AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Investigação de interações hiperfinas em DNA e anticorpos de diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por T. cruzi pela espectroscopia de correlação angular gama-gama perturbada.

Andréia dos Santos Silva

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

**Orientador:
Prof. Dr. Artur Wilson Carbonari**

**São Paulo
2012**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Investigação de interações hiperfinas em DNA e anticorpos de diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por *T. cruzi* pela espectroscopia de correlação angular gama-gama perturbada.

Andréia dos Santos Silva

**Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção de grau de Doutor em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações**

Orientador:

Artur Wilson Carbonari

São Paulo

2012

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

Investigação de interações hiperfinas em DNA e anticorpos de diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por *T. cruzi* pela espectroscopia de correlação angular gama-gama perturbada.

Andréia dos Santos Silva

**Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção de grau de Doutor em
Ciências na Área de Tecnologia Nuclear –
Aplicações**

Orientador:

Artur Wilson Carbonari

São Paulo

2012

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo milagre da vida.

Ao Dr. Artur Wilson Carbonari, meu orientador, pela oportunidade de realização desse trabalho e orientação.

Ao Dr. André Luis Lopolli, pela colaboração e confiança de ter me apresentado ao Laboratório de Interações Hiperfinas.

À Dra. Maria Helena Petrilli, por sua colaboração e discussões esclarecedoras.

Ao Dr. Rajendra Narain Saxena, pelo apoio, por suas sugestões e esclarecimentos nos momentos de dúvida.

À Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, pelos esclarecimentos e indicações nos momentos de dúvida.

À Irene, por sua paciência e dedicação em todos os momentos.

Aos colegas Dr. Luciano, Ms. Renilson, Dr. Fábio, Dr. Gabriel, Dr. Moacir, Ms. Daniel, Dr. Messias, Ms. Brianna, Juliana, Thiago e Dra. Cleidilane pelo apoio durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao colega Ms. Antonio Acleto Amaral pela colaboração, dedicação e esclarecimentos.

Ao colega Ms. Philippe Alexandre Divina Petersen pela colaboração e dedicação.

Aos demais colegas, funcionários do IPEN, pelo apoio e companheirismo.

Ao Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos e a Dra. Nanci do Nascimento, em especial, por todas as contribuições e apoio prestado ao longo de todo o desenvolvimento desse trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), pelo espaço e apoio para a realização da pesquisa.

RESUMO

Investigação de interações hiperfinas em DNA e anticorpos de diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por *T. cruzi* pela espectroscopia de correlação angular gama-gama perturbada.

No presente trabalho, a técnica de Espectroscopia de Correlação Angular Perturbada (CAP) foi usada para medir a interação de quadrupolo elétrico em amostras de DNA de diferentes linhagens de camundongos (A/J, C57BL/6, B6AF1, BXA1 e BXA2), amostras de anti-imunoglobulinas pertencentes às subclasses (IgG1, IgG2a e IgG2b) e de porções ativas de imunoglobulinas fracionadas ou inteiras, correspondentes a parte diversificada da imunoglobulina, responsável pelo padrão de resposta imunológica apresentado pelos organismos. Também foram realizadas medidas da interação de quadrupolo elétrico em amostras de bases nitrogenadas do DNA (adenina, citosina, guanina e timina). As medidas CAP foram realizadas utilizando os núcleos de prova $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; $^{111\text{m}}\text{Cd} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; $^{111}\text{Ag} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; e $^{181}\text{Hf} \rightarrow ^{181}\text{Ta}$, nas temperaturas ambiente e do nitrogênio líquido para investigar as interações dinâmicas e estáticas, respectivamente. As biomoléculas foram marcadas por meio direto, onde os átomos dos núcleos de prova devem se ligar a um determinado sítio da biomolécula. Os materiais biológicos e os núcleos de prova foram escolhidos com o objetivo de verificar, em todos os seus aspectos, a possibilidade de aplicação da espectroscopia de CAP na investigação dos parâmetros hiperfinos em um núcleo de prova de um átomo metálico ligado às biomoléculas (incluindo o uso de diferentes núcleos de prova, resultantes do decaimento do núcleo pai de quatro diferentes metais) e estudar, por meio dos parâmetros hiperfinos medidos, o comportamento dessas diferentes moléculas. Os resultados obtidos mostram as diferenças entre a interação das biomoléculas estudadas com os núcleos de prova. Estas diferenças foram observadas por meio de variações nos parâmetros hiperfinos medidos, que depende do tipo de molécula, mostrando que o núcleo de prova em alguns casos ligou-se às moléculas e em outros não houve esta ligação.

ABSTRACT

Investigation of hyperfine interactions in DNA and antibody of different lineages of mice infected by *T. cruzi* by perturbed gamma-gamma angular correlation spectroscopy

In the present work perturbed angular correlation (PAC) spectroscopy was used to measured electric quadrupole interactions in DNA biomolecules of different mice lineages (A/J, C57BL/6, B6AF1, BXA1 e BXA2), samples of different isotypes of immunoglobulin G (IgG1, IgG2a e IgG2b) and active portions of complete and fragmented immunoglobulin responsible by the immune response. Electric quadrupole interactions were also measured in DNA nitrogenous bases (adenine, cytosine, guanine, thymine). PAC measurements were performed using $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; $^{111\text{m}}\text{Cd} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; $^{111}\text{Ag} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; e $^{181}\text{Hf} \rightarrow ^{181}\text{Ta}$ as probe nuclei, and carried out at room temperature and liquid nitrogen temperature, in order to investigate dynamic and static hyperfine interactions, respectively. The biomolecule samples were directly marked with the radioactive parent nuclei, whose atom link to a certain site in the biomolecules. The biological materials as well as the probe nuclei were chosen to investigate the possibility to use PAC spectroscopy to measure hyperfine parameters at nuclei from metallic elements bound to biomolecules (including the use of different probe nuclei produced in the decay of parent nuclei of four different metals) and also to study the behavior of different biomolecules by means of the measured hyperfine parameters. Results show differences in the hyperfine interactions of probe nuclei bound to the studied biomolecules. Such differences were observed by variations in the hyperfine parameters, which depend on the type of biomolecule and the results also show that the probe nuclei atom bound to the molecule in some cases and in others do not.

SUMÁRIO

	Páginas
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1	
1. 1 CONTEXTO TEÓRICO	
1. 2 Fundamentos teóricos biológicos	3
1. 2. 1 Doença de Chagas	4
1. 2. 2 Genética dos camundongos	6
1. 2. 2. 1 O ácido desoxirribonucleico e as bases nitrogenadas	7
1. 2. 3 Aspectos imunológicos: anticorpos	9
1. 3 Fundamentos teóricos químicos	11
1. 3. 1 Eletronegatividade	11
1. 3. 2 Dureza e maciez dos ácidos e bases	12
1. 3. 3 Complexos	13
1. 3. 4 Reatividade de íons metálicos em moléculas orgânicas	14
1. 3. 5 Interação do DNA e imunoglobulinas com metais	14
1. 3. 6 Propriedades químicas dos núcleos de prova	16
1. 3. 6. 1 A química do índio (In)	16
1. 3. 6. 2 A química do cádmio (Cd^{2+})	17
1. 3. 6. 3 A química do háfnio (Hf^{4+})	17
1. 3. 6. 4 A química da prata (Ag^+)	17
CAPÍTULO 2	
2. 1 INTERAÇÕES HIPERFINAS EM BIOMOLÉCULAS	19
2. 2 Correlação angular γ - γ	20
2. 2. 1 Correlação angular γ - γ não perturbada	20
2. 2. 2 Correlação angular γ - γ perturbada	21
2. 3 Interação quadrupolo elétrica	23
2. 4 Interação dinâmica	26
2. 5 O Índio e o “after-effects”	28
CAPÍTULO 3	
3. 1 MATERIAIS	30
3. 1. 1 Descrição do DNA das diferentes linhagens de camundongos estudadas neste trabalho	30
3. 1. 2 Preparação de amostras	31
3. 1. 2. 1 Preparação de amostras de DNA	31
3. 1. 2. 2 Preparação de amostras de anticorpos completos e fracionados	32
3. 1. 2. 3 Preparação de amostras das bases nitrogenadas	32
3. 1. 2. 4 Preparação de amostras da água e solução tampão (branco)	33
3. 1. 3 Obtenção do núcleo de prova	33

3. 2 MÉTODO	36
3. 2. 1 Medidas de CAP	36
3. 2. 1. 1 Análise dos dados	38
 CAPÍTULO 4	
4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4. 2 Amostras marcadas com InCl_3	40
4. 3 Amostras marcadas com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	51
4. 4 Amostras marcadas com HfF_4	61
4. 5 Amostras marcadas com Ag^+	62
4. 6 Cálculos ab initio de interações entre Cd e bases nitrogenadas do DNA	64
 CAPÍTULO 5	
5. 1 CONCLUSÕES	66
5. 1. 1 Conclusões para as amostras marcadas com $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$	66
5. 1. 2 Conclusões para as amostras marcadas com $^{111\text{m}}\text{Cd} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$	67
5. 1. 3 Conclusões para as amostras marcadas com $^{181}\text{Hf} \rightarrow ^{181}\text{Ta}$	68
5. 1. 4 Conclusões para as amostras marcadas com $^{111}\text{Ag} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$	68
5. 1. 5 Conclusões para os cálculos ab initio de interações entre Cd e bases nitrogenadas do DNA	68
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1 - Dureza e maciez dos ácidos e bases	13
Tabela 2 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelo DNA e pelas bases nitrogenadas marcados com InCl_3 após medidas de CAP.	42
Tabela 3 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelas imunoglobulinas completas e fracionadas marcadas com InCl_3 após medidas de CAP.	47
Tabela 4 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela água marcada com InCl_3 após medidas de CAP.	50
Tabela 5 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelas bases nitrogenadas em água marcadas com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ após medidas de CAP.	52
Tabela 6 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela solução tampão marcada com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ após medidas de CAP.	57
Tabela 7 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelas imunoglobulinas completas e fracionadas marcadas com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ após medidas de CAP.	58
Tabela 8 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela água marcada com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ após medidas de CAP.	61
Tabela 9 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela base nitrogenada timina marcada com Ag^+ após medidas de CAP.	63
Tabela 10 - Parâmetros obtidos com o código CP-PAW e com a técnica CAP para as bases nitrogenadas [59].	65

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 - Estrutura geral de um aminoácido	3
Figura 2 - Estrutura geral de um nucleotídeo	4
Figura 3 - <i>Trypanosoma cruzi</i> , forma tripomastigota, que circula no sangue	5
Figura 4 - Modelo simplificado da molécula de DNA	8
Figura 5 - Bases purínicas ou púricas	8
Figura 6 - Bases pirimidínicas ou pirimídicas	9
Figura 7 – Estrutura esquemática de uma imunoglobulina G (esquerda), e estrutura globular de uma imunoglobulina G (direita)	10
Figura 8 – Fragmentos de imunoglobulinas G	11
Figura 9 - Eletronegatividade	12
Figura 10 - Possíveis sítios de ligação para metais nas bases nitrogenadas	15
Figura 11 - Esquema simplificado da estrutura de um IgG com possíveis sítios de ligações para metais	16
Figura 12 - Esquema simplificado do decaimento gama-gama	22
Figura 13 - Núcleo de prova no interior do cristal	23
Figura 14 - O tensor gradiente de campo elétrico GCE e a correspondência de seus componentes com os parâmetros usados em CAP (acima). Três ambientes diferentes para um núcleo de prova de ^{111}In em uma rede cristalina de Si e os correspondentes tensores do GCE (abaixo).	24
Figura 15 - Desdobramento de um estado nuclear causado por um gradiente de campo elétrico em função de η	26
Figura 16 - Interação dinâmica em um líquido. O GCE é determinado pela interação com os átomos vizinhos ao sítio da ponta de prova dentro da biomolécula. Além desta, há uma interação quadrupolar originada pelas moléculas da vizinhança que muda aleatoriamente devido ao movimento Browniano.	27
Figura 17 - Efeito da interação dinâmica sobre a função de perturbação $G_{22}(t)$ para o núcleo de prova ^{111m}Cd	28
Figura 18 - Esquema simplificado do decaimento do núcleo de prova $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$, $^{111m}\text{Cd} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$ e $^{111}\text{Ag} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$.	35
Figura 19 - Esquema simplificado do decaimento do núcleo de prova $^{181}\text{Hf} \rightarrow ^{181}\text{Ta}$.	36
Figura 20 - Espectrômetro de CAP com 4 detectores de BaF_2 .	36
Figura 21 – Esquema simplificado do espectrômetro com quatro detectores.	38
Figura 22 - Espectros de interação hiperfina para DNA em solução aquosa marcados com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.	43
Figura 23 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução marcadas com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.	45
Figura 24 - Espectro de interação hiperfina para bases nitrogenadas cristalizadas marcadas com ponta de prova ^{111}Cd a 295K.	46

Figura 25 - Espectros de interação hiperfina para imunoglobulinas completas em solução aquosa com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.	48
Figura 26 - Espectros de interação hiperfina para imunoglobulinas fracionadas em solução aquosa com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.	49
Figura 27 - Espectros de interação hiperfina para água com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.	50
Figura 28 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução aquosa com ponta de prova $^{111\text{m}}\text{Cd}$ a 295 e 77K.	53
Figura 29 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução tampão com ponta de prova $^{111\text{m}}\text{Cd}$ a 295 e 77K.	55
Figura 30 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas cristalizadas com ponta de prova $^{111\text{m}}\text{Cd}$ a 295K.	56
Figura 31 - Espectros de interação hiperfina para solução tampão com ponta de prova $^{111\text{m}}\text{Cd}$ a 295 e 77K.	57
Figura 32 - Espectro de interação hiperfina para imunoglobulinas completas com ponta de prova $^{111\text{m}}\text{Cd}$ a 77K.	59
Figura 33 - Espectro de interação hiperfina para imunoglobulinas fracionadas com ponta de prova $^{111\text{m}}\text{Cd}$ a 77K.	60
Figura 34 - Espectro de interação hiperfina para água com ponta de prova $^{111\text{m}}\text{Cd}$ a 295 e 77K.	61
Figura 35 - Espectros de interação hiperfina para imunoglobulinas completas com ponta de prova ^{181}Ta a 295 e 77K.	62
Figura 36 - Espectro de interação hiperfina para timina com ponta de prova ^{111}Ag a 77K.	63

INTRODUÇÃO

As técnicas que descrevem o comportamento de moléculas em sistemas biológicos observam um ambiente macroscópico [1, 2]. Até então, não existe um modelo bem definido do comportamento destas moléculas em nível microscópico ou nanoscópico. Há a necessidade de se compreender melhor, com mais detalhes, as estruturas das moléculas que geralmente são repetitivas e oferecem possibilidades diversas de ligações, sendo que estas podem ocorrer dentro ou fora do ambiente biológico.

Julga-se relevante estudar o comportamento das moléculas de DNA e de anticorpos numa tentativa de encontrar argumentos que fortaleçam o estudo das diferentes respostas imunológicas, desencadeadas pela presença ou ausência de anticorpos, quando diferentes linhagens de camundongos são infectadas com a cepa Y de *T. cruzi*.

Para estudar o comportamento dessas moléculas em nível microscópico ou nanoscópico empregou-se a espectroscopia de Correlação Angular Perturbada (CAP), pois esta, caracteriza interações hiperfinas do campo elétrico produzidos pelas biomoléculas com o momento de quadrupolo elétrico do núcleo de prova [3], fornecendo conhecimentos a respeito do comportamento destas biomoléculas podendo indicar dessa forma, uma melhor compreensão de fenômenos biológicos intrínsecos a elas [4].

A espectroscopia de CAP permite a obtenção dos parâmetros hiperfinos tanto estáticos quanto dinâmicos que correspondem a vários fenômenos que podem ocorrer em diversos materiais ou em uma única molécula.

Os objetivos deste trabalho são:

1. Verificar, em todos os seus aspectos, a possibilidade de aplicação da espectroscopia de CAP na investigação dos parâmetros hiperfinos em um núcleo de prova de metal ligado às moléculas de DNA e anticorpos, incluindo o uso de diferentes núcleos de prova, resultantes do decaimento de quatro diferentes metais (In, Cd, Ag e Hf);
2. Estudar, por meio dos parâmetros hiperfinos medidos, o comportamento das diferentes moléculas investigadas neste trabalho.

O presente estudo traz no primeiro capítulo alguns fundamentos teóricos biológicos sobre a doença de Chagas, genética de camundongos, ácidos nucleicos, bases nitrogenadas e anticorpos que serviram de suporte para a interpretação dos dados obtidos com a técnica utilizada para o desenvolvimento deste trabalho. Ainda neste capítulo apresenta-se com o mesmo intuito anterior os fundamentos químicos sobre eletronegatividade, dureza e maciez de ácidos e bases, complexos, reatividade de íons metálicos em moléculas orgânicas, interação do DNA e imunoglobulinas com metais e, propriedades químicas dos núcleos de prova.

O segundo capítulo apresenta os fundamentos físicos que envolvem as interações hiperfinas de natureza elétricas e dinâmicas, e também os conceitos da técnica de Correlação Angular γ - γ que foram empregados para a realização das medidas com as biomoléculas e o tratamento dos dados obtidos.

No terceiro capítulo são descritos os materiais utilizados no desenvolvimento do trabalho, as preparações de amostras, a obtenção dos núcleos de prova, o aparato experimental para as medidas de CAP e análise dos dados obtidos.

Os dois últimos capítulos tratam dos resultados obtidos empregando-se a técnica de CAP em biomoléculas com diferentes tipos de núcleos de prova, as possíveis discussões e interpretações levando em consideração os conceitos biológicos, químicos e físicos e, por fim, as conclusões individuais para cada tipo de molécula e de núcleo utilizado.

CAPÍTULO 1

1. 1 CONTEXTO TEÓRICO

1. 2 Fundamentos teóricos biológicos

Nosso organismo possui um sistema de defesa que quando estimulado por antígenos responde desencadeando uma resposta imunológica específica que pode ser celular, humoral ou ambas, dependendo do antígeno [5].

Os anticorpos, uns dos responsáveis pela resposta imunológica dos organismos, são proteínas e como tal, são formados por unidades menores, denominadas aminoácidos. Cada aminoácido é formado por cadeias de carbono em que se ligam obrigatoriamente aos átomos de hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Todos os aminoácidos possuem um grupo amina (NH_2), de caráter básico; um grupo carboxila (COOH), de caráter ácido; e uma porção variável. Nessa porção, chamada de radical (R), pode existir 20 diferentes tipos de cadeias, uma vez que os organismos são constituídos por 20 tipos diferentes de aminoácidos. Veja na figura 1 a estrutura geral de um aminoácido [6].

Figura 1 - Estrutura geral de um aminoácido [7].

Segundo Silva (2006), diferentes linhagens de camundongos (A/J, C57BL/6, B6AF1, BXA1 e BXA2) quando infectadas com a cepa Y de *T. cruzi* apresentam um padrão de resposta imunológica que varia de acordo com o conjunto de genes que compõe o DNA (ácido desoxirribonucléico) de cada uma delas [8]. O DNA é um tipo de

ácido nucléico dos seres vivos, que é formado por unidades menores denominadas nucleotídeos [6]. Veja na figura 2 a estrutura geral de um nucleotídeo.

Figura 2 - Estrutura geral de um nucleotídeo [6].

Todas as características dos organismos dependem do material genético, inclusive o padrão de resposta imunológica desencadeado, quando em contato com um antígeno. Todas as respostas estão nos ácidos nucléicos, substâncias que regulam as funções vitais dos organismos. As proteínas são compostos orgânicos que formam a estrutura das células e dos tecidos, além de outras funções como a imunológica, por exemplo. Para que uma proteína seja produzida deve ocorrer a tradução de uma determinada porção do DNA. Dessa forma, o código contido nos ácidos nucléicos se materializa na forma de proteína e esta realiza diversas funções nos organismos [6].

1. 2. 1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana foi descoberta pelo médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas – Carlos Chagas – em 1909. Este brasileiro descobriu a doença e descreveu o agente causador, o transmissor, o modo de transmissão da doença e conseguiu comprovar a existência de vertebrados que são reservatórios silvestres e domésticos do parasita, esclarecendo assim os aspectos básicos da epidemiologia da doença [9, 10].

Carlos Chagas, com a colaboração de Gaspar Viana, Eurico Vilela e Magarinos Torres, desvendou a complexa patologia da nova entidade mórbida, sua evolução,

anatomia patológica e métodos de diagnóstico; anteviu sua extensão epidemiológica e importância social, e indicou os caminhos para sua profilaxia [11].

A doença de Chagas é uma parasitose tecidual e hemática, de caráter endêmico em extensas regiões do continente americano. Tem evolução geralmente crônica e é causada por um protozoário flagelado, *Trypanosoma cruzi*, transmitido ao homem e a vários mamíferos sensíveis por hemípteros hematófagos da subfamília *Triatominae* [12]. O *Trypanosoma cruzi* pode ser visto em sua forma circulante na figura 3.

Figura 3 - *Trypanosoma cruzi*, forma tripomastigota, que circula no sangue [13].

Por tratar-se de uma infecção de história natural muito antiga, as relações parasita-hospedeiro apresentam-se extremamente complexas, envolvendo adaptações profundas de ambos os lados, interferindo no desenvolvimento da infecção. Embora as doenças causadas por parasitas, muitas vezes não conduzam à morte imediata, podem comprometer de maneira significativa a saúde de indivíduos infectados, interferindo em sua qualidade de vida, na capacidade de trabalho e até mesmo em seu desenvolvimento pessoal.

Os transmissores naturais do *T. cruzi* ao homem são os triatomíneos e do ponto de vista epidemiológico destacam-se como os mais importantes as seguintes espécies: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* [11].

O *T. cruzi* pode infectar cerca de 90 espécies de organismos invertebrados e 100 espécies de mamíferos, distribuídos em várias ordens e presentes em muitos países [14]. Esta ampla variedade de animais constitui importante reservatório natural, propiciando o progresso da doença nas Américas [15].

Para a doença de Chagas, o significativo aumento na compreensão científica da doença observado nas últimas décadas contribuiu para o desenvolvimento de novos

fármacos; de novas tecnologias para a pesquisa do parasita em pessoas suspeitas; na sistemática de triagem em bancos de sangue e em programas de saúde pública voltados para o atendimento dos doentes, com conseqüências no avanço da doença [16].

Mesmo com tantas informações acerca da doença de Chagas, a ocorrência de casos novos indica que estas medidas ainda carecem de investigações científicas para maior eficiência em seus empregos.

Existem muitas informações originadas a partir da investigação clínica em humanos, porém, a maior parte dos conhecimentos acerca da doença de Chagas deriva dos ensaios realizados com modelos animais, sendo freqüente o uso de camundongos. Os resultados encontrados na literatura com estes animais indicam que, também entre os murinos, a doença se manifesta de forma diferente, em função das constituições genéticas do parasita, do hospedeiro e das relações entre ambos [17].

Por esta razão, estudos que busquem esclarecer a importância da constituição genética do parasita e do hospedeiro são plenamente justificados e para tanto, a investigação científica tem sido realizada utilizando modelos animais [17].

1. 2. 2 Genética dos camundongos

Linhagens de camundongo, quando padronizadas, atuam como ferramentas, capazes de simular as complexas interações entre órgãos e sistemas, possibilitando a compreensão *in vivo* dos eventos relacionadas ao desenvolvimento da doença.

Passos e colaboradores evidenciaram a importância da constituição genética do hospedeiro na sobrevivência e apontaram para a necessidade de desenvolvimento de experimentos especificamente desenhados, com o propósito de esclarecer a influência de genes envolvidos no fenômeno da resistência [17].

Junto ao progresso da genética humana, criou-se a genética de camundongos ou o estudo de modelos animais de doenças humanas. Tais modelos ajudam na compreensão da patogenicidade de várias doenças e, em muitos casos, são usados para testar a eficiência e a ausência de efeitos colaterais de uma terapia gênica que busca a compreensão ou a substituição da função do gene defeituoso no homem [18].

Os roedores de laboratório suportam relativamente bem um regime de cruzamentos totalmente consangüíneo. Nos ratos e camundongos, podemos manipular

acasalamentos entre irmãos durante várias gerações, obtendo assim, populações de animais muito homogêneas do ponto de vista genético. Essas populações são denominadas linhagens consangüíneas e elas são muito estáveis e geneticamente padronizadas: elas têm formas alélicas homozigóticas para quase todos os *loci* do genoma, sendo que o conjunto de alelos que compõe o genoma é distribuído de forma aleatória [18].

Dessa forma fica claro que toda comparação feita entre camundongos provenientes de linhagens diferentes revelará diferenças genéticas. Para termos acesso a tais diferenças devemos cruzar as diferentes linhagens e analisar a transmissão genética de um ou mais caracteres genéticos de uma geração a outra [18].

Algumas dessas linhagens consangüíneas desenvolvem doenças e são consideradas modelos animais para a medicina. Por outro lado, as linhagens consangüíneas podem apresentar diferenças quanto às reações a agentes infecciosos; enquanto algumas linhagens são dizimadas pela infecção de um agente patogênico, outras são resistentes. Nesse caso, a noção de modelo animal é um pouco mais complicada, pois os mecanismos envolvidos no determinismo genético das diferenças de sensibilidade às infecções não são integralmente transponíveis de uma espécie para outra. Esta é uma área de estudo que só tende a se desenvolver e as estratégias serão cada vez mais generalizadas, mas sempre buscarão o mesmo resultado, que deverá ser o desenvolvimento de vacinas ou de tratamentos para as doenças infecto-contagiosas [18].

1. 2. 2. 1 O ácido desoxirribonucleico e as bases nitrogenadas

O DNA é um conjunto de nucleotídeos constituídos por um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e as bases nitrogenadas, que podem ser: adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T). A molécula de DNA é representada por dois filamentos formados por muitos nucleotídeos e torcidos em hélice, ligados um ao outro pelas bases nitrogenadas. A timina liga-se sempre a adenina, e a citosina está sempre ligada à guanina [6]. O modelo simplificado da molécula de DNA pode ser visto na figura 4.

Figura 4 - Modelo simplificado da molécula de DNA [6].

Para tentar entender o comportamento do DNA frente aos íons metal, as bases nitrogenadas foram analisadas. A adenina e a guanina possuem um duplo anel de átomos de carbono e derivam de uma substância chamada purina, sendo por isso, denominadas purínicas ou púricas. Veja na figura 5 a representação da estrutura das bases purínicas ou púricas.

Figura 5 - Bases purínicas ou púricas [6].

Já a citosina e a timina derivam de outro composto com apenas um anel de carbono, chamado pirimidina, e são denominadas bases pirimidínicas ou pirimídicas [6]. Veja na figura 6 a representação da estrutura das bases pirimidínicas ou pirimídicas.

Figura 6 - Bases pirimidínicas ou pirimídicas [6].

1. 2. 3 Aspectos imunológicos: anticorpos

Para o presente trabalho foram analisados os anticorpos G (anti-IgG1, IgG2a e IgG2b), buscando diferenciar os tipos de moléculas estudadas oriundas das diferentes respostas imunológicas que são pré-determinadas pelo DNA de cada linhagem de camundongos anteriormente citada [8].

Esses anticorpos são bastante semelhantes entre si, mas o padrão de resposta imunológico por elas desencadeado é muito diferente, podendo não promover nenhum efeito ou até promover a cura da infecção [8].

Os anticorpos ou imunoglobulinas são moléculas pertencentes a uma família de glicoproteínas estruturalmente relacionadas, responsáveis pelo reconhecimento de determinantes antigênicos. Os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B ligados a membranas ou secretados ligando-se aos antígenos, desencadeando diversas funções efectoras do sistema imune. Dentre as classes usadas pelo sistema imune para reconhecimento de antígeno, os anticorpos são as moléculas com maior capacidade de reconhecer uma faixa mais ampla de estruturas antigênicas, maior capacidade de discriminar diferentes antígenos e maior força de ligação a estes [19].

Todos os anticorpos têm uma estrutura central comum de duas cadeias leves idênticas e duas cadeias pesadas idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada e as duas cadeias pesadas são unidas mutuamente. Tanto as cadeias leves quanto as pesadas contém uma série repetitiva de unidades homólogas, que se enovelam independentemente em um motivo globular comum denominado domínio de imunoglobulina. Entretanto quando comparadas entre diferentes imunoglobulinas, as sequências dessas cadeias variam amplamente. Tanto nas cadeias pesadas quanto nas

leves, essa variedade é mais pronunciada no domínio N-terminal, enquanto as seqüências dos outros domínios permanecem relativamente constantes. A estrutura de uma molécula IgG pode ser vista na figura 7.

Figura 7 – Estrutura esquemática de uma imunoglobulina G (esquerda) [20], e estrutura globular de uma imunoglobulina G (direita) [21].

Por esse motivo o domínio N-terminal numa cadeia polipeptídica pesada ou leve é denominada região variável (Fv), abreviada para V_H e V_L, respectivamente. O Fv apresenta uma estrutura constituída de folhas β pregueadas intercaladas por uma volta (loop). Seis dessas voltas participam com quase a totalidade dos pontos de contato com o antígeno. Os outros domínios são denominados de região constante (CH e CL), sendo as regiões CH da cadeia pesada constituídas de três ou mais domínios denominados CH1, CH2, etc [22].

Dentro de uma imunoglobulina, as cadeias pesadas e leves são paralelas e este par de domínios forma um sítio de ligação de antígenos. A especificidade antigênica de determinada proteína é condicionada pelas seqüências combinadas de seus domínios V_H e V_L e, por esse motivo, varia amplamente entre as imunoglobulinas. A molécula de anticorpo pode ser subdividida em porções Fc e Fab, onde Fc é constituída dos domínios constantes e Fab constituída dos domínios V_H-CH1 e V_L-CL, responsáveis pela ligação com os antígenos e, portanto, denominado sítio combinatorial para o antígeno. Os fragmentos da estrutura de uma molécula IgG podem ser vistos na figura 8.

Figura 8 - Fragmentos de imunoglobulinas G [20].

As três áreas altamente divergentes dentro das regiões V são chamadas também de regiões hipervariáveis e são mantidas no local, por regiões estruturais, mais conservadas. Em uma imunoglobulina, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada ocupam conjuntamente um espaço tridimensional para formar uma superfície de ligação para o antígeno. Como essas seqüências formam uma superfície complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, as regiões hipervariáveis são também chamadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs) [22].

Para promover um estudo mais detalhado e que buscasse diminuir a semelhança entre os anticorpos, foram analisadas também, anticorpos fracionados, constituídos somente por uma porção ativa, oferecendo dessa forma sítios mais específicos para a ligação dos íons metal.

1. 3 Fundamentos teóricos químicos

O conhecimento de alguns princípios químicos se faz necessário como suporte para a interpretação dos dados obtidos com a técnica empregada para o desenvolvimento do presente trabalho.

1. 3. 1 Eletronegatividade

Eletronegatividade é a capacidade que um átomo tem, de atrair elétrons de outro átomo quando os dois formam uma ligação química. Assim, um átomo que, quando isolado, possui grande potencial de ionização e grande afinidade eletrônica também apresentará, quando ligado a outro átomo, grande atração por elétrons, ou seja, terá uma alta eletronegatividade. Podemos dizer que a eletronegatividade depende de dois fatores: tamanho do átomo e número de elétrons na última camada [23].

Considerando o primeiro fator, quanto menor é o átomo, maior é sua capacidade de atrair elétrons, já que a distância destes ao núcleo é menor. O segundo fator se deve à tendência que os átomos possuem de se tornarem mais estáveis quando completam oito elétrons na última camada. Os átomos com maior número de elétrons na última camada exercem maior atração sobre os elétrons de outros átomos. É o balanço entre esses fatores que determina qual, dentre dois átomos, é o mais eletronegativo [23]. O esquema de eletronegatividade pode ser visto na figura 9.

Figura 9 - Eletronegatividade [23].

1. 3. 2 Dureza e maciez dos ácidos e bases

Os íons metálicos e os ligantes podem ser classificados como duros ou macios. Sabe-se que ácidos duros coordenam-se preferencialmente a bases duras, assim como, ácidos moles coordenam-se a bases moles [23, 24].

Ligantes duros formam ligações por meio de átomos de nitrogênio (N) e oxigênio (O) e se ligam preferencialmente a metais duros. Ligantes moles formam ligações por meio de átomos de fósforo (P) e enxofre (S) e se ligam preferencialmente a metais moles. Na tabela 1 seguem alguns exemplos de ácidos e bases, duros e moles [23, 24].

Tabela 1 - Dureza e maciez dos ácidos e bases [23, 24].

	Ácidos	Bases
Duros	H^+ , Eu^{3+} , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Sc^{3+} , La^{3+} , In^{3+} , Ce^{4+} , K^+ , Co^{3+} , Ti^{4+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Li^+ , Be^{2+} , Sr^{2+} , Zr^{4+} , Hf^{4+} , Cr^{6+} , Mn^{2+} , Mn^{7+} , Sn^{4+} , Si^{4+} , As^{3+} , Ga^{3+} , N^{3+} , Cl^{3+} , Cl^{7+} , I^{5+} , I^{7+} , etc	F^- , NH_3 , O^{2-} , H_2O , SO_4^{2-} , NO_3^- , ClO_4^- , CO_3^{2-} , OH^- , RNH_2 , CH_3COO^- , PO_4^{3-} , N_2H_4 , ROH , RO^- , R_2O , RCO_2^- , etc.
Moles	Pd^{2+} , Pt^{2+} , Pt^{4+} , Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Cd^{2+} , Hg^+ , Hg^{2+} , CH_3Hg^+ , Tl^+ , CH_2 , O , Cl , Br , I , N , RO , RO_2 .	H^- , RSH , CN^- , SCN^- , I^- , R_3P , R_2S , RS^- , $S_2O_3^{2-}$

1. 3. 3 Complexos

Os metais podem perder elétrons e formar íons positivos, o que possibilita a sua solubilidade em meios biológicos [25]. Dessa forma os metais são importantes componentes funcionais e estruturais dos seres vivos, porém, íons metálicos simples podem não apresentar as características necessárias para desempenhar as funções biológicas necessárias. Nesses casos é necessário que o íon metálico se combine por meio de ligações covalentes coordenadas a um composto orgânico complexo, e essa união favoreça a atividade biológica [26].

Na forma de cátions, os metais apresentam deficiência em elétrons, o que possibilita que esses se liguem a moléculas ricas em elétrons. Os complexos são, portanto, os compostos resultantes dessa atração entre as oposições de cargas [25].

1. 3. 4 Reatividade de íons metálicos em moléculas orgânicas

Um íon metálico coordenado a uma molécula orgânica pode influenciar as reações químicas que envolvem essa molécula de diversas formas [27], como a seguir:

- O metal pode servir como centro para a ligação e organização da molécula com um substrato.
- O metal pode polarizar um substrato tornando-o capaz de realizar reações incomuns para o mesmo.
- O metal pode mudar a conformação usual do ligante e conseqüentemente sua reatividade.
- O centro metálico pode apresentar atividade redox e ser capaz de reduzir ou oxidar o ligante. A capacidade dos metais de transição de apresentar variáveis estados de oxidação permite as chamadas reações de adição-oxidativa ou eliminação redutiva.
- O metal pode ter a energia dos seus orbitais de fronteira com os ligantes alterada e também os estados de spin (propriedades magnéticas).
- O íon metálico polariza a densidade eletrônica do ligante. O papel do metal é atual como eletrófilo e facilitar o ataque nucleófilo ao ligante.

Dessa forma a interação do metal sobre o ligante e do ligante sobre o metal é simbiótica [27].

1. 3. 5 Interação do DNA e imunoglobulinas com metais

As bases nitrogenadas dos ácidos nucléicos, adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G) tem afinidades diferentes por íons metais. A ordem de estabilidade dos complexos íons-base para o metais são: $G > A$, $C > T$. Em pH fisiológico os sítios de ligação preferidos dos íons nas bases são: Guanina N7, adenina N1 e/ou N7, citosina N3 e timina O4 [28]. Veja na figura 10 os possíveis sítios de ligação para os metais nas bases nitrogenadas.

Figura 10 - Possíveis sítios de ligação para metais nas bases nitrogenadas [6].

Pode ainda ocorrer ligação do metal no grupo fosfato. Isso implica que a ligação de um íon metal no DNA pode envolver ou o grupo fosfato e uma base, ou a ligação do metal em duas bases diferentes em uma mesma molécula [28].

Quando as bases estão inseridas na dupla hélice do DNA as afinidades pelos íons metais se modificam. A interação de metais com os ácidos nucleicos pode acontecer de duas formas distintas: ligação difusa e ligação local, ambas importantes para a estrutura e função do ácido nucleico. Na ligação difusa a interação do metal é maior com a água que fica em volta do DNA do que com o próprio DNA. Já na ligação local o metal se orienta de modo a se ligar em um sítio específico da molécula de DNA [28].

As imunoglobulinas podem oferecer como sítios preferenciais de ligação para metais os átomos de oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S), presentes na porção comum e diversificada da molécula [25]. Veja na figura 11 o esquema simplificado da estrutura de um IgG com possíveis sítios de ligações para metais.

Figura 11 - Esquema simplificado da estrutura de um IgG com possíveis sítios de ligações para metais [21].

A utilização de metais para o estudo de biomoléculas pode trazer informações dos processos nos quais este metal possa participar [4].

1. 3. 6 Propriedades químicas dos núcleos de prova

Quando utilizamos um dado radioisótopo como sonda CAP, devemos considerar as propriedades químicas do isótopo-pai pois é este que estabelece ligações com a molécula estudada e não às do isótopo-filho que irá emitir a cascata gama [29]. Isso significa que o isótopo-filho emite a cascata gama que garante as informações do ambiente químico local (sítio) que se formou em torno no isótopo-pai.

1. 3. 6. 1 A química do índio (In)

O elemento índio faz parte do grupo 13 da classificação periódica e tem configuração $4d^{10}5s^25p^1$, número de oxidação $3+$ e número de coordenação igual a 4. O In^{3+} apresenta propriedades químicas semelhante às do Al^{3+} e do Ga^{3+} , do mesmo grupo que o seu. Dentre as propriedades do In^{3+} destacamos a hidrólise com a formação de $\text{In}(\text{OH})_3$. De acordo com Bertotti (1986) [30], existem muitas evidências de que o In^{3+} se apresenta em solução aquosa não complexante sob a forma de $[\text{In}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ e que com números de coordenação 4 e 5 são conhecidos na química do In^{3+} complexos formados especialmente com ligantes moles e/ou volumosos.

1. 3. 6. 2 A química do cádmio (Cd^{2+})

O cádmio apresenta configuração $[\text{Kr}]4d^{10}5s^2$ o que justifica a formação de compostos bivalentes característicos. O cádmio metálico pode ser atacado pelos ácidos sulfúrico e nítrico, liberando na solução resultante o íon Cd^{2+} . Ele forma complexo com ligantes doadores de O, N e S e também com haletos. São conhecidos complexos desse elemento com número de coordenação de 2 a 8, mas os mais comuns são tetracoordenados e tetraédricos. Existem ainda vários complexos octaédricos e hexacoordenados, como o íon complexo $[\text{Cd}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ que é formado quando o Cd^{2+} se encontra em meio aquoso[23].

1. 3. 6. 3 A química do háfnio (Hf^{4+})

Elemento metálico de transição, prateado e brilhante. $Z = 72$; configuração eletrônica: $[\text{Xe}]4f^{14}5d^26s^2$ e $MA = 178,49\text{u}$. Por apresentar configuração d^0 , sem elétrons desemparelhados, seus compostos serão brancos ou incolores e diamagnéticos. Em função da sua semelhança em tamanho e em propriedades com o zircônio, o háfnio é encontrado, na proporção de 1 a 2% em minérios de zircônio. E devido à semelhança de tamanho de seus íons a separação do háfnio do zircônio é muito difícil de ser realizada e para a maioria dos usos tal separação se faz desnecessária em função da semelhança entre as suas propriedades.

A maioria dos seus compostos são complexos de háfnio (IV), embora complexos menos estáveis de háfnio(III) também existam. O estado de oxidação (+IV) é o mais comum e estável. O háfnio metálico é pouco reativo nas condições ambientes, mas pode ser dissolvido em HF formando hexafluoro complexo. Também podem existir em meio aquoso, além do íon $[\text{HfF}_6]^{2-}$, as seguintes estruturas em meio aquoso: o íon $[\text{HfF}_7]^{3-}$. O íon que podem dimerizar formando os dímeros $[\text{Hf}_2\text{F}_{12}]^{4-}$ e $[\text{Hf}_2\text{F}_{13}]^{5-}$ [31].

1. 3. 6. 4 A química da prata (Ag^+)

A prata ($Z = 47$) tem configuração eletrônica $[\text{Kr}]5s^14d^{10}$, apresenta 1 elétron s externo, além do subnível d completo. Com seu estado de oxidação mais estável $1+$, pode ser encontrado em meio aquoso na forma do íon hidratado simples $\text{Ag}^+_{(\text{aq})}$.

Os compostos simples ou complexos em que o Ag^+ aparece são diamagnéticos em função da sua configuração d^{10} . Por ser pequeno e altamente polarizante atua como ácido mole, formando uma grande variedade de complexos. Quando o ligante é monodentado o complexo formado será, geralmente, dicoordenado linear. Ligantes bidentados levam à formação de complexos polinucleares enquanto ligantes como os derivados da fosfina (PH_3), podem formar complexos tanto dicoordenados como tetracoordenados [23].

CAPÍTULO 2

2. 1 INTERAÇÕES HIPERFINAS EM BIOMOLÉCULAS

A interação hiperfina é aquela que ocorre entre os momentos nucleares (momento de dipolo magnético e momento de quadrupolo elétrico), de determinado núcleo, e os campos eletromagnéticos (campo magnético e gradiente de campo elétrico) externos a este núcleo, gerados pelas cargas e spins das partículas na sua vizinhança [32].

Os estudos das interações entre átomos metálicos e sistemas biológicos têm atraído interesse, uma vez que os organismos vivos habitam um ambiente inorgânico. Muitas proteínas do corpo humano, por exemplo, interagem com sistemas constituídos de átomos metálicos como Ca, Fe, Zn, Cu, Se, etc. Estas proteínas estão envolvidas em muitas funções fisiológicas essenciais tais como: reações de oxido-redução, transporte, armazenamento e transcrição de informações genéticas, entre outras [4].

A primeira aplicação da técnica PAC em sistemas biológicos foi realizada por Leipert, e outros [33] em 1968 para o estudo da dinâmica de macromoléculas biológicas. Desde esta época, vários modelos de aplicações da técnica CAP em sistemas biológicos foram relatados ao longo das últimas décadas, principalmente para o estudo de macromoléculas biológicas contendo íons metálicos (proteínas metálicas). Os primeiros trabalhos usaram esta técnica para o estudo dos tempos de correlação rotacional para proteínas em solução [34], para o estudo da estrutura local de proteínas [3] e para a investigação das mudanças estruturais induzidas por diferentes valores de pH nas vizinhanças do átomo de prova de Cd substituindo o Zn na metaloenzima humana, anidrase carbônica B [35]. A base para a análise teórica de dados obtidos com a técnica PAC em biomoléculas foi desenvolvida por Bauer [36] usando as interações de quadrupolo parciais dentro do Angular Overlap Model (AOM). O primeiro artigo de revisão sobre o uso da técnica PAC para o estudo de biomoléculas foi publicado em 1985 [37], seguido por outros mais recentes [4, 38, 39].

2. 2 Correlação angular γ - γ

Dunworth, pela primeira vez, em 1940, apontou a existência da correlação angular entre duas radiações gamas emitidas em cascata por um núcleo radioativo [40]. No mesmo ano, Hamilton, apresentou a primeira descrição teórica sobre o fenômeno da correlação angular [41]. Goertzel [42], em 1946, sugeriu a possibilidade de perturbação extranucleares na correlação angular gama-gama. Porém, considera-se que o primeiro experimento de correlação angular perturbada tenha sido feito por Frauenfelder [43, 44] em 1951.

Em 1953, Abragam e Pound, publicaram um artigo que, pela primeira vez, apontava um tratamento detalhado da teoria de correlação angular perturbada. A técnica PAC sofreu muitos avanços nas últimas décadas, a ponto de estar sendo aplicada para investigação nas áreas da química, da biologia e da física [45].

2. 2. 1 Correlação angular γ - γ não perturbada

A distribuição da intensidade das radiações- γ , provenientes dos estados nucleares excitados pertencentes a um conjunto de núcleos depende dos ângulos que as direções das emissões têm em relação às orientações dos “spins” nucleares. Como, num dado conjunto de núcleos, todas as orientações são equiprováveis, tal comportamento não é observado. Em decorrência disso, a detecção das radiações- γ , guardadas as eventuais flutuações experimentais, apresentam um padrão isotrópico de intensidade. Se fosse possível detectar aquelas radiações- γ originárias de um subconjunto com orientação unidirecional dos “spins”, o padrão anisotrópico da intensidade apareceria [46]. O registro experimental desta orientação é realizado a partir de uma cascata de decaimento nuclear: a detecção da primeira radiação- γ emitida, radiação- γ_1 , naquela direção que permitiu sua detecção, implica que tenha se originado de um subconjunto de núcleos com uma certa orientação de “spin” (e assim, as demais radiações- γ emitidas naquela direção serão necessariamente originárias do mesmo subconjunto de núcleos no que se refere ao alinhamento isodirecional dos seus “spins”). Na etapa seguinte deve-se detectar a radiação- γ originada do estado intermediário desta cascata nuclear: por causa da exigência de conservação do momento angular total (composição vetorial entre os

“spins” do estado nuclear excitado e da radiação- γ emitida) a intensidade de emissão desta segunda radiação- γ_2 possuirá dependência angular com relação à direção de emissão da primeira radiação- γ_1 . Para ter certeza de que ambas as radiações- γ se originaram no mesmo núcleo, mantendo-se a coerência da informação experimental, um circuito eletrônico para registro de coincidências começa a operar quando da chegada do pulso eletrônico associado à radiação- γ_1 , e só emite um pulso de saída para registro se durante um intervalo de tempo ajustado previamente, sempre em uma escala do nanosegundo (ns), chegar um segundo pulso eletrônico, associado à radiação- γ_2 . Desta maneira, com a observação das radiações- γ_1 , é selecionado um subconjunto com orientação unidirecional de “spin”; registrando as coincidências entre as radiações- $(\gamma_1-\gamma_2)$, somente aquelas radiações- γ_2 emitidas por este mesmo subconjunto contribuem para este registro. O efeito da emissão com direção preferencial é conhecido como Correlação Angular (CA). A CA é caracterizada pelo parâmetro nuclear Anisotropia (A_{kk}), aqui registrado a partir da taxa de contagem de coincidências entre as radiações $(\gamma_1-\gamma_2)$ como função do ângulo (θ) medido entre as direções da emissão seqüencial destas duas radiações .

$$W(\theta, t) = \sum_k A_{kk} P_k(\cos \theta) \quad (1)$$

onde k é par e $0 < k \leq \min(2I_1, 2I_2)$, com L_1 e L_2 sendo respectivamente os momentos angulares de γ_1 e γ_2 , $P_k(\cos \theta)$ o Polinômio de Legendre de ordem k .

2. 2. 2 Correlação angular γ - γ perturbada

Se um núcleo excitado, que decai emitindo duas radiações em cascata, γ_1 e γ_2 , ocupa um determinado sítio do material estudado, os momentos nucleares passam então a interagir com os campos eletromagnéticos gerados pela distribuição de cargas e spins ao seu redor. Se a vida média do nível intermediário da cascata gama-gama for longa o suficiente, da ordem de nanosegundos (ns), a interação hiperfina entre os momentos nucleares e os campos eletromagnéticos provoca um realinhamento no spin deste nível. Com a mudança de direção do spin, a população dos subestados m é alterada, ocorrendo

mudanças na direção de emissão de γ_2 bem como uma modulação na função de correlação angular, que passa a ser perturbada pela interação hiperfina e pode ser representada por:

$$W(\theta, t) = \sum_k G_{kk}(t) A_{kk} P_k(\cos \theta) \quad (2)$$

onde, $P_k(\cos \theta)$ é o polinômio de Legendre de ordem k , A_{kk} são coeficientes de correlação angular gama-gama e $G_{kk}(t)$ é a função de perturbação cuja forma depende do tipo de interação, magnética ou elétrica, e da simetria dos campos locais [47]. O esquema simplificado do decaimento gama-gama pode ser visto na figura 12.

Os campos magnético ou elétrico podem ser percebidos porque o núcleo de prova no seu estado intermediário carrega um momento magnético (μ) e um momento de quadrupolo elétrico (Q). O esquema de um núcleo de prova no interior de um cristal está representado na figura 13.

Figura 12 - Esquema simplificado do decaimento gama-gama.

Figura 13 - Núcleo de prova no interior do cristal.

2. 3 Interação quadrupolo elétrica

A interação quadrupolo elétrica ocorre entre a distribuição de cargas elétricas do núcleo com a distribuição de cargas de sua vizinhança. É a interação entre o momento de quadrupolo nuclear Q e um tensor 3×3 do Gradiente de Campo Elétrico (GCE) $V_{x,y}$ (x,y sendo as coordenadas cartesianas) que é dado pela derivada segunda do potencial elétrico $V(r)$ no sítio do núcleo ($r = 0$). Escolhendo um sistema de eixos para o qual $V_{x,y} = 0$ para $x \neq y$ o tensor gradiente de campo elétrico fica mais simplificado e a Hamiltoniana da interação é dada pela expressão abaixo, onde e é a carga do elétron.

$$H_Q = \frac{eQ}{4I(2I-1)} [V_{zz}(3I_z^2 - I^2) + \frac{1}{2}(V_{yy} - V_{xx})(I_y^2 - I_x^2)] \quad (3)$$

No seu sistema de eixos principais o tensor GCE contém as 3 componentes V_{xx} , V_{yy} e V_{zz} , que são expressas pela constante de acoplamento quadrupolar $v_Q = eQV_{zz}/h$, que descreve a intensidade do tensor GCE, e pelo parâmetro de assimetria $\eta = (V_{xx} - V_{yy})/V_{zz}$ com $|V_{xx}| \leq |V_{yy}| \leq |V_{zz}|$, tal que $0 \leq \eta \leq 1$, que descreve quanto o GCE desvia da simetria axial.

Portanto, apenas dois parâmetros são suficientes para caracterizar o tensor GCE: a sua maior componente V_{zz} e a diferença $V_{yy} - V_{xx}$, que são expressas pelo parâmetro de assimetria η . Deste modo a Hamiltoniana pode ser escrita em função de V_{zz} , η e dos operadores de momento angular I_z , I_+ e I_- .

$$H_Q = \frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)} [(3I_z^2 - I(I+1)) + \frac{\eta}{2}(I_+^2 + I_-^2)] \quad (4)$$

$$V_{ij} \sim \sum_q \frac{3q}{r^5} \begin{pmatrix} x^2 - \frac{r^2}{3} & xy & xz \\ xy & y^2 - \frac{r^2}{3} & yz \\ xz & yz & z^2 - \frac{r^2}{3} \end{pmatrix} \rightarrow \begin{pmatrix} V_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & V_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & V_{zz} \end{pmatrix}$$

$$\left. \begin{array}{l} \text{a) } \sum_i V_{ii} = 0 \\ \text{b) } |V_{zz}| \geq |V_{yy}| \geq |V_{xx}| \\ \text{c) } \frac{(V_{xx} - V_{yy})}{V_{zz}} = \eta \end{array} \right\} \begin{array}{l} \rightarrow v_Q = \frac{eQV_{zz}}{h} \\ \rightarrow \eta \end{array}$$

Figura 14 - O tensor gradiente de campo elétrico GCE e a correspondência de seus componentes com os parâmetros usados em CAP (acima). Três ambientes diferentes para um núcleo de prova de ^{111}In em uma rede cristalina de Si e os correspondentes tensores do GCE (abaixo).

Para $\eta = 0$, os autovalores em energia da interação de quadrupolo elétrico são dados por:

$$E_m = [3m^2 - I(I+1)] \frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)} \quad (5)$$

que produzem um desdobramento nos subníveis de energia, sendo que o espaçamento de energia entre eles é dado por:

$$\Delta E = E_m - E_{m'} = \hbar\omega = \frac{3eQV_{zz}}{4I(2I-1)} |m^2 - m'^2| \quad (6)$$

A menor frequência de transição entre os subníveis m é dada por:

$$\omega_0 = \frac{3eQV_{zz}}{4I(2I-1)\hbar} = 3\omega_Q \quad \text{para } I=\text{inteiro} \quad (7)$$

$$\omega_0 = \frac{6eQV_{zz}}{4I(2I-1)\hbar} = 6\omega_Q \quad \text{para } I=\text{semi-inteiro} \quad (8)$$

onde, $\omega_Q = \frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)\hbar}$ é a frequência quadrupolar. A frequência de interação quadrupolar independente do spin também pode ser definida por:

$$\nu_Q = \frac{eQV_{zz}}{h} \quad (9)$$

Para $\eta > 0$ a Hamiltoniana deve ser diagonalizada para cada valor de η , pois os operadores de momento angular $I_{\pm} = I_x \pm iI_y$ projetam transições entre subestados m diferentes. Como consequência as frequências de transição ω_n mudam com o valor de η como mostra a figura 14. Neste caso o fator de perturbação dado por:

$$G_{kk}(t) = \sum_{n=0}^{n_{\max}} S_{kn} \cos(\omega_{0n} t) \quad (10)$$

onde, os S_{kn} são as amplitudes das frequências de transição, que dependem diretamente do spin I do estado intermediário e são normalizados. Seus valores são tabelados em função de η . Para o caso de spin $I=5/2$ e $\eta=0$, $k=2$, o fator de perturbação é dado por:

$$G_{22}(t) = S_{20} + S_{21}\cos \omega_1 t + S_{22}\cos \omega_2 t + S_{23}\cos \omega_3 t \quad (11)$$

onde as frequências de transição são $\omega_1=\omega_0$, $\omega_2=2\omega_0$ e $\omega_3=3\omega_0$ é dada pela equação (11) [45].

Figura 15 - Desdobramento de um estado nuclear causado por um gradiente de campo elétrico em função de η .

2. 4 Interação dinâmica

As medidas de CAP com biomoléculas são realizadas em solução, condição na qual sofrem o efeito da difusão rotacional que é representada pelo tempo de correlação rotacional τ_{CR} , que descreve a mobilidade de uma molécula numa solução. Este tempo depende da viscosidade ξ , da temperatura absoluta T e do volume da molécula V e é definido por $\tau_{CR} = V \cdot \xi / (k_B T)$, onde k_B é a constante de Boltzmann. A influência da interação dinâmica é mais forte quando $\omega_0 \tau_{CR} \approx 1$. Neste caso o efeito sobre a correlação angular será um rápido amortecimento da anisotropia como função do tempo. Há outras duas situações possíveis: Na primeira situação a flutuação da interação quadrupolar é rápida, definida por $\omega_0 \tau_{CR} \ll 1$, ou seja, quando o tempo de flutuação é curto, quando comparado com a escala de tempo estabelecida pela interação quadrupolar caracterizada por ω_0 . Neste caso, o núcleo perde a coerência de fase e a função de perturbação se torna um simples decaimento exponencial: $G_{22}^{din}(t) = e^{-\lambda_k t}$ [4].

Figura 16 - Interação dinâmica em um líquido. O GCE é determinado pela interação com os átomos vizinhos ao sítio da ponta de prova dentro da biomolécula. Além desta, há uma interação quadrupolar originada pelas moléculas da vizinhança que muda aleatoriamente devido ao movimento Browniano.

Na segunda, a flutuação da interação quadrupolar é lenta e é definida por $\omega_0\tau_{CR} \gg 1$, ou seja, quando o tempo de flutuação é longo quando comparado com a escala de tempo estabelecida pela interação quadrupolar, o efeito sobre a correlação angular será um lento amortecimento da anisotropia e a função de perturbação é dada por: $G_{22}^{din}(t) = e^{-t/\tau_c} G_{22}(t)$. No limite $\tau_{CR} \rightarrow \infty$, a interação será puramente estática. Somente neste caso é possível determinar simultaneamente tanto ω_0 (frequência de interação quadrupolar) e η (assimetria), que são os parâmetros hiperfinos relacionados com a estrutura local do sítio do núcleo de prova na biomolécula [4]. A figura 17 mostra o efeito da interação dinâmica devido à difusão rotacional na função de perturbação $G_{22}(t)$.

Figura 17 - Efeito da interação dinâmica sobre a função de perturbação $G_{22}(t)$ para o núcleo de prova ^{111m}Cd .

Maiores detalhes sobre a correlação angular gama-gama perturbada pode ser encontrados na referência [45], alguns artigos de revisão mais recentes [46, 48] fornecem uma visão geral de seus princípios básicos assim como algumas aplicações mais relevantes. Casos mais específicos aplicados a sistemas biológicos podem ser observados nas referências [49, 50, 51].

2.5 O Índio e o “after-effects”

O radioisótopo ^{111}In decai por captura eletrônica para um dos estados excitados do Cd, que por sua vez, decai por meio de uma cascata de dois raios gama para o estado fundamental. A captura eletrônica deixa um buraco na camada K ou L. O processo de preenchimento do buraco na camada eletrônica do íon-filho, no caso o Cd, se desenvolve com uma cascata de vagas que se deslocam para o exterior da eletrosfera. Durante o processo de preenchimento das camadas inferiores, há emissão de energia que pode ser transferida a outros elétrons do átomo, que podem, com excesso de energia, ser ejetado do átomo. Esses elétrons são chamados de elétrons Auger. Quando a

vaga em cascata chega a mais externa do íon-filho, os átomos vizinhos começam a ser envolvidos no processo e estes podem ceder elétrons ganhando carga positiva [51].

Em decorrência desse processo de rearranjo eletrônico pode haver uma forte perturbação no ambiente químico próximo da sonda utilizada gerando um tipo de interação hiperfina dinâmica que pode observada pela técnica CAP. Esta perturbação ou “after-effects” é decorrente desse processo de transferência de elétrons de átomos vizinhos ao átomo que contém o núcleo CAP. A difusão do vazio ao longo da camada eletrônica ocorre num tempo muito curto (menor que 10^{-15} s) que não é percebido pelo núcleo CAP. Ao chegar na última camada, “o vazio” poderá ser “preenchido” por um elétron de condução presentes no ambiente químico vizinho evitando-se assim, uma perturbação elétrica no meio. Quando, porém, a sonda CAP está num ambiente em que não existem elétrons livres disponíveis, a ocupação do vazio da última camada do átomo que sofreu a captura K promove uma ionização que se propaga no meio originando uma série de espécies com diferentes gradientes eletrostáticos [51].

Segundo evidências, o processo de decaimento por captura eletrônica pode causar a desintegração da ligação entre o núcleo de prova e a molécula, enquanto outras podem permanecer quase intactas sendo mais ou menos desorientadas. O relaxamento das condições de equilíbrio depende do tempo e do grau de desorientação. Se a molécula permanecer intacta após o processo, podemos considerar somente um rearranjo químico da mesma em torno do novo elemento químico. Caso a ligação entre o núcleo de prova e a molécula se desintegre, o íon radioativo pode permanecer como um íon livre na solução ou prover novas ligações, formando novos complexos [51].

CAPÍTULO 3

3. 1 MATERIAIS

3. 1. 1 Descrição do DNA das diferentes linhagens de camundongos estudadas neste trabalho

As linhagens selecionadas para extração de DNA para a realização do presente trabalho foram A/J, C57BL/6, B6AF1, BXA1 e BXA2 oriundas da Colônia do CEMIB-UNICAMP, cuja integridade sanitária e genética foram preservadas pela manutenção dos modelos em unidades isoladoras flexíveis [17].

As linhagens A/J e C57BL/6 são parentais originais, ou seja, apresentam fenótipos diferentes quanto à resistência ou susceptibilidade a doenças. Em relação à Doença de Chagas a linhagem A/J é susceptível e a linhagem C57BL/6 é resistente [8].

A linhagem A/J apresenta padrão de resposta IgG2a, revelando uma resposta celular imediata, mas que por deficiência na produção de interferon γ (IFN- γ) e interleucina 12 (IL-12) acarreta a falta de controle da infecção e conseqüente morte de seus representantes [8].

A linhagem C57BL/6 apresenta IgG2b mais elevada, revelando uma resposta imunológica celular tardia e por possuírem altos níveis de IFN- γ e IL-12, conseguem controlar a infecção na fase aguda favorecendo a cura ou influenciando o desenvolvimento da forma cardíaca da doença [8].

A linhagem B6AF1 representa o híbrido oriundo do acasalamento programado entre machos da linhagem A/J e fêmeas das linhagens C57BL/6. A linhagem B6AF1 comporta-se diante da infecção provocada por *T. cruzi* de forma similar ao seu parental original C57BL/6 de fenótipo resistente, demonstrando que a resistência é transmitida e o fenômeno é de caráter dominante [8].

A linhagem B6AF1 apresenta como resposta principal IgG2a, porém, esses animais potencialmente controlam a infecção, pois herdam de seu parental original, C57BL/6, regiões relacionadas com a resistência, revelando IgG2b com resposta tardia. Essa linhagem é, portanto, mais resistentes que seu parental original C57BL/6 [8].

Já as linhagens recombinantes BXA1 e BXA2 são obtidas a partir da mistura ao acaso do genoma de duas linhagens isogênicas parentais, fixadas com o acasalamento entre dois indivíduos F1, na forma *intercross*, por 20 gerações. São, portanto, linhagens recombinantes isogênicas [8].

A linhagem BXA1 apresenta um padrão de resposta inicial semelhante aos animais da linhagem C57BL/6, ou seja, apresenta como resposta principal IgG2b, porém apresenta IgG2a em quantidade significativa, sendo, no entanto, inferior à apresentada pela linhagem A/J. Isso significa que o padrão de resposta por ela apresentado preserva traços da linhagem resistente e da susceptível. Assim, essa linhagem apresenta um padrão de resposta intermediário, não sendo tão resistente quanto os representantes das linhagens B6AF1 e C57BL/6, mas, resistindo à infecção por *T. cruzi* por um período superior ao apresentado pela linhagem A/J [8].

A linhagem BXA2 apresenta em sua resposta IgG2a e IgG2b quase na mesma proporção. Esses animais são considerados susceptíveis a infecção por *T. cruzi*, porém permanecem vivos durante um período superior àquele apresentado pela linhagem A/J, provavelmente por produzirem uma resposta tardia decorrente de IgG2b, contrastando com a linhagem parental de fenótipo susceptível que não consegue desenvolver este mecanismo. Assim, não resistem à infecção de forma tão acentuada quanto os animais das linhagens B6AF1 e C57BL/6, mas, controlam a infecção e sobrevivem a ela por um período superior a 30 dias, indicando a importância da subclasse IgG2b na resistência à infecção por *T. cruzi* [8].

3. 1. 2 Preparação de amostras

Para a preparação de amostras para a realização do presente trabalho os materiais biológicos selecionados foram: DNA de diferentes linhagens de camundongos (A/J, C57BL/6, B6AF1, BXA1 e BXA2); anti-IgG pertencentes as subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b; IgG fracionado pertencentes as subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b; e bases nitrogenadas do DNA (adenina, citosina, guanina e timina).

3. 1. 2. 1 Preparação de amostras de DNA

O DNA utilizado no presente trabalho foi extraído da orelha ou da ponta da calda das diferentes linhagens de camundongos estudadas. Esse DNA fica acomodado

em tubos com água deionizada e são mantidos em geladeira a 4°C até o momento de uso.

Para a preparação das amostras a serem medidas, pequenas alíquotas (5µl) foram retiradas desses tubos contendo DNA total. Essa alíquota foi marcada de forma direta com cloreto de índio e seguiu o seguinte padrão:

- DNA marcado com cloreto de índio: (45µl – H₂O, 5µl – DNA e 1µl – InCl₃).

3. 1. 2. 2 Preparação de amostras de anticorpos completos e fracionados

Os anticorpos completos e fracionados utilizados no presente trabalho foram obtidos comercialmente junto a Sigma-Aldrich Brasil por meio da MECLAB comércio de produtos e equipamentos para laboratórios Ltda – ME. Eles permaneceram acomodados em tubos com água deionizada e foram mantidos em geladeira a 4°C até o momento de uso.

Para a preparação das amostras a serem medidas, pequenas alíquotas (5µl) foram retiradas desses tubos contendo os anticorpos. Esses anticorpos foram marcados com cloreto de índio, fluoreto de háfnio e nitrato de cádmio e seguiu o seguinte padrão:

- Anticorpos marcados com cloreto de índio: (45µl – H₂O, 5µl – IgG e 1µl – InCl₃).
- Anticorpos marcados com fluoreto de háfnio: (45µl – H₂O, 5µl – IgG e 5µl – HfF₄).
- Anticorpos marcados com nitrato de cádmio: (45µl – H₂O, 5µl – IgG1 e 5µl – Cd(NO₃)₂).

4. 1. 2. 3 Preparação de amostras das bases nitrogenadas

As bases nitrogenadas utilizadas no presente trabalho foram obtidas comercialmente junto a Sigma-Aldrich Brasil por meio da MECLAB comércio de produtos e equipamentos para laboratórios Ltda – ME.

As bases nitrogenadas foram dissolvidas em água e em solução tampão pH $\cong$ 7,0 (hidrogeno fosfato de potássio/dihidrogeno fosfato de sódio). A concentração adotada é de 0,1 Mol de base para 100 ml de água ou solução tampão.

Após serem dissolvidas em água ou em solução tampão as bases são acomodadas em tubos e mantidas à temperatura ambiente até o momento de uso e seguem o seguinte padrão:

Para a preparação das amostras a serem medidas, alíquotas de 50µl foram retiradas desses tubos contendo as bases nitrogenadas. Essas bases nitrogenadas foram marcadas com cloreto de índio, nitrato de cádmio e solução aquosa de prata e seguiu o seguinte padrão:

- Bases nitrogenadas em solução marcadas com cloreto de índio: (50µl – solução aquosa de base nitrogenada + 1µl – InCl_3)
- Bases nitrogenadas cristalinas marcadas com cloreto de índio: (0,01 Mol de base nitrogenada + 1µl – InCl_3).
- Bases nitrogenadas em solução marcadas com nitrato de cádmio: (50µl – solução aquosa de base nitrogenada e 5µl – $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$).
- Bases nitrogenadas cristalinas marcadas com nitrato de cádmio: (0,01 Mol de base nitrogenada + 5µl – $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$).
- Bases nitrogenadas marcadas com solução aquosa de prata: (50µl de solução tampão + base nitrogenada e 300µl de solução aquosa de Ag^+).

3. 1. 2. 4 Preparação de amostras da água e solução tampão (branco)

Para a preparação das amostras do branco, pequenas alíquotas de água e solução tampão foram retiradas de seus recipientes e marcadas, de forma direta, com cloreto de índio e nitrato de cádmio seguindo o seguinte padrão:

- Água: 45µl – H_2O e 1µl – InCl_3 .
- Água: 50µl – H_2O e 5µl – $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.
- Solução tampão: 50µl – solução tampão e 5µl – $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

3. 1. 3 Obtenção do núcleo de prova

Para realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes núcleos de prova: $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; $^{111\text{m}}\text{Cd} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; $^{111}\text{Ag} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$; e $^{181}\text{Hf} \rightarrow ^{181}\text{Ta}$.

^{111}Cd : Produto do decaimento por captura eletrônica do núcleo-pai ^{111}In . O ^{111}In é obtido pela irradiação da ^{109}Ag com dêutrons em um acelerador ciclotron. Após a separação química dos átomos de In radioativos da matriz de prata, uma solução de cloreto de índio livre de carregador é obtida com uma concentração extremamente baixa de ^{111}In (traços) [32].

Neste trabalho, o ^{111}In foi utilizado na forma de solução de cloreto de índio e é importado da empresa MS Nordion do Canadá. Esta solução radioativa foi adicionada nas amostras em pequenas quantidades ($10\mu\text{Ci}$).

^{111}Ag : Obtida pela irradiação do ^{110}Pd com nêutrons num reator nuclear. O ^{111}Pd após capturar um nêutron térmico forma o ^{111}Pd que decai para a ^{111}Ag com emissão de um β^- . Após a irradiação é feita a separação química dos átomos de Ag da matriz de Pd, obtendo-se a ^{111}Ag na forma de um complexo diluído em água [52].

Neste trabalho, a ^{111}Ag foi obtida a partir da irradiação do Pd natural por 120 horas num fluxo de nêutrons térmicos da ordem de 5×10^{13} nêutrons/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$) no reator IEA –R1 do IPEN. Após a irradiação do Pd foi realizado o processo de separação e ao final do processo obtém-se uma solução aquosa de Ag^+ .

Tanto o ^{111}In quanto a ^{111}Ag decaem para os níveis excitados do ^{111}Cd . No caso do ^{111}In este decaimento se dá por captura eletrônica populando o nível de 416 keV, que decai para o estado fundamental através da cascata gama-gama 171-245 keV. A ^{111}Ag decai para os níveis do ^{111}Cd pela emissão de um β^- , populando o nível de 342 keV, que decai para o estado fundamental pela cascata gama-gama 96-245 keV. Em ambos os casos o nível intermediário é o mesmo, com meia-vida de 84 ns, spin $5/2^+$ e momento de quadrupolo elétrico $Q = 0,83 \text{ b}$ [32].

$^{111\text{m}}\text{Cd}$: Produzido por meio da irradiação com nêutrons térmicos de ^{110}Cd num reator nuclear. A vantagem deste núcleo é que ele decai para o estado fundamental apenas pela emissão de radiação gama, o que não causa interferências nas ligações químicas do núcleo de prova com a sua vizinhança na amostra. A desvantagem é a sua meia-vida muito curta, de apenas 48 minutos [51].

Neste trabalho, o $^{111\text{m}}\text{Cd}$ foi obtido pela irradiação do cádmio natural por 2 horas num fluxo de nêutrons térmicos da ordem de 5×10^{13} nêutrons/($\text{cm}^2 \cdot \text{s}$) no reator IEA-R1 do IPEN. Depois de irradiado o $^{111\text{m}}\text{Cd}$ foi dissolvido em HNO_3 a 80%.

Figura 19 - Esquema simplificado do decaimento do núcleo de prova $^{181}\text{Hf} \rightarrow ^{181}\text{Ta}$.

As biomoléculas foram marcadas por meio direto, onde o núcleo de prova deve ligar-se a um sítio da mesma.

3. 2 MÉTODO

3. 2. 1 Medidas de CAP

As medidas CAP foram feitas no espectrômetro de correlação angular gama-gama perturbada do Laboratório de Interações Hiperfinais do IPEN.

O espectrômetro visto na figura 20 é composto por 4 detectores cintiladores de fluoreto de bário (BaF_2) associados a um sistema eletrônico para medidas de coincidências γ - γ atrasadas.

Figura 20 - Espectrômetro de CAP com 4 detectores de BaF_2 .

O sistema eletrônico associado ao espectrômetro utiliza configuração lento-rápido, possibilitando a obtenção de 12 espectros de coincidência em tempo, sendo quatro espectros com detectores segundo o ângulo de 180° e 8 espectros para ângulos de 90° . Cada um dos detectores produz sinais de saída para as radiações γ_1 e γ_2 . O esquema da configuração da eletrônica “lento-rápido” está representado na figura 21.

Na saída dos detectores há um dinodo, que fornece um pulso positivo proporcional à energia dos raios gama e um anodo, que produz um sinal que carrega informações relativas ao tempo de chegada dos fótons no detector.

Os pulsos relacionados a estes dois tipos de informação são analisados em dois ramos distintos do sistema eletrônico, o ramo de energia (lento) e o ramo de tempo (rápido), para cada detector do sistema eletrônico.

No ramo lento o sinal de energia extraído do dinodo passa inicialmente por um pré-amplificador (PRE) seguido de um amplificador de espectroscopia (AMP). O sinal de saída é então enviado a dois analisadores monocanais (TSCA) onde são selecionadas as energias da região de interesse do espectro. Assim, cada detector pode dar origem a um sinal de “start” ou “stop” conforme a detecção do primeiro ou segundo gama da respectiva cascata.

No ramo rápido o sinal de tempo vindo do anodo da fotomultiplicadora é processado pelo discriminador de fração constante (CFD), que gera um pulso correlacionado com o instante em que o raio gama é detectado.

A partir dos pulsos gerados nos dois ramos são feitas as coincidências entre o sinal rápido e o sinal lento. Mas, antes de serem feitas as coincidências, o sinal do ramo rápido passa por um atraso através de um DELAY de modo a compensar o intervalo de tempo necessário para a análise do sinal em energia.

O pulso resultante da coincidência entre o sinal lento e o sinal rápido (AND) é então designado como “start” se corresponder à primeira radiação da cascata (γ_1), ou “stop” se corresponder à segunda radiação da cascata (γ_2). Os sinais são então enviados a um conversor de tempo em amplitude (TAC), onde o pulso de saída é proporcional à diferença de tempo entre a chegada dos pulsos de “start” e “stop”.

O sinal de saída do TAC é então enviado para o roteador que o envia para uma das 12 entradas multicomplexas do analisador multicanal (MCA) de acordo com a combinação dos detectores que originaram a coincidência gama. É realizada então a conversão do sinal analógico em digital (ADC) e seu resultado é armazenado em uma

região de memória do MCA. Os dados armazenados em memória dão origem aos 12 espectros de coincidência gama-gama atrasados que depois serão processados para a obtenção dos parâmetros relativos à interação hiperfina [55].

Figura 21 - Esquema simplificado do espectrômetro com quatro detectores.

3. 2. 1. 1 Análise dos dados

Os 12 espectros de coincidências $W(\theta, t)$ acumulados no multicanal em cada medida CAP são tratados pelo software TDPAC que gera uma curva de $A_{22}G_{22}(t)$, dada por uma combinação dos espectros $W(\theta, t)$ [56]:

$$A_{22}G_{22}(t) = 2[C(180^\circ, t) - C(90^\circ, t)] / [C(180^\circ, t) + 2C(90^\circ, t)] \quad (12)$$

onde,

$$C(180^\circ, t) = \sqrt[8]{\prod_{i=1}^8 W_i(180^\circ, t)} \quad \text{e} \quad C(90^\circ, t) = \sqrt[4]{\prod_{i=1}^4 W_i(90^\circ, t)} \quad (13)$$

sendo $W_i(\theta, t)$ os espectros de coincidências para as diversas combinações de detectores nos ângulos $\theta = 90^\circ, 180^\circ$ subtraídos os efeitos devidos a eventos de coincidências acidentais $W_A(t)$: $W_i(\theta, t) = W_i(\theta, t) - W_A(t)$ [57].

A partir da curva de $A_{22}G_{22}(t)$ é possível obter as frequências de transição ω_i , correspondentes ao desdobramento em energia do nível intermediário da cascata gama do núcleo de prova devido à presença do gradiente de campo elétrico originado pela vizinhança eletrônica [32]. Os parâmetros obtidos podem determinar a frequência

quadrupolar (v_Q) e o parâmetro de assimetria do gradiente de campo elétrico (η) que permitem a determinação do valor do V_{ZZ} . Estes resultados relacionam-se as condições de medida (temperatura) e as características das amostras (composição, por exemplo), sendo dessa forma interpretados e discutidos de acordo com as propriedades apresentadas por cada composto estudado.

CAPÍTULO 4

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As medidas de CAP para as amostras foram realizadas a temperatura ambiente (295K) e a temperatura do nitrogênio líquido (77K).

Para a verificação da reprodutibilidade dos resultados, cada amostra foi repetida entre 3 e 5 vezes.

4.2 Amostras marcadas com InCl_3

Acredita-se que as amostras medidas com $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$ a temperatura ambiente e a temperatura do nitrogênio líquido podem ter sofrido o “after-effects” [51] uma vez que os parâmetros hiperfinos obtidos são provenientes do núcleo filho Cd que pode ou não ter mantido sua ligação com a molécula em estudo.

Os valores de λ (frequência de interação dinâmica), apresentados na tabela 2, oferecem uma resposta quanto ao comportamento dinâmico de moléculas em solução. O movimento aleatório dessas moléculas em solução causa uma interferência na medida do GCE do meio, impossibilitando a determinação da frequência de interação quadrupolar e assimetria, caso o tempo de correlação τ_{CR} seja curto com relação o tempo da interação. Já, à temperatura do nitrogênio líquido (77K) foi possível determinar estes parâmetros que se relacionam à estrutura local do sítio do núcleo de prova na molécula. A partir dos parâmetros obtidos, foi possível determinar-se o tempo de correlação (τ_{CR}) para amostras em solução à temperatura ambiente, para o caso em que este seja curto comparado com o tempo da interação hiperfina. Desta forma, baseando-se nos parâmetros obtidos da análise experimental foi possível obter-se (τ_{CR}) a partir das seguintes relações: $\tau_{\text{CR}} = 1/\lambda$, para relaxação lenta e, $\lambda = 2,49\nu_Q^2(1 + \eta^2/3)\tau_{\text{CR}}$, para relaxação rápida [4].

Os parâmetros hiperfinos obtidos no estudo das moléculas de DNA (tabela 2) das diferentes linhagens de camundongos, indicam a divisão em dois grupos,

compreendendo as linhagens A/J, C57BL/6, B6AF1 e BXA1, BXA2 respectivamente. Essa diferença entre os DNA pode estar associada à organização dos pares de bases nitrogenadas ao longo da cadeia do DNA.

Observa-se o valor calculado para o tempo de correlação obtido para a linhagem A/J, parental original susceptível à infecção por *T. cruzi*, é maior do que o dobro observado para os demais DNA. Esse comportamento pode estar relacionado ao fenômeno da recessividade entre seus alelos, responsáveis pela produção de seus anticorpos. Os demais DNA apresentaram basicamente os mesmos valores de τ_{CR} e eles respondem imunologicamente de forma mais satisfatória contra a essa infecção, pois apresentam genes dominantes (em maior ou menor proporção) relacionados à resistência, oriundos da linhagem C57BL/6 que é um parental original resistente [8].

Tabela 2 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelo DNA e pelas bases nitrogenadas marcados com InCl_3 após medidas de CAP.

<i>DNA em solução</i>						
Amostras	295K	77K				$\tau_{\text{CR}} (\times 10^{-11} \text{ s})$
	λ (MHz)	ν_Q (MHz)	η	δ	$V_{zz} (\text{V/m}^2)$ (10^{21})	
A/J	$22,3 \pm 0,6$	$144,9 \pm 11,2$	$0,39 \pm 0,08$	0,27	7,22	$40,6 \pm 0,3$
C57BL/6	$8,7 \pm 0,2$	$147,6 \pm 6,8$	$0,37 \pm 0,06$	0,28	7,36	$15,3 \pm 0,1$
B6AF1	$8,9 \pm 0,2$	$147,6 \pm 5,0$	$0,34 \pm 0,04$	0,24	7,36	$15,7 \pm 0,1$
BXA1	$18,1 \pm 1,1$	$217,3 \pm 6,3$	$0,28 \pm 0,04$	0,28	10,83	$15,0 \pm 0,1$
BXA2	$15,9 \pm 0,6$	$221,8 \pm 7,8$	$0,19 \pm 0,07$	0,29	11,05	$12,8 \pm 0,1$
<i>Bases nitrogenadas em solução</i>						
Adenina	$89,5 \pm 4,7$	$143,2 \pm 6,4$	0,5	0,23	7,14	$161,8 \pm 0,3$
Citosina	$95,2 \pm 3,9$	$146,7 \pm 4,1$	0,5	0,29	7,31	$163,6 \pm 0,3$
Guanina	$57,2 \pm 2,8$	$150,1 \pm 6,7$	0,5	0,28	7,48	$94,1 \pm 0,1$
Timina	$89,2 \pm 4,5$	$139,3 \pm 6,3$	0,5	0,21	6,94	$170,4 \pm 0,2$
<i>Bases nitrogenadas cristalizadas</i>						
Adenina	-	$91,6 \pm 5,2$	0,5	0,42	4,6	-
Guanina	-	$81,3 \pm 4,4$	0,3	0,33	4,1	-

Os espectros de interação hiperfina para DNA em solução aquosa podem ser vistos na figura 22.

Figura 22 - Espectros de interação hiperfina para DNA em solução aquosa marcados com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.

As bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina) isoladas e em solução (tabela 2), apresentaram um comportamento similar entre elas, isso se deve ao fato de que as mesmas possuem oxigênio e nitrogênio em suas composições e os oferecerem como sítio de ligação para o In. Levando em consideração o princípio da eletronegatividade [23], o sítio preferencial para as bases citosina, timina e guanina seria o oxigênio e para a base adenina o nitrogênio.

A tabela 2 mostra também os parâmetros obtidos com as bases nitrogenadas cristalizadas, e o comportamento observado é bastante diferente, considerando-se as mesmas em solução. Por serem cristalizadas não houve necessidade de resfriamento das amostras a 77K para que as mesmas ficassem estáticas e, então, elas foram medidas apenas a 295K. Não foi possível observar interação entre o núcleo de prova e as moléculas de citosina e timina, isso se deve ao fato do núcleo não ter encontrado um sítio ativo para fazer ligação, mesmo elas os oferecendo. Essa ligação se estabeleceria, provavelmente, caso fosse feito tratamento térmico para que o núcleo de prova pudesse se encaixar nas moléculas, mas esse tratamento não foi feito, pois moléculas biológicas têm facilidade para se desnaturar a temperaturas que ultrapassam 40°. A falta de interação do núcleo de prova com essas moléculas pode ser resultado da formação de *clusters* de In de geometria simétrica que resistiram à presença dos ligantes oferecidos. Já as amostras de adenina e guanina apresentaram valores de interações que podem, ainda, estarem relacionados à formação de *clusters* assimétricos.

Os espectros de interação hiperfina típicos para bases nitrogenadas podem ser vistos nas figuras 23 e 24.

Figura 23 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução aquosa marcadas com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.

Figura 24 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas cristalizadas marcadas com ponta de prova ^{111}Cd a 295K.

Quanto às imunoglobulinas, estas apresentaram uma diferença significativa entre os parâmetros hiperfinos encontrados nelas completas e fracionadas.

As imunoglobulinas completas (tabela 3) medidas a 77K apresentam valores de v_Q que indicam pouca diferença entre elas, por apresentarem sítios de ligação comum entre si. Também não podemos descartar a hipótese dos efeitos do “after-effects”. Estas moléculas podem oferecer como sítio de ligação para o núcleo de prova os átomos de nitrogênio (N) e oxigênio (O), presentes nos grupos amina (NH_2) e carboxila (COOH), respectivamente, dos aminoácidos presentes ao longo da proteína. Os espectros de

interação hiperfina típicos para imunoglobulinas completas podem ser vistos nas figuras 25 e 26.

As imunoglobulinas fracionadas (tabela 3), marcadas e medidas nas mesmas condições que as anteriores, apresentaram valores de ν_Q que as diferencia entre si, fato esse que, apesar de poder estar sofrendo interferência do “after-effects”, demonstra e corrobora com a condição de que apesar de serem semelhantes entre si, desencadeiam padrões de resposta imunológica diferentes [8]. Nesse caso, por não apresentarem a porção comum, são menores e mais específicas para cada padrão de resposta imunológica. Os espectros de interação hiperfina típicos para imunoglobulinas fracionadas podem ser vistos nas figuras 27 e 28.

Tabela 3 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelas imunoglobulinas completas e fracionadas marcadas com InCl_3 após medidas de CAP.

<i>Imunoglobulinas completas</i>						
Amostras	295K	77K				τ_{CR} ($\times 10^{-11}$ s)
	λ (MHz)	ν_Q (MHz)	η	δ	V_{zz} (V/m²) (10²¹)	
<i>IgG1</i>	$27,7 \pm 2,2$	$154,6 \pm 2,5$	$0,4$	$0,27$	$7,70$	44,19
<i>IgG2a</i>	$29,2 \pm 2,0$	$150,2 \pm 2,8$	$0,3$	$0,25$	$7,48$	50,47
<i>IgG2b</i>	$23,1 \pm 1,0$	$142,5 \pm 2,5$	$0,4$	$0,29$	$7,10$	43,37
<i>Imunoglobulinas fracionadas</i>						
<i>IgG1</i>	$14,2 \pm 0,4$	$160,1 \pm 4,5$	$0,4$	$0,18$	$7,98$	21,12
<i>IgG2a</i>	$15,6 \pm 0,9$	$172,1 \pm 9,3$	$0,2$	$0,21$	$8,58$	20,87
<i>IgG2b</i>	$15,3 \pm 0,3$	$207,3 \pm 10,5$	$0,3$	$0,19$	$10,33$	13,38

Os espectros de interação hiperfina para imunoglobulinas completas e fracionadas em solução aquosa podem ser vistos nas figuras 25 e 26.

Figura 25 - Espectros de interação hiperfina para imunoglobulinas completas em solução aquosa com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.

Figura 26 - Espectros de interação hiperfina para imunoglobulinas fracionadas em solução aquosa com ponta de prova ^{111}Cd a 295 e 77K.

Os valores apresentados na tabela 4 representam os parâmetros hiperfins obtidos com a água marcada com InCl_3 e como esperado há interação entre a molécula de água e o núcleo de prova. Esse fato corrobora com a literatura [23, 24], pois o In é um ácido duro e a água uma base dura e dessa forma apresentam afinidade química entre si.

Tabela 4 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela água marcada com InCl₃ após medidas de CAP.

Branco						
Amostras	295K	77K				τ_{CR} ($\times 10^{-11}$ s)
	λ (MHz)	ν_Q (MHz)	η	δ	V_{zz} (V/m ²) (10 ²¹)	
Água	14,4 ± 1,7	120,3 ± 15,2	0,8 ± 0,2	0,50±0,02	6,0	32,93

Os espectros de interação hiperfina típicos para água podem ser vistos na figura 27.

Figura 27 - Espectros de interação hiperfina para água com ponta de prova ¹¹¹Cd a 295 e 77K.

Estes resultados mostram, qualitativamente, a existência de interação entre as moléculas estudadas e o núcleo de prova. A variação nos parâmetros observados dependeu do tipo de molécula, mostrando que o núcleo de prova ligou-se de fato as moléculas em solução.

É importante ressaltar que o núcleo pai (In) se ligou a um determinado sítio da molécula estudada, mas os parâmetros hiperfinos obtidos provem do núcleo filho (Cd). O Cd é o responsável pela emissão dos dois gamas sucessivos necessários para a obtenção dos parâmetros hiperfinos pela técnica de CAP.

4. 3 Amostras marcadas com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

Por se tratar de uma técnica versátil no estudo do comportamento das biomoléculas, novas amostras foram confeccionadas com cádmio metálico para obtenção de novos dados. A escolha desse núcleo foi devida as suas características que atendem as necessidades para a realização da técnica de CAP, dentre elas, a presença os dois raios gama em cascata no seu decaimento e o tempo de meia-vida longo o suficiente (48 min) para a obtenção dos parâmetros hiperfinos.

As biomoléculas selecionadas para a realização dos novos experimentos foram as bases nitrogenadas e as imunoglobulinas.

As bases nitrogenadas foram diluídas tanto em água quanto em solução tampão. Seguiu-se o mesmo protocolo que as medidas realizadas com InCl_3 .

Os resultados apresentados abaixo são de amostras de bases nitrogenadas medidas a temperatura do nitrogênio líquido, marcadas de forma direta com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

As amostras marcadas com nitrato de cádmio (tabela 5) não sofreram “after-effects”, uma vez que o cádmio metaestável ($^{111\text{m}}\text{Cd}$) é o próprio emissor dos dois gamas necessários para a obtenção dos parâmetros hiperfinos estudados.

Tabela 5 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelas bases nitrogenadas em água marcadas com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ após medidas de CAP.

<i>Bases nitrogenadas em solução aquosa</i>				
Amostras	77K			
	ν_Q (MHz)	η	δ	V_{zz} (V/m ²) (10 ²¹)
Adenina	$83,5 \pm 2,6$	$0,57 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,02$	4,16
Citosina	$93,3 \pm 4,6$	$0,51 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,02$	4,65
Guanina	$96,8 \pm 3,8$	$0,47 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,03$	4,82
Timina	$84,7 \pm 6,2$	$0,6 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,01$	4,22

<i>Bases nitrogenadas em solução tampão (pH=7)</i>				
Adenina	$88,8 \pm 2,7$	$0,54 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,02$	4,43
Citosina	$82,8 \pm 2,2$	$0,54 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,01$	4,13
Guanina	$84,6 \pm 4,1$	$0,52 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,03$	4,22
Timina	$83,5 \pm 2,2$	$0,57 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,02$	4,16

<i>Bases nitrogenadas cristalizadas</i>				
Adenina	$128,2 \pm 1,7$	0,5	$0,06 \pm 0,01$	6,3

As bases nitrogenadas marcadas com nitrato de cádmio e medidas a 295K, demonstraram um tipo de interação diferente daquela observada com as bases marcadas com InCl_3 (tabela 2). Nessas medidas com nitrato de cádmio (tabela 5), não houve interação dinâmica como observada nas anteriores (tabela 2), onde estão descritos os valores de λ . Os resultados corroboram com a literatura [24], pois o Cd é um ácido mole e tem afinidade por bases moles e as bases nitrogenadas não oferecem sítios de ligação para o cádmio. Nesse caso, as bases nitrogenadas não possuem nem fosfato (P) nem enxofre (S) que seriam sítios para o Cd [23, 24]. O que se observou a 295K pode ser o resultado da formação de *clusters* de Cd simétricos.

Quanto aos parâmetros encontrados com as mesmas amostras medidas a 77K, esses nos mostram um comportamento que pode estar relacionado ao resfriamento imediato que a solução sofre quando é exposta ao nitrogênio líquido. Esse resfriamento

pode provocar uma distorção do *cluster* que se mostrou simétrico a 295K e passou a ser assimétrico a 77K. Essa distorção seria então a explicação para os parâmetros hiperfinos encontrados. Os espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução aquosa podem ser vistos na figura 28.

Figura 28 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução aquosa com ponta de prova ^{111m}Cd a 295 e 77K.

Para melhor interpretar os dados encontrados com as amostras em solução aquosa, foram feitas amostras de bases nitrogenadas em solução tampão pH= 7,0 e marcadas com nitrato de cádmio (tabela 5). Os resultados obtidos corroboraram com os observados anteriormente em solução aquosa, ou seja, não houve interação entre o núcleo de prova e a molécula, pois esta não oferece sítios de ligação para o Cd. Os resultados obtidos a 295K provem provavelmente da formação de *clusters* de Cd simétricos e os resultados a 77K da formação de *clusters* de Cd assimétricos. Os espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução tampão podem ser vistos na figura 29.

Também na tabela 5 estão os resultados das bases nitrogenadas cristalizadas marcadas com Cd. A amostra de adenina apresentou parâmetros hiperfinos que provavelmente também estejam associados a formação de *clusters* de Cd assimétricos. As demais bases não apresentaram interação com o núcleo de prova, pois como esperado, não apresentam sítios de ligação específicos para o Cd, corroborando com os demais resultados das amostras de bases nitrogenadas marcadas com esse núcleo de prova. Os espectros de interação hiperfina típicos para bases nitrogenadas cristalizadas que apresentaram e não apresentaram interação com o núcleo de prova podem ser vistos respectivamente na figura 30.

Figura 29 - Espectros de interação hiperfina para bases nitrogenadas em solução tampão com ponta de prova ^{111}mCd a 295 e 77K.

Figura 30 - Espectro de interação hiperfina para bases nitrogenadas cristalizadas com ponta de prova ^{111m}Cd a 295K.

Para a solução tampão marcada com Cd (tabela 6), os parâmetros hiperfinos encontrados mostram que houve interação entre o núcleo de prova e as moléculas presentes na solução. Esses dados corroboram com a literatura porque o Cd tem afinidade química com o fosfato (P) presente na solução [23, 24].

Tabela 6 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela solução tampão marcada com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ após medidas de CAP.

<i>Branco</i>				
Amostra	77K			
	ν_Q (MHz)	η	δ	V_{zz} (V/m ²) (10 ²¹)
Solução tampão	$85,9 \pm 2,6$	$0,54 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,02$	4,28

Os espectros de interação hiperfina típicos para solução tampão podem ser vistos na figura 31.

Figura 31 - Espectros de interação hiperfina para solução tampão com ponta de prova ^{111}mCd a 295 e 77K.

Para ampliar a obtenção de dados foram selecionadas imunoglobulinas completas e fracionadas para a realização de novos experimentos. Elas foram diluídas em água e seguiu-se o mesmo protocolo que as medidas realizadas com InCl_3 .

Os resultados apresentados na tabela 7 são de amostras de imunoglobulinas completas e fracionadas medidas a temperatura do nitrogênio líquido, marcadas de forma direta com nitrato de cádmio.

Tabela 7 - Parâmetros hiperfinos mostrados pelas imunoglobulinas completas e fracionadas marcadas com $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ após medidas de CAP.

<i>Imunoglobulinas completas</i>				
Amostras	77K			
	ν_Q (MHz)	η	δ	V_{zz} (V/m²) (10²¹)
<i>IgG1</i>	86,17 ± 4,7	0,39 ± 0,07	0,34 ± 0,03	4,29
<i>IgG2a</i>	80,71 ± 2,5	0,53 ± 0,04	0,25 ± 0,02	4,02
<i>IgG2b</i>	87,94 ± 2,9	0,37 ± 0,04	0,25 ± 0,02	4,38
<i>Imunoglobulinas fracionadas</i>				
<i>IgG1</i>	92,5 ± 2,7	0,45 ± 0,03	0,21 ± 0,02	4,46
<i>IgG2a</i>	83,8 ± 2,8	0,59 ± 0,06	0,29 ± 0,02	4,17
<i>IgG2b</i>	86,3 ± 2,5	0,47 ± 0,04	0,25 ± 0,02	4,30

As amostras de imunoglobulinas completas marcadas com nitrato de cádmio e medidas a 77K (tabela 7) obtiveram valores de ν_Q que mostraram ser diferentes os sítios de ligação para o núcleo de prova Cd quando comparadas com as mesmas amostras medidas com In. Dessa forma, apresentam como sítio de ligação para o núcleo de prova os átomos de enxofre presentes ao longo de toda a sua estrutura. Esses resultados corroboram com a literatura, pois ácidos moles como o Cd, têm afinidade por bases moles como o enxofre (S) [23, 24]. O espectro de interação hiperfina típico para imunoglobulinas completas em solução tampão pode ser visto na figura 32.

Figura 32 - Espectro de interação hiperfina para imunoglobulinas completas com ponta de prova ^{111}mCd a 77K.

As imunoglobulinas fracionadas apresentaram valores de v_Q (tabela 7) que mostraram que há diferenças entre elas, corroborando, mais uma vez, com o fato de que apesar de serem bastante semelhantes entre si, essas pequenas diferenças podem ser responsáveis pelos padrões de resposta imunológica diferentes por elas apresentados [8]. Imunoglobulinas IgG1 são responsáveis por respostas imunológicas alérgicas e imunoglobulinas IgG2a e IgG2b, são responsáveis por respostas imunológicas celulares [5]. Quanto aos sítios de ligação para o Cd, são os mesmos das imunoglobulinas fracionadas, ou seja, os átomos de enxofre (S). O espectro de interação hiperfina típico para imunoglobulinas fracionadas em solução tampão pode ser visto na figura 33.

Figura 33 - Espectro de interação hiperfina para imunoglobulinas fracionadas com ponta de prova ^{111}mCd a 77K.

Os parâmetros hiperfinos encontrados pelas amostras de água (tabela 8) medidas com Cd apresentaram comportamento similar às bases nitrogenadas, ou seja, não há sítio de ligação específico para o este núcleo de prova na molécula estudada e os parâmetros encontrados são resultado da formação de *clusters* de Cd assimétricos. Os espectros de interação hiperfina típicos para água podem ser vistos na figura 34.

Tabela 8 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela água marcada com Cd(NO₃)₂ após medidas de CAP.

<i>Branco</i>				
Amostras	77K			
	ν_Q (MHz)	η	δ	V_{zz} (V/m ²) (10 ²¹)
Água	98,1 ± 2,8	0,39 ± 0,03	0,22 ± 0,02	4,89

Os espectros de interação hiperfina típicos para água podem ser vistos na figura 34.

Figura 34 - Espectro de interação hiperfina para água com ponta de prova ^{111m}Cd a 295 e 77K.

4. 4 Amostras marcadas com HfF₄

As biomoléculas selecionadas para a realização dos novos experimentos foram as imunoglobulinas. Elas foram diluídas em água a seguiu-se o mesmo protocolo que as medidas realizadas com InCl₃ e Cd(NO₃)₂.

Os resultados para as amostras medidas com ¹⁸¹Ta não foram considerados satisfatórios. O háfnio (Hf) formou um complexo com as moléculas de flúor (F) oriundas da preparação da amostra quando dissolvida em ácido fluorídrico. Dessa forma, os resultados obtidos não são da interação entre o núcleo de prova e a molécula e

sim do complexo formado entre o háfnio e o flúor [58]. Os espectros de interação hiperfina típicos para imunoglobulinas completas podem ser vistos na figura 35.

Figura 35 - Espectros de interação hiperfina para imunoglobulinas completas com ponta de prova ^{181}Ta a 295K.

4. 5 Amostras marcadas com Ag^+ .

As biomoléculas selecionadas para a realização dos novos experimentos foram as bases nitrogenadas. Elas foram diluídas na solução final da prata após sua separação do paládio.

Os resultados apresentados na tabela 9 são da amostra da base nitrogenada timina medida a temperatura do nitrogênio líquido, marcada de forma direta com Ag^+ .

Tabela 9 - Parâmetros hiperfinos mostrados pela base nitrogenada timina marcada com Ag^+ após medidas de CAP.

<i>Timina a 77 K</i>				
Sítio	Fração(%)	ν_Q (MHz)	η	δ
1	27	$10,9 \pm 2,6$	0,04	-
2	73	$112,02 \pm 44,5$	-	$0,36 \pm 0,02$

Os parâmetros hiperfinos encontrados com a amostra da base nitrogenada timina (tabela 9) medidas com Ag apresentaram comportamento similar às bases nitrogenadas marcadas com Cd, ou seja, não há sítio de ligação específico para o este núcleo de prova na molécula estudada. A prata é um ácido mole e os sítios de ligação na timina que seriam o oxigênio ou o nitrogênio são bases duras [23, 24], portanto, não há afinidade química entre o núcleo de prova e a timina. Os parâmetros encontrados podem ser resultado da formação de *clusters* de Ag assimétricos. O espectro de interação hiperfina para base nitrogenada timina pode ser visto na figura 36.

Figura 36 - Espectro de interação hiperfina para timina com ponta de prova ^{111}Ag a 77K.

4. 6 Cálculos ab initio de interações entre Cd e bases nitrogenadas do DNA

Ao presente estudo foi acrescentado os resultados dos cálculos teóricos que foram desenvolvidos no Instituto de Física da USP (IF-USP), pelo aluno Philippe Alexandre Divina Petersen, orientando da Professora Dra. Helena Maria Petrilli, intitulado “Cálculos ab initio de interações entre Cd e bases nitrogenadas do DNA”.

O estudo apresentou resultados das interações hiperfinas do íon metálico Cd com as bases nitrogenadas. Nesses cálculos foram simuladas interações diretas entre o íon Cd a as bases nitrogenadas através da inserção do metal diretamente nos sítios mais reativos das bases. A metodologia utilizada para a realização destes cálculos está descrita na referência [59].

Seguem na tabela 10 as respectivas comparações entre os dados teóricos e experimentais.

Analisando-se os dados das tabelas, percebe-se que não foi possível estabelecer uma sistemática entre os valores de η teórico e experimental, pois este é um parâmetro muito sensível a interações de longo alcance e depende da simetria da molécula. Porém, nota-se que os valores de V_{zz} teóricos e experimentais se encontram na mesma ordem de grandeza. Ocorreu variação dos valores de V_{zz} de acordo com o número de coordenação apresentado pelo Cd ao interagir com a base nitrogenada [59].

Tabela 10 - Parâmetros obtidos com o código CP-PAW e com a técnica CAP para as bases nitrogenadas [59].

Obtenção	Processo	$V_{zz}(10^{21}\text{V/m}^2)$	η
Adenina			
CP-PAW	$[\text{Cd}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5)(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$	9,56	0,48
	$[\text{Cd}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5)(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$	7,14	0,94
CAP	$^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$	7,13	0,52
Citosina			
CP-PAW	$[\text{Cd}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$	5,22	0,14
	$[\text{Cd}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	8,33	0,50
CAP	$^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$	7,31	0,51
Guanina			
CP-PAW	$[\text{Cd}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$	11,74	0,61
	$[\text{Cd}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$	4,83	0,52
	$[\text{Cd}(\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O})(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$	5,80	0,90
CAP	$^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$	7,47	0,58
Timina			
CP-PAW	$[\text{Cd}(\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$	7,08	0,30
CAP	$^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$	6,94	0,58

CAPÍTULO 5

5.1 CONCLUSÕES

- A técnica de CAP foi bastante versátil no estudo das interações entre o núcleo de prova e o material biológico. Porém, os parâmetros apresentados não nos permitiram selecionar regiões específicas dos DNA que nos indicassem as possíveis diferenças entre eles e sua relação com a produção de imunoglobulinas. Dessa forma, não foi possível distinguir por meio dessa técnica quais regiões dos DNA seriam responsáveis pela produção de maior ou menor quantidade de imunoglobulinas dentre os tipos que se manifestam quando os camundongos são infectados pela cepa Y de *T. cruzi*.

5.1.1 Conclusões para as amostras marcadas com $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$.

- A análise dos resultados das amostras medidas com $^{111}\text{In} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$ nos permite dizer que as amostras medidas a temperatura ambiente e a temperatura do nitrogênio líquido podem ter sofrido o “after-effects”. E os parâmetros hiperfinos obtidos são provenientes do núcleo filho Cd.

- Foi possível identificar por meio dos valores de v_Q , dois grupos distintos entre os DNA sendo que essa diferença pode estar associada à organização dos pares de bases nitrogenadas ao longo da cadeia desses DNA. E por meio do cálculo do τ_{CR} foi possível identificar uma diferença significativa entre o DNA da linhagem A/J e dos demais (C57BL/6, B6AF1, BXA1 e BXA2), sendo que esse comportamento pode estar relacionado ao fenômeno da recessividade entre seus alelos no DNA do A/J e a dominância, em maior ou menor proporção, entre os alelos dos demais. Os sítios de ligação preferenciais para o núcleo de prova In nas moléculas de DNA foram os átomos de oxigênio e nitrogênio.

- Foi possível identificar diferenças significativas entre as imunoglobulinas completas e fracionadas apesar delas apresentarem os mesmos sítios de ligação para o núcleo de prova In, os átomos de oxigênio e nitrogênio. Porém, o estudo das imunoglobulinas fracionadas que são mais específicas, apresentaram valores de v_Q que

as diferenciam grandemente e esse comportamento corrobora com a condição de que apesar de serem semelhantes entre si, desencadeiam padrões de resposta imunológica diferentes.

- Com o estudo das bases nitrogenadas isoladas e em solução foi possível observar um comportamento similar entre elas, pois oferecerem os mesmos sítios de ligação para o In, oxigênio e nitrogênio, exceto a adenina que não possui oxigênio em sua composição, mas possui nitrogênio. Já as bases nitrogenadas cristalizadas apresentaram resultados que podem ter sido da formação de *clusters* de In simétricos ou assimétricos e não da interação do núcleo de prova com a molécula estudada.

Por fim, os resultados obtidos com a água marcada com InCl_3 obedeceram a condição esperada, onde houve interação entre a molécula de água e o núcleo de prova porque o In é um ácido duro e a água uma base dura e dessa forma apresentam afinidade química entre si.

5. 1. 2 Conclusões para as amostras marcadas com $^{111\text{m}}\text{Cd} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$.

- O $^{111\text{m}}\text{Cd}$ não foi uma boa escolha para o estudo das bases nitrogenadas, uma vez que as mesmas não apresentam sítios de ligação potenciais para este núcleo. Os resultados obtidos podem ter sido da formação de *clusters* de Cd simétricos ou assimétricos.

- Houve interação entre o núcleo de prova e as moléculas presentes na solução tampão. O sítio de ligação para o Cd nessas moléculas foi o fosfato (P). Esses dados corroboram com a literatura porque o Cd é um ácido mole e o fosfato uma base mole apresentando afinidade química entre si.

- As imunoglobulinas completas e fracionadas apresentaram como sítios de ligação para o Cd os átomos de enxofre (S). Mas, mesmo oferecendo os mesmos sítios de ligação, as imunoglobulinas fracionadas apresentaram resultados que corroboram com o fato de que apesar de serem bastante semelhantes entre si, desencadeiam padrões de resposta imunológica diferentes.

- As amostras de água medidas com Cd apresentaram comportamento similar às bases nitrogenadas, ou seja, não houve sítio de ligação específico para o núcleo de prova na molécula estudada e os parâmetros encontrados podem ter sido resultado da formação de *clusters* assimétricos de Cd.

5. 1. 3 Conclusões para as amostras marcadas com $^{181}\text{Hf} \rightarrow ^{181}\text{Ta}$.

O háfnio formou um complexo com as moléculas de flúor oriundas da preparação da amostra quando dissolvida em ácido fluorídrico e assim, os resultados obtidos não são da interação entre o núcleo de prova e a molécula, mas sim desse complexo que se formou.

5. 1. 4 Conclusões para as amostras marcadas com $^{111}\text{Ag} \rightarrow ^{111}\text{Cd}$.

Não houve interação entre a base nitrogenada timina e o núcleo de prova Ag porque não há sítio de ligação específico para o este núcleo de prova na molécula estudada. Os parâmetros encontrados podem ter sido resultado da formação de *clusters* de Ag assimétricos.

5. 1. 5 Conclusões para os cálculos ab initio de interações entre Cd e bases nitrogenadas do DNA

É importante ressaltar que os dados experimentais provem da interação do In que decai para o Cd com as bases nitrogenadas e os dados teóricos da inserção do Cd diretamente. Dessa forma, seria interessante um estudo teórico onde o In fosse inserido no complexo e posteriormente trocado pelo Cd.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. HARRINGTON, C. A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Curr. Opin. Microbol.**, 3:285–291, 2000.
2. FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and pontential. **Biotechniques**, 26:112–122, 1999.
3. BAUER, R., LIMKILDE, P., GLOMSET, O., Metal site structure in a protein studied by differential perturbed angular correlations. **Phys. Rev. Lett.** 32, 340-342, 1974.
4. HEMMINGSEN, L., SAS, K.N., DANIELSEN, E., Biological Applications of Perturbed Angular Correlations of γ -Ray Spectroscopy. **Chem. Rev.** 104, 4027-4061, 2004.
5. SHARP, M; Manual Merch: **Saúde para a família. Biologia do Sistema Imune**, 2004. Cap. 167.
6. ALBERTS, B. **Molecular biology of cell**. 3. ed. New York: Gerland, 1994.
7. CAMPBELL, M. K. Bioquímica. 3º ed. São Paulo: Artmed, 2006.
8. SILVA, A. S. **Avaliação do padrão de resposta de imunoglobulinas em diferentes linhagens de camundongos frente à infecção por *T. cruzi***. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.
9. ALBARRACIN, H. V.; CARVALHO, M. E.; NASCIMENTO, E. M. M.; RODRIGUES, V. L. C. C.; CASANOVA, C. & BARATA, J. M. S. Chagas disease in areas of recent occupation in Cochabamba, Bolívia. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, 33:201-207, 1999.
10. AVILA, H.; PEREIRA, B. J.; THIEMANN, O.; PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, M. C. & SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimes of chronic chagasic patients by: Polimerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. **J. Clin. Microbiol**, 31: 2421-2426, 1993.
11. CASTRO, L. P.; CUNHA, A. S.; REZENDE, J. M. **Protozooses humanas**. São Paulo: Fundo Editorial BYK., p. 38-67, 1994.
12. NEVES, J. **Diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., p. 694-722, 1983.
13. WHO. **Global defense against the infectious disease threat**. Ed. Mary Kay Kindhauser. World Health Organization, Geneve, 2003.
14. TEIXIERA, A.T. **Doença de Chagas e outras doenças por Tripanossomos**. Ed. Universidade de Brasília, 1987, p.15-89.
15. PASSOS, L. A. C. **Análise do determinismo Genético da resistência de camundongos infectados experimentalmente com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi***. 2003. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Campinas.
16. BITTENCOURT, A. L. **Actual aspect and epidemiological significance of congenital transmission of Chagas' disease**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1984; 79 (supl.) 133-137.
17. PASSOS, L.A.C.; SAKURSDA, J.; GUARALDO, A.M.A.; ORTIZ, S.C.B.C.; RANGEL, H.A.; GUENET, J. L. Chagas: Fenômeno da Resistência. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. (5): 26-31, 2002.
18. GODARD, A.L.B.; GUENET, J. L. Genética de camundongos: modelos animais de doenças humanas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 2 (9): 96-100, 1999.

19. SOUZA, G. R. L. **Construção de uma biblioteca de anticorpos (scFv) apresentadas em fagos para seleção, análise e caracterização de antígenos do carrapato bovino (*Boophilus microplus*)**. 2007. Tese (Doutorado). Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.
20. BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Biochemistry*. 6th. W. H. Freeman and Company. 2006.
21. FERNANDES, G. G.; ASSUMPÇÃO, C. R. F.; SILVEIA, E. L.; FAQUIN-MAURO, I.; TANJONI, A. K.; CARMONA, M. F. M.; ALVES, H. A.; TAKEHARA, A.; RUCAVADO, O. H. P.; RAMOS, A. M.; MOURA-DASILVA, J. M. G. Immunological and biological characterization of monoclonal antibodies against BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon** 56 (2010) 1059-1065.
22. FERREIRA, A. P., TEIXEIRA, H. C. **Tópicos de imunologia básico**. Juiz de Fora, 83p, 2005.
23. LEE, J.D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5^a Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1999.
24. MAIA, E. C. P., DEMICHELI, C. P. **Química de coordenação em sistemas biológicos**. In. FARIAS, R. F. Química de coordenação – fundamentos e atualidades. Campinas: Editora Átomo, 2005, 157-193.
25. BENITE, A. M. C., MACHADO, S. P., BARREIRO, E. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 8, 2062-2067, 2007.
26. O'CONNOR, R. **Fundamentos de química**. São Paulo: Harbra, 1977.
27. CHISHOM, M. **A vestimenta dos íons metálicos: a química de coordenação na virada do milênio**. In. HALL, N. **Neoquímica**. Porto Alegre: Bookman, 2004, 105-120.
28. HADJILIADIS, N. and SLETTEN, E. **Metal complex-DNA interactions**. Blackwell Publishing Ltda. 2009.
29. FALK, F.; A. LINNFORS.; THUN, J. E. A search for after-effects of the ¹¹¹In EC decay on the ¹¹¹Cd $\gamma\gamma$ correlation. **Nuclear Physics A**152 305-316, 1970.
30. BERTOTTI, M. **Estudos potenciométricos sobre a formação de complexos entre Índio (III) e azoteto, em meio aquoso**. 1986. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo.
31. ALDOUS, D. W. **Solvothermal chemistry of early transition metal fluorides**. 2008. Thesis Submitted for the Degree of PhD at the University of St. Andrews, Escócia.
32. SCHATZ, G. WEIDINGER, A. **Nuclear condensed matter physics: nuclear, methods and applications**. ed. J. Wiley & Sons, 1992.
33. LEIPERT, T. K., BALDESCHWIELER, J.D., SHIRLEY, D.A., Applications of gamma ray angular correlations to the study of biological macromolecules in solutions, **Nature** 200, 907-909, 1968.
34. MEARES, C. F. , BRYANT, R. G., BALDESCHWIELER, J. D., SHIRLEY, D. A., Study of carbonic anhydrase using perturbed angular correlations of gamma radiation. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 64, 1155-1161, 1969.
35. BAUER, R., LIMKILDE, P., JOHANSEN, J. T., Low and high pH form of cadmium carbonic anhydrase determined by nuclear quadrupole interaction. **Byochemistry** 15, 335-342, 1976.
36. BAUER, R., JENSEN, S. J., SCHMODT-NIELSEN, B., The angular overlap model applied to the calculation of nuclear quadrupole interactions, **Hyperfine Interactions** 39, 203-234, 1988.

37. BAUER, R., Perturbed angular correlation spectroscopy and its application to metal sites in proteins: possibilities and limitations. **Quarterly Review Biophysics**, 18, 1-64, 1985.
38. TROGER, W. and BUTZ, T., Inorganic biochemistry with short-lived radioisotopes as nuclear probes. **Hyperfine Interact.** 129, 511-527, 2000.
39. BUTZ, T. Analytic perturbation function for static interaction in perturbed angular correlations of γ -rays, **Hyperfine Interactions** 52, 189-228, 1989.
40. DUNWORTH, J. D. The application of the coincidence counting to experiments in nuclear physics. **Nucl. Instrum. Meth.**, v. 11, p. 167-80, 1940.
41. HAMILTON, D. R. On directional of successive quanta. **Phys. Ver.**, v. 58, p. 122-131, 1940.
42. GOERTZEL, G. Angular correlação of gamma-rays. **Phys. Ver.**, v. 70, p. 897-909, 1946.
43. FRAUENFELDER, H. Influence of the atomic shell on nuclear angular correlation. **Phys. Rev.** v. 82, p. 549-550, 1951.
44. AEPPLI, H.; BISHOP, A. S.; FRAUENFELDER, H.; WALTER, M.; ZUNTI, W. Influence of the atomic shell on nuclear angular correlation in ^{111}Cd . **Phys. Rev.** v. 82, p. 550-551, 1951.
45. ABRAHAM, A.; POUND, R. V. **Influence of electric and magnetic fields on angular correlations.** **Phys. Rev.** 92, 943-962, 1953.
46. RINNEBERG, H.H. Application of perturbed angular correlations to chemistry and related areas of solid state physics. **Atomic Energy Ver.**, 17: 477-595, 1979.
47. BUTZ, T. Analytic perturbation function for static interaction in perturbed angular correlations of γ -rays, **Hyperfine Interactions** 73, 387, 1992.
48. WICHERT, T.; ACHTZIGER, N.; METZNER, H.; SIELEMANN, R. **"Perturbed angular correlation" in hyperfine interaction of defects in semiconductors.** Elsevier Science Publishers B.V., 1992 p.78.
49. AKSELROD, Z. Z.; KOMISSAROVA, B. A.; RYANY, G. K., SHIRANI, E. N.; SHPINKOVA, L. G.; SOROKIN, A. A.; KULAKOV, V. N.; NIKITIN, S. M.; SHIROKOV, A. N.; ERMOLENKO, S. G. Time-differential perturbed angular correlation studies of In-complexes used in nuclear medicine, **J. Radianal. Nucl. Chem., Letters**, 199, 5, 357-364, 1995.
50. CEOLIN, M.; MARTINEZ, J. A.; ERMÁCORA, M. R. Time differential perturbed angular correlation of ^{111}In -EDTA linked to the single free cystine of bovine serum albumin, **J. Biochem. Biophys. Methods**, 35, 135-140, 1997.
51. SHPINKOVA, L. G., CARBONARI, A. W., NIKITIN, S. M. and MESTNIK-FILHO, J. Influence of electron capture after-effects on the stability of $^{111}\text{In}(^{111}\text{Cd})$ -complexes with organic ligands. **Chemical Physics** 279 (2002) 255-267.
52. ALBERTO, R., BLAUENSTEIN, P., NOVAK-HOFER, I., SMITH, A., SCHUBIGER, P. A. An improved method for the separation of ^{111}Ag from irradiated natural palladium. **Appl. Radiat. Isot.** Vol. 43, N°. 7, pp. 869-872, 1992.
53. MACGONWAN, F.K. Angular correlations of gamma rays in ^{181}Ta . **Phys. Rev.**, 93: 471-7, 1961.
54. GRABOWKI, Z.; PETTERSSON, B.G.; GERHOLM, T. R.; THUM, J.E. Penetration matrix elements and nuclear structure effects in ^{181}Ta . **Nucl. Phys.**, 24: 251-68, 1961.

55. KOHN, W., SHAM, L.J., Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Phys. Rev.** 140, 1133, 1965.
56. MESTNIK, J. F. Tratamento de dados de correlação angular perturbada. **Comunicação privada**, 2002.
57. ARENDS, A. Data reduction methodology of perturbed angular correlation experiments. **Hyperfine Interactions**, v.8, p. 191-213, 1980.
58. AMARAL, A. A. **Aplicação da espectroscopia de correlação angular perturbada na investigação de interações hiperfinas em compostos de háfnio, índio e cádmio com os ligantes F1-, OH1- e EDTA**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP, São Paulo.
59. PETERSEN, P. A. D. **Cálculos ab initio de interações entre Cd e bases nitrogenadas do DNA**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo.