E. L.; y DEWITT STETTEN, Jr.
Principles of Biochemistry. Ed. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York. Toronto. London., 142, (1954).

WOLFROM, M. L.; BINKLEY, W. W. y McCABE, L. J.
Rad. Res., 10, 37, (1959).

WEISS, J.
Inter. J. of Rad. and Isot., VI, 52, (1959).