

BR 9127470
INIS-BR... 2705

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

**INFLUÊNCIA DO DIETILMALEATO NA SOBREVIVÊNCIA DE
CAMUNDONGOS IRRADIADOS E A NÍVEL DE
PROTEÍNAS SÉRICAS**

ELIANE BERNARDES

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

ORIENTADORA: Dra. Nélida Lúcia Del Mastro

**SÃO PAULO
- 1990 -**

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

**INFLUÊNCIA DO DIETILMALEATO NA SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS
IRRADIADOS E A NÍVEL DE PROTEÍNAS SÉRICAS**

ELIANE BERNARDES

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para ob-
tenção do grau de Mestre em
Tecnologia Nuclear.

ORIENTADORA: Dr^a Nélida Lúcia Del Mastro

**SÃO PAULO
1990**



Aos meus pais
José Américo e Vilma
Dedico

Aos amigos que,
compartilharam comigo as alegrias
da descoberta e as lutas perante
os obstáculos durante a realização
deste trabalho

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível a realização do presente trabalho e, particularmente:

À Dr^ª *Nélida Lúcia Dei Mastro*, pelo relevante papel exercido em minha formação profissional, orientação desta dissertação, ensinamentos, estímulo e amizade.

A *Antonio Soares de Gouveia* e sua equipe, em particular à *Vanda Khatounian de Moraes*, chefe do CPD deste Instituto, pela programação e processamento de dados.

À Dr^ª *Vânia Caira Borghi*, pela sua ajuda, permitindo o uso do microcomputador a ela cedido pelo CNPq.

Aos colegas do Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas, pela valiosa colaboração e apoio constante na execução deste trabalho.

Às Entidades que tornaram possível esta dissertação:

- . Universidade Federal de Santa Catarina — UFSC/SC
- . Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares — IPEN/CNEN-SP
- . Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior — CAPES/PICD

INFLUÊNCIA DO DIETILMALEATO NA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS IRRADIADOS E A NÍVEL DE PROTEÍNAS SÉRICAS

ELIANE BERNARDES

RESUMO

A glutatona (GSH) é o principal composto sulfidrílico de baixo peso molecular das células vivas vegetais ou animais e é o mais importante radioprotetor celular endógeno. Como uma das abordagens para otimização da radioterapia, vem sendo testada a administração de radiosensibilizadores de células hipóxicas conjuntamente com depletors da glutatona intracelular como, por exemplo, o agente bloqueador dietilmaleato (DEM), na tentativa de contornar os efeitos neurotóxicos colaterais, mas preservando as propriedades radiosensibilizadoras. O presente estudo foi realizado para investigar se somente a administração de DEM poderia modificar a radioresistência de camundongos, medida pela sobrevida durante 30 dias após a irradiação e estabelecer se essa modificação pode ser refletida nos perfis de proteínas séricas. O DEM, em concentrações milimolares, foi dissolvido alternadamente, em óleo de amendoim comercial ou álcool absoluto (concentração final 0,27%) e administrado intraperitonealmente a camundongos albinos, machos ou fêmeas, 1h antes da irradiação de corpo inteiro, com 9 Gy de ^{60}Co , com uma taxa de dose média de 5,2 Gy/min. Foram estabelecidas as curvas de peso corporal e de sobrevida durante um período de 30 dias após a irradiação. Os perfis de proteínas séricas totais, albumina, alfa, beta e gama globulinas foram analisados 1h, 3 a 7 dias após os tratamentos. Os diluentes do DEM apresentaram, por sua vez, comportamento radiomodificador quando administrados sozinhos; o óleo de amendoim agiu como radioprotetor e a solução etanólica produziu um efeito sensibilizador nas fêmeas, mas um efeito radioprotetor nos camundongos machos. O DEM mostrou ação radiosensibilizadora quando foi injetado diluído em óleo de amendoim, mas não quando aplicado diluído em solução etanólica. As concentrações das frações de proteínas séricas obtidas por eletroforese em papel, apresentaram poucas alterações estatisticamente significativas além daquelas produzidas em consequência da radiação, o que confirma parcialmente, dados de outros autores. Nas condições apresentadas não houve correlação entre as modificações na sobrevida e os níveis de proteínas séricas.

INFLUENCE OF DIETHYLMALEATE ON THE SURVIVAL OF IRRADIATED MICE AND ON SERUM PROTEIN LEVELS

ELIANE BERNARDES

ABSTRACT

Glutathione (GSH) is the major of the living plants or animal cell low molecular weight thiol compound which serves as a main endogenous cellular radioprotector. In order to improve radiotherapy, a possible approach should be to try to administrate hypoxic cell radiosensitizers altogether with glutathione intracellular depletors, for example, a binding GSH agent like diethylmaleate (DEM), in an attempt to overcome the neurotoxic side effects while maintaining their radiosensitizing properties. This study was performed to investigate whether the administration of DEM alone could modify the radioresistance of mice as measure by the 30-day-survival after irradiation and to establish whether this modification can be reflected in the murine serum protein profiles. Millimolar concentrations of DEM were dissolved alternatively in commercial peanut oil or absolute ethanol (final concentration 0.27%) and administered to male or female albino mice ip 1h prior to 9 Gy ⁶⁰Co whole-body irradiation with an average dose rate of 5.2 Gy/min. Body weight and survival curves were set up during a period of 30 days after irradiation. Total serum protein, albumin, α_1 - α_2 - β and γ globulins profiles were analyzed 1h, 3 and 7 days after treatments. Both vehicles of DEM showed radiomodifier behavior by themselves when administered alone: peanut oil acted as radioprotector and diluted alcohol solution produced a sensitizing effect on female but a radioprotecting effect on male mice. DEM showed a radiosensitizing action when injected diluted in peanut oil but failed to behave in that way when applied diluted in ethanol solution. The concentrations of paper electrophoretic fractions of serum proteins presented few statistically significant alterations besides those produced as a consequence of irradiation what confirms partially data already published by others. In the present conditions no correlation had been found between survival modifications and serum protein patterns.

ÍNDICE

	PÁG.
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	08
2.1 GLUTATIONA	08
2.1.1 Definição e Função	08
2.1.2 Distribuição e Regulação	09
2.1.3 Agentes que modificam os níveis de GSH	14
2.2 PROTEÍNAS SÉRICAS, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	21
3.2 TRATAMENTO COM DIETILMALEATO (DEM)	21
3.2.1 Óleo de Amendoim	22
3.2.2 Álcool Etílico	22
3.3 IRRADIAÇÃO	23
3.4 CURVAS DE SOBREVIDA E PESO	23
3.5 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS TOTAIS	23
3.5.1 Eletroforese em acetato de celulose	23
3.5.2 Determinação da Proteína Total	25
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
3.7 REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS	28
4. RESULTADOS	29
4.1 INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM DEM DILUÍDO EM ÓLEO DE AMENDOIM	29
4.1.1 Curvas de Sobrevida	29
4.1.2 Curvas de Peso Médio Corporal	31
4.1.3 Análise das Proteínas Séricas (DEM 0,418 mM)	33
4.1.4 Análise das Proteínas Séricas (óleo de amendoim)	38

4.2 TRATAMENTO COM DEM DILUÍDO EM SOLUÇÃO	
ÁLCOOL ETÍLICO	41
4.2.1 Curvas de Sobrevida	41
4.2.2 Curvas de Peso Médio Corporal	43
4.2.3 Análise das Proteínas Séricas	45
4.2.4 Análise das Proteínas Séricas (álcool etílico)	49
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
APÊNDICE	71

1

INTRODUÇÃO

A utilização das radiações ionizantes nos diferentes campos da atividade humana, tem sido objeto de muitos estudos, pois tanto podem ser úteis na preservação da vida como causar danos, que na maioria das vezes são irreversíveis.

Os estudos dos efeitos da radiação tiveram seu início com a descoberta dos raios X. Esses efeitos atuam nos mais diversos níveis de constituição de um organismo. As alterações morfológicas e funcionais de órgãos e sistemas com repercussão para o organismo como um todo, são decorrentes de alterações bioquímicas produzidas nas organelas celulares.

A lesão induzida pela radiação é conseqüência da absorção de energia pelas biomoléculas. Podemos definir dois mecanismos pelos quais a radiação pode lesar uma molécula: mecanismo direto e indireto. No mecanismo direto, a molécula recebe energia diretamente da radiação incidente por meio da ionização e excitação, ou seja, a energia da radiação é transmitida a uma determinada estrutura biológica, lesando-a, e o produto leva a perda de sua função biológica. O mecanismo indireto é especialmente importante em sistemas aquosos, nos quais a molécula de água pode ser ionizada e posteriormente transferir a energia adquirida para outra molécula.

As radiações ionizantes incluem radiações eletromagnéticas, que são os raios X e gama e as consideradas particula-

das ou corpusculares, tais como alfa, beta, elétrons, pósitrons, nêutrons e prótons. A absorção da energia das radiações ionizantes nas células envolve a ionização dos átomos e a produção de íons dentro da célula (CASARET, 1980).

As radiações ionizantes ao interagirem com a matéria que compõe os sistemas biológicos formam espécies químicas reativas, dotadas de elétrons não pareados, denominados radicais livres (BACQ & ALEXANDER, 1966). A ionização não é um processo seletivo, pode ionizar qualquer átomo ou molécula. A transformação de átomos em íons leva a provocar profundas repercussões de ordem química, que por sua vez, acarretam os efeitos biológicos, modificando a sua estrutura e propriedade (FREIRE et al, 1972). De 70 a 80% da massa celular é constituída por água, sendo os outros componentes sais inorgânicos e compostos orgânicos sob a forma de carboidratos, lípídeos, proteínas e ácidos nucleicos (LEWIS et al, 1979). Visto ser a água o componente mais abundante, as ionizações causadas pela radiação ocorrem fundamentalmente nas moléculas de água e os radicais livres resultantes, reagem com as moléculas orgânicas biologicamente importantes, sendo assim a radiação indiretamente responsável pelos efeitos observados (GROSH et al, 1979).

A radiólise da água produz o radical catiônico H_2O^+ e um elétron com espécies primárias. Estas espécies reagem, então, com outras moléculas de água produzindo os radicais intermediários: H^\cdot , H_2O^\cdot , O_2^\cdot , a molécula de água excitada H_2O^* e o elétron solvatado, entre outros (MENECHINI, 1987).

O oxigênio é um elemento imprescindível à manutenção

da vida e tem efeito radiosensibilizador nos sistemas biológicos. Os organismos aeróbicos estão expostos a uma atmosfera que contém aproximadamente 20% de oxigênio. Durante as reações que participa, formam-se algumas espécies ativas de oxigênio (EAO), que reagem com as moléculas biológicas. Há indícios de que as EAO em excesso no metabolismo celular produzem lesões no DNA e em outras estruturas, fenômeno causador de doenças e provavelmente relacionado com o processo de envelhecimento. É preciso destacar, no entanto, que o organismo sabe aproveitar o potencial destruidor dessas espécies para proteger-se contra bactérias e outros microorganismos invasores (MENECHINI, 1987). Além disso, grande parte da toxicidade do O_2 , provém dos produtos de sua reação ou excitação para um estado de singlete. A completa redução do oxigênio requer quatro elétrons e a água será o produto final formado. Inversamente, quando ocorre oxidação da água, há liberação de quatro elétrons. Quando a redução do oxigênio se dá em passos univalentes são produzidos intermediários reativos (tóxicos): o íon superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio ou água oxigenada (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot).

Em células de mamíferos a curva de sobrevivência apresenta a mesma forma sob condições aeróbica e hipóxica. Muitos grupos de pesquisa têm acumulado resultados importantes em experimentos com animais de laboratório, onde os principais parâmetros considerados são a frequência de aparecimento de tumores malignos e o tempo de sobrevivência. É curioso notar que várias condições experimentais, ligadas a produção maior ou menor de EAO, influem nesses parâmetros (MENECHINI, 1985).

É fato conhecido que a hipóxia, ou seja, a deficiên-

cia de oxigênio, protege as células dos efeitos nocivos da radiação. As células hipóxicas de tumores sólidos, são consideradas um problema no tratamento de câncer por radioterapia.

Vários autores têm demonstrado que o efeito do oxigênio só pode ser observado quando estiver presente durante a irradiação, sensibilizando o material biológico. Os mecanismos de radiosensibilização pelo oxigênio, têm importância também na interação com outros modificadores da radiosensibilidade celular.

Recentemente, estudos químicos e experimentais vem apresentando resultados promissores com a administração de agentes com eletroafinidade que agem aumentando o dano induzido pela radiação da mesma maneira. Assim, a abordagem química para melhorar a eficiência da radioterapia de tumores consistiria na administração de drogas radiosensibilizadoras que expressem sua ação na porção hipóxica do tumor. Os compostos químicos capazes de modificar o efeito da radiação devem, necessariamente, estimular ou inibir os sistemas radioprotetores naturais do organismo.

As drogas radiomodificadoras, são compostos cuja característica é produzir uma resposta diferencial entre o tumor e as células normais, ou seja, são substâncias capazes tanto de proteger os tecidos sadios quanto de radiosensibilizar o tecido tumoral, diminuindo ou potenciando os efeitos de uma dada dose de radiação (HALL, 1978).

A maioria dos agentes radioprotetores químicos contém o grupamento tiol, o qual é capaz de competir com as moléculas

las alvo na fixação ou compensação do dano induzido pela radiação (ADAMS et al, 1978). Certo número de compostos orgânicos sulfidrílicos protegem as células contra o dano a nível molecular produzido pela radiação (BEGG & TERRY, 1983), bem como da ação tóxica de drogas, inclusive as utilizadas em quimioterapia, indutoras da morte celular (TOWLE & PIRRO, 1984).

O agente tiol radioprotetor mais eficiente, no momento é o etiôfos [ácido etiofosforático (S - 2 - (5 - aminopropilamino))] ou WR 2721, que aparentemente protege diferencialmente células normais e malignas (YUHAS & CULO, 1980).

Só a presença do grupo SH não confere propriedades protetoras aos compostos sulfidrílicos. A estrutura molecular que é particularmente eficiente, inclui um grupo amino separado do grupo sulfidrílica, por não mais do que três átomos de carbono (GROSH & HOPWOOD, 1979).

Vários mecanismos de ação dos radioprotetores têm sido postulados. Estes incluem a doação de átomos de H, o aprisionamento de radicais OH, a formação de dissulfetos mixtos, a quelação de metais e a produção de hipóxia (HELD et al, 1988).

Outras teorias de mecanismos de ação a nível fisiológico dizem respeito à desintoxicação de espécies reativas radioquímicas, à estabilização de alvos radiobiológicos e ao estímulo dos processos de reparo do dano produzido pela radiação.

Um número de características da bioquímica celular e fisiológica interagem para determinar a radiosensibilidade natu

ral ou inerente das células ou das estruturas mais complexas que elas abrangem.

Grande parte das substâncias que protegem contra os efeitos deletérios da radiação são eficientes também como desintoxicantes de ação nociva de certos compostos químicos ou em tratamento agressivo. Isto é especialmente válido quando se considera os radioprotetores endógenos.

É relevante considerar, no caso de radioprotetores ou radiosensibilizadores exógenos, a toxicidade de qualquer substância alheia ao organismo como fator limitante para seu uso. Desde que, alguns radioprotetores químicos exógenos podem exercer seus efeitos pela alteração do balanço normal entre os fatores exógenos, devem ser considerados como os mais importantes, a ação indireta da radiação através da radiólise da água, o efeito do oxigênio e a presença de substâncias radioprotetoras endógenas e exógenas.

Os organismos têm sistemas enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar esses radicais livres, já que essas espécies são formadas durante diversos processos metabólicos ou patológicos, tais como a respiração e inflamação (MENECHINI, 1987). Os sistemas enzimáticos incluem a glutathione-S-transferase, hidrolases, superóxido dismutase, catalase, peroxidases, tais como glutathione peroxidase e glutathione reductase.

Dentre os sistemas há os antioxidantes não enzimáticos, capazes de decompor as EAO, como a glutathione, os tocofe

róis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenos (vitamina A) (MENEGHINI, 1987), e certos compostos peptídicos como as metalotioneínas (MT). O tratamento de camundongos com sais metálicos capazes de induzir MT podem resultar em resistência à toxicidade induzida por radiação, sendo sugerido que o MT desempenharia papel relevante na radioresistência (KOROPATNICK et al, 1989, MATSUBARA et al, 1988).

A radioproteção pode ser evidenciada de várias maneiras, dependendo do tipo de experimento realizado e do sistema biológico escolhido. Com mamíferos em experimentação, é observado quando uma quantidade maior de animais sobrevive a uma dada dose de radiação ou quando eles têm uma tolerância maior do que a usual. Isto significa que os animais que sobrevivem a uma dose apreciável de radiação sejam normais. Exames histológicos de ratos protegidos demonstraram anormalidade na maior parte dos tecidos, bem como alguma diminuição quantitativa. Além disso, apesar da proteção, a fertilidade mostra-se alterada e a taxa de mutação aumentada (GROSH & HOPWOOD, 1979).

2.1 GLUTATIONA (GSH)

2.1.1 Definição e Função

A glutatona é um tripeptídeo caracterizado por uma ligação γ glutamílica, o que lhe confere resistência frente a atividade da peptidase normal e o grupo tiol que é um nucleófilo com uma constante de dissociação (pK_a) de 8,56 (LIVESEY et al, 1984).

A sua estrutura de ligação peptídica é:

. L- γ -glutamílica - L-cisteinílica - glicina



Demonstrou-se que compostos celulares contendo grupos tióis (-SH), tais como a glutatona (GSH), protegem as células contra os danos produzidos pela radiação ionizante (HALL, 1978, CASARET, 1980). A glutatona é o principal radioprotetor endógeno, pela sua capacidade em desintoxicar o organismo das espécies reativas geradas pela radiação.

A GSH é provavelmente o tiol natural mais abundante, de baixo peso molecular (MEISTER & ANDERSON, 1983). Este tripeptídeo foi isolado pela primeira vez em 1988 e sua estrutura foi estabelecida pela síntese de substâncias químicas em 1935 (FLOHE

et al, 1974, MEISTER et al, 1983, SIES et al, 1983).

A glutathiona é conhecida pela ação direta ou indireta em muitos fenômenos biológicos importantes, incluindo a síntese de proteínas e de DNA, transporte, atividade enzimática, metabolismo e proteção celular. As propriedades multifuncionais da glutathiona são refletidas pelo crescente interesse nesta molécula, por parte dos pesquisadores, sob diversos aspectos como mecanismos enzimáticos, biosíntese de macromoléculas, metabolismo intermediário, metabolismo de drogas, radiação, câncer, toxicidade do oxigênio, fenômenos imunológicos, endocrinológico e de toxinas que alteram o comportamento (MEISTER & ANDERSON, 1983).

2.1.2 Distribuição e Regulação

No estado normal de óxido-redução das células, toda a glutathiona intracelular está essencialmente presente na forma tiol (glutathiona reduzida, GSH) com menos do que 5% presente na forma de dissulfeto (GSSG). O "pool" celular total de glutathiona também inclui dissulfetos mixtos de baixo peso molecular e dissulfetos mixtos com proteínas e tioésteres.

O espaço extracelular, incluindo vários fluídos biológicos, tais como bile, plasma e filtrado glomerular, contém GSH, GSSG e dissulfetos mixtos geralmente em concentrações muito baixas (μM). Essas concentrações são de 2 ou 3 ordens de magnitude menores que a concentração de glutathiona presente nos eritrócitos e tecidos corporais em geral. As porções glandulares do estômago e fígado têm as maiores concentrações conhecidas de gluta-

tiona, seguidos pelo baço, rins, pulmões e outros órgãos e tecidos (BOYD et al, 1978). O "turnover" da glutathione durante as condições fisiológicas normais apresenta uma ampla variedade de velocidades dependendo do órgão ou do tecido, sendo de aproximadamente 1 a 3 minutos no compartimento plasmático, 1 hora no rim, 2 a 3 horas no fígado e vários dias no baço, pulmão, tecido nervoso e eritrócitos (KOSOWER & KOSOWER, 1978).

O fígado é particularmente susceptível à rápida e extensiva depleção da glutathione pela formação de conjugados que é catalizada pela glutathione S-transferase.

Dentre outros tióis presentes no fígado incluem-se a coenzima A (1 - 2 mM na mitocôndria e 15 μ M no citosol) e cisteína (0,1 a 0,4 mM).

A depleção da glutathione do fígado é seguida por uma rápida ressíntese na qual o "pool" de cisteína é renovado a cada 2 ou 3 minutos. Foi estabelecido que durante uma fase de alta taxa de consumo de cisteína, o fígado utiliza a via da cistationina para a ressíntese de cisteína. Nesta via, o átomo de enxofre da metionina e o esqueleto carbonato de serina são utilizados para a formação intermediária de cistationina. Fontes exógenas de cisteína, tais como a N-acetilcisteína e L-2-oxotiazolidine-4-carboxilato promovem a síntese de glutathione (REED et al, 1977).

Enquanto que a regulação da via da cistationina não está completamente esclarecida, foi demonstrada a resposta rápida ao decréscimo nos níveis de glutathione. Após uma depleção, frequentemente há uma ressíntese extensiva produzindo níveis mais al

tos de glutathione que os encontrados antes da depleção. Este fenômeno permanece sem explicação e poderia potencialmente ser de utilidade na otimização da proteção celular contra os efeitos da radiação ionizante.

Um aspecto extremamente importante da glutathione é seu estado inter-orgânico e sua função. Face ao fato que, aparentemente o fígado é fundamentalmente o responsável pela manutenção do fornecimento de glutathione plasmática e considerando a rápida renovação ("turnover") desta (que é de 1 a 3 minutos), o mecanismo e a regulação do efluxo da glutathione hepática para o plasma é de grande interesse. Mesmo que grande parte do processo seja desconhecido, está estabelecido que o efluxo é quase exclusivamente de GSH e não de GSSG. Algumas controvérsias existem concernentes à relação entre o nível intracelular da glutathione e a taxa de efluxo (AKERBOOM et al, 1982).

Em condições fisiológicas normais, a taxa de renovação da glutathione hepática é dependente quase que exclusivamente da taxa de efluxo no compartimento plasmático (MERIDITH & REED, 1982). Foi estimado que aproximadamente 80% da glutathione total efluente do fígado se encontra no plasma e 20% é excretada na bile (REED & MERIDITH, 1984).

A degradação da GSH hepática é iniciada pela γ -glutamyltransferase que catalisa a remoção da porção γ -glutamil para água ou, sob condições específicas, para certos aminoácidos e dipeptídeos que se encontram em concentrações milimolares (MCINTYRE & CURTHOYS, 1980). Essa enzima está localizada fundamentalmente nas membranas de certas células e tem o sítio ativo exposto pa

ra o espaço extracelular (TSAO & CURTBOYS, 1980).

A γ -glutamyltransferase extracelular degrada rapidamente quaisquer GSH, GSSG, dissulfetos mistos ou conjugados S-glutathiona em células epiteliais e biliares excretados por essa rota. Entretanto, concentrações milimolares de GSH e GSSG estão presentes na bile e, aproximadamente a metade dessa glutathiona poderia ser degradada no conduto biliar sob certas condições.

Evidências recentes sugerem que o rim tem a habilidade de alterar o estado redox da glutathiona extracelular e outros tióis. A atividade das oxidases de tióis renais foi caracterizada e muitas de suas propriedades foram estabelecidas (ORRENIUS et al, 1983). Essa oxidase é componente da membrana plasmática do epitélio tubular renal e catalisa somente a oxidação de tióis extracelulares, tais como GSH, cisteína, N-acetilcisteína e ditio treitol (ORMSTAD et al, 1980). Contrariamente à γ -glutamyltransferase que está localizada na região do bordo dos cílios, a tiol-oxidase, se encontra na região lateral da membrana plasmática epitelial tubular. Concluiu-se que sua atividade se restrinja provavelmente aos tióis presentes no plasma (ORRENIUS et al, 1983).

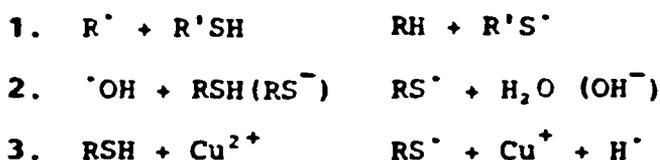
Pouco se conhece em relação a captação e redução de dissulfetos de baixo peso molecular. Existem evidências de que as células renais e pulmonares podem utilizar GSSG extracelular também de maneira que não envolva prévia degradação extracelular (ORMSTAD et al, 1980).

Para o estudo do metabolismo de dissulfetos e compostos sulfidrílicos são de grande importância os sistemas de célula-

las isoladas bem como os em homogenados de órgãos, de células, já que a manutenção do estado redox dos tióis com dissulfeto no compartimento plasmático está relacionado a diversos processos.

Em mamíferos, aparentemente a GSH é um reservatório fisiológico importante de cisteína. A curta vida média da GSH no sangue (1 a 9 minutos) seria produzida pelo alto grau de atividades das enzimas extracelulares do rim, que degradam GSH, GSSG e dissulfetos mistos relacionados (GRIFFITH & MEISTER, 1979). A liberação extracelular de cisteína e de cistina a partir de GSH e GSSG respectivamente, se inicia pela γ -glutamyltransferase seguida da ação de uma ou mais dipeptidases localizadas no rim e nos intestinos. Este processo pode ser essencial para prover a cisteína e a cistina de que as células necessitam para o crescimento e manutenção da GSH intracelular. O fluxo constante da GSH no fígado, provê um fornecimento constante de cisteína, onde uma porção desta cisteína e da cistina liberadas retorna ao fígado para a manutenção do conteúdo da GSH hepática.

Muitos esquemas de constituintes celulares do dano por radiação envolveram processos mediados por radicais livres. Dentre as espécies mais proeminentes, se destacam os radicais livres RS^{\cdot} , $RSS^{\cdot-}$, o radical $(RSSR)^{\cdot-}$, e o radical cátion $R_2S^{+\cdot}$, $(R_2S)_2^{+\cdot}$. A produção e disposição dessas espécies é um complexo que envolve reações que ocorrem a velocidades controladas pela difusão. Estes radicais podem ser produzidos pela abstração de átomos de Hidrogênio do correspondente tiol ou de radicais de carbono (reação 1), pela ação de radicais hidroxila (reação 2) ou pela redução de metais por tióis (reação 3).



Espécies ativas de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2) podem ser consequência da radiação ionizante, de agentes químicos do ciclo de redox, ou pela produção endôgena durante o metabolismo normal. Os efeitos deletérios destas espécies são conhecidos como "stress" oxidativo e pode levar a célula à morte. O stress oxidativo, é conhecido, ser limitado pelo ciclo redox da glutathiona. O metabolismo de citosólicos e peróxidos de hidrogênio mitocondrial pela glutathiona peroxidase está firmemente estabelecido (KAPPUS & SIES, 1981).

2.1.3 Agentes que modificam os níveis de GSH

Alguns estudos sugerem que a depleção de GSH celular, resultaria na radiosensibilização aeróbica decorrente da peroxidase produzida pela radiação ou de hidroperóxidos intermediários tóxicos que a levaria a formação de outro produto que é tóxico e mutagênico (BIAGLOW et al, 1983).

A depleção do GSH "in vitro" ou "in vivo", resulta na inibição da glutathiona peroxidase e foi mostrado causar pelo oxigênio a peroxidação lipídica e xenobióticos (BOREK et al, 1984). O aumento da glutathiona peroxidase nas células foi mostrado estar relacionado à proteção contra a mutagênese produzida pela radiação e pela radiação de corpo inteiro (MEYERS & KATKI, 1982).

Agentes que depletam tióis servem como veículos, tan

to usados sozinhos quanto combinados com agentes radiosensibilizadores com eletroafinidade (misonidazole ou oxigênio). A depleção do tiol pode ser realizada de várias maneiras nas células (BIAGLOW et al, 1982), pela prevenção da síntese de GSH com subsequente depleção metabólica (bloqueio pela butionina sulfoximina — BSO) (BIAGLOW, 1983), pela remoção do NPSH por oxidação (diamide), ou pela formação de ligação covalente, incluindo reações catalizadas pela GSH - S - transferase (dietilmaleato).

O dietilmaleato (DEM) que é um reagente de ligação tiol com especificidade para a glutathiona, diminui os níveis de tiol celular por meio do bloqueio da ação enzimática (GSH - S - transferase), bem como através da conjugação espontânea com a GSH (BOYLAND et al, 1967) e outros NPSH (BUMP et al, 1983). Estudos recentes mostraram que o DEM comporta-se como um radiosensibilizador de células hipóxicas depletando tióis quando presente durante a irradiação de células (BIAGLOW et al, 1983). O tratamento de células A549 com DEM, seguido com BSO, resulta em células que são mais radiosensíveis sob condições aeróbica ou hipóxica (BOREK et al, 1984).

Estudos recentes sugeriram que a combinação de tióis depletadores "in vivo", tornam o misonidazole o mais efetivo radiosensibilizador de células hipóxicas (BROWN et al, 1984). Agentes combinados são necessários após a administração de um radiomodificador por causa da depleção de GSH, podendo ser um processo lento e depende da sua utilização metabólica. Este estado de depleção dos tióis torna as células tumorais mais vulneráveis, em consequência da produção de peróxidos através do misonidazole e do estímulo do metabolismo aeróbico de SR2508 (BIAGLOW et al, 1983).

Os níveis de GSH podem ser aumentados pelo ácido L-2-oxotiazolidina-4-carboxilato (OTCA), que é um precursor da cisteína intracelular e metabolicamente é encontrado em compostos carcinogênicos e mutagênicos, tendo relevância clínica no campo ocupacional ou na saúde ambiental (GOYAL et al, 1989). Portanto, a glutathione funciona como o principal radioprotetor endógeno celular, e sua depleção pode levar a uma radiosensibilização significativa, especialmente sob condições hipóxicas. Tióis celulares, tais como a GSH, competem com radiosensibilizadores de espécies ativas de oxigênio. Assim, pode ser observado que a depleção de GSH junto com a administração de um radiosensibilizador com alta afinidade, aumenta a radiosensibilidade de células hipóxicas (WILLIAMSON et al, 1982).

2.2 PROTEÍNAS SÉRICAS. ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS

Segundo SURINIVASAN (1985), é possível avaliar o efeito da radiação e a ação de possíveis radiomodificadores mediante a análise das mudanças nos níveis de proteínas séricas: proteínas totais, albumina e globulinas α , β e γ .

As proteínas séricas colaboram para a manutenção do meio interno do organismo, permitindo a solubilização de substâncias insolúveis em água e o seu transporte como complexos solúveis até os locais apropriados, onde serão descarregados através de uma série de reações. Também carregam nutrientes essenciais para as células ao transportarem ácidos graxos pela albumina e produtos de um órgão para outro. Assim, a concentração dessas substâncias no plasma será proporcional a sua demanda. Algumas das proteínas séricas, como as gamaglobulinas, têm anticorpos.

Por eletroforese, as proteínas séricas separam-se em cinco frações principais: albumina e as globulinas designadas pelas letras gregas α_1 , α_2 , β , γ , sendo esta última, a mais lenta por ser a menos carregada eletricamente.

A albumina é importante na manutenção do volume plasmático e é sintetizada no fígado. A incapacidade de sua síntese é característica proeminente de doenças crônicas do fígado (cirrose). Esta proteína está relacionada fisiopatologicamente com os problemas concernentes ao equilíbrio hídrico, participando na pressão osmótica, que é aquela representada pela diferença de pressão que existe entre a pressão osmótica do sangue e aquela da linfa ou fluidos teciduais e que regula o fluxo de água entre ambos. A albumina tem capacidade de fixar, fisiologicamente, numerosas substâncias: bilirrubina, ácido úrico, ácidos graxos, entre outros; ou não fisiologicamente: vermelho do Congo, azul de Evans, sulfamidas, penicilinas etc.

A albumina contribui com a função detoxificante do organismo fixando os conjugados de glicocola (glicina) e também de metais pesados. Tem-se assinalado que no soro humano e a maior parte da amilase estaria ligada a albumina.

Em relação às alfa globulinas, geralmente ocorrem elevações na hipoproteïnemia (hipoalbuminemia). As alfas globulinas transportam carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (lipoproteínas), mucoproteínas, proteína C reativa, cobre (seruloplasmina) e hemoglobina (hepatoglobulinas). Seu aumento geralmente reflete uma concentração elevada de glicoproteínas, infecções crônicas, aumento de proteína C reativa ou, ainda, alterações das lipopro-

teínas. A hiperalfaglobulinemia verifica-se também nas doenças metastáticas (carcinoma); em necroses celulares agudas (enfarte do miocárdio) estão associadas com a elevação especialmente de alfa. Necroses hepatocelulares agudas estão, freqüentemente, associadas com a diminuição das alfas globulinas séricas, o que pode ocorrer em diversas doenças do fígado.

As betas globulinas transportam, principalmente, protrombina, ferro, colesterol, fosfolipídeos e hormônios. Tendo em vista que a transferrina está associada com esta fração, nas deficiências de ferro ocorre elevação da β globulina. Pelo mesmo motivo, ocorre diminuição de seus níveis nas hepatites virais e cirroses. Elevações da β - globulinas são observadas nas icterícias obstrutivas, diabetes mellitus não controladas e síndromes nefróticas, refletindo alterações das betas lipoproteínas e distúrbios no metabolismo lipídico.

A fração de gamaglobulina está constituída de proteínas quimicamente muito homogêneas. Seus pontos isoelétricos oscilam entre 6,3 e 7,6. Nesta fração protéica estão incluídas as imunoglobulinas (anticorpos) do organismo que conseqüentemente apresentam maior variação de níveis em condições patológicas. Durante muito tempo, o termo γ - globulina foi usado como sinônimo de anticorpo. Hoje, esta sinonímia é desaconselhada pela OMS (Organização Mundial de Saúde), já que, todo anticorpo é uma imunoglobulina, mas há imunoglobulinas sem atividade de anticorpo (FERRI et al, 1977). As imunoglobulinas podem ser classificadas em IgA, IgG, IgD e IgE.

Valores aumentados da gamaglobulina ocorrem nas doenças infecciosas, enfermidades do colágeno, mieloma múltiplo, he-patopatias etc. Por outro lado, a diminuição dos seus valores po-de estar associada a doenças congênitas, a perdas protéicas, en-tre outras anomalias*.

(*) Eletroforese - Diagnóstico Básico. Merck, 2ª edição, 1985.

OBJETIVO

Estabelecer, na radiosensibilidade de camundongos, o efeito da diminuição da Glutathiona (GSH) mediante o seu bloqueio com Dietilmaleato (DEM) diluído em óleo de amendoim ou em solução etanólica.

O trabalho experimental inclui:

- A** A análise das alterações dos índices de sobrevivência à irradiação, durante 30 dias;
- B** O estudo das modificações nas curvas de peso corporal, durante 30 dias;
- C** A análise de proteínas totais e de frações de proteínas séricas nos dias 19, 39 e 79 após a irradiação.

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos albinos, heterozigotos, machos e fêmeas, com idade de 8 a 10 semanas e peso corporal entre 25 e 30 gramas, provenientes do biotério do IPEN, com dieta usual de laboratório e água fresca *ad libitum*.

Para cada experimento, os grupos foram constituídos a partir de ninhadas simultâneas e divididos da seguinte maneira:

- . GRUPO A — Lote de 5 a 10 animais testemunhas.
- . GRUPO B — Lote de 10 animais tratados com o solvente.
- . GRUPO C — Lote de 20 animais tratados com o DEM no solvente correspondente.
- . GRUPO D — Lote de 20 animais tratados com o solvente e irradiados.
- . GRUPO E — Lote de 20 animais tratados com DEM no solvente correspondente e irradiados.
- . GRUPO F — Lote de 20 animais somente irradiados.

3.2 TRATAMENTO COM DIETILMALEATO (DEM)

Foi utilizado o dietilmaleato como bloqueador dos níveis de glutatona endógena. O dietilmaleato (DEM) é o éster dietílico do ácido 2-butenodióico ou etilmaleato. Este composto é pouco solúvel em soluções aquosas, é um líquido oleoso, denso e de difícil manuseio. A administração do DEM (SIGMA CHEMICAL

CO.) foi realizada via intraperitoneal (ip), 1 hora antes da irradiação, em dois tipos de diluentes.

3.2.1 Óleo de Amendoim Comercial (POLYFARMA)

O DEM foi diluído em óleo de amendoim na concentração de 0,418mM e 4,18nM, ou seja, 720mg/kg (BUMP et al, 1981 e BUMP et al, 1982). O óleo de amendoim é utilizado usualmente como veículo para medicação intramuscular. É constituído por glicérides dos seguintes ácidos graxos: palmítico 8,3%, esteárico 3,1%, araquídico 2,4%, behênico 3,1%, lignocérico 1,1%, oleico 56%, linoleico 26%, além de traços dos ácidos cáprico e laúrico (The Merck, INDEX, 1976).

3.2.2 Álcool Etílico

O DEM foi diluído, inicialmente, em etanol absoluto P.A. (CARLO ERBA) (10:1), e, posteriormente, submetido a diluições sucessivas em solução salina (NaCl 0,85%) numa concentração final de 1,5mM de DEM (KOCH et al, 1984).

Nas experiências com ambos os solventes, o esquema foi o seguinte:

- . Injeção intraperitoneal (ip) das soluções de DEM, 0,3ml por camundongo, nos animais correspondentes aos GRUPOS C e E;
- . Injeção ip de 0,3ml dos solventes óleo de amendoim e álcool etílico, por camundongo, nos animais correspondentes aos GRUPOS B e D;
- . Irradiação dos animais dos GRUPOS E e F.

3.3 IRRADIAÇÃO

As irradiações foram feitas utilizando fonte gama de ^{60}Co , Gamma Cell 220 (Atomic Energy of Canada Ltd.). A fonte propriamente dita, está localizada no centro da blindagem de chumbo e consiste de 26 varetas, cada uma possuindo 7 pastilhas de ^{60}Co , num total de 182 pastilhas. A dose foi de 9.0 Gy para todos os experimentos utilizando blindagem de 70%. Foram irradiados 3 animais por vez, dentro de um cilindro de papelão com 9 cm de diâmetro e 19 cm de altura, com uma taxa de dose variando entre 5,7 Gy/min e 4,655 Gy/min.

3.4 CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA E PESO

Para a realização dos experimentos com os diferentes tratamentos, os animais foram alojados em gaiolas metálicas para camundongos em grupos de 5 a 10 animais por gaiola; foram pesados individualmente, identificados por grupo e protocolados de acordo com cada substância testada. Após a injeção das substâncias e irradiação, o acompanhamento da experiência foi efetuado durante 30 dias, com o registro diário do número de sobreviventes e pesagem em dias alternados.

3.5 ANÁLISE DE PROTEÍNAS SÉRICAS E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS TOTAIS

3.5.1 Eletroforese em acetato de celulose

Foi feita a análise das proteínas séricas por eletroforese em cellogel, seguindo a metodologia clínica usual (MOURA

et al, 1982). Foram utilizadas fitas de acetato de celulose de 14 x 2 cm - POLYGEL - (INLAB), umedecidas em metanol a 40%.

A técnica utilizada foi a seguinte:

- a. As tiras, de tamanho apropriado para cobrir a ponte foram mar cadas com tinta indelével em uma das pontas;
- b. O tampão foi despejado na cuba, igualando os níveis (tampão Merck, pH 8.6);
- c. As tiras foram colocadas na superfície da solução tampão onde foram embebidas por baixo até obter um aspecto uniforme;
- d. Foram retiradas do tampão após 10 minutos, e eliminado o excesso por leve pressão entre dois papéis de filtro;
- e. As tiras foram esticadas rapidamente na ponte com as pontas sub mersas nas cavidades dos polos e foram aplicadas amostras de aproximadamente 1 microlitro;
- f. Foi aplicada uma tensão de 200 V, 5 mA, durante 30 minutos;
- g. A corrente foi desligada, as fitas foram retiradas e colocadas no corante de proteínas, vermelho Ponceau (0,5 g corante: 5.0 g tricloroacético: q.s.p. 100 ml água destilada), durante 10 minutos;
- h. As tiras foram lavadas em solução de ácido acético a 5% até que as manchas aparecessem nitidamente contra o fundo incolor;
- i. As tiras foram submetidas ainda úmidas a um tratamento desidratante em álcool metílico durante 1 minuto, e foram colocadas em seguida em solução diafanizadora durante alguns minutos (14 ml ácido acético glacial + 8,5 ml de metanol + 1 ml de glice rol);
- j. As fitas foram colocadas sob uma placa de vidro e foram aquecidas na lâmpada através de uma luz amarela;

1. As tiras secas foram levadas ao densitômetro da Zenite, para a leitura gráfica.

3.5.2 Determinação da Proteína Total

A determinação das proteínas foi feita pelo método de Biureto. As proteínas formam um complexo com o Biureto (reação de Piotrowsky ou de Biureto). A intensidade da cor produzida é medida por espectrofotometria contra a solução padrão (solução padrão de soro albumina). A cor violeta é produzida pela reação das proteínas com os íons de cobre do reativo de Biureto. A absorvância é lida em 545 nm. A reação sã é positiva na presença de, no mínimo, duas ligações amídicas ou peptídicas (-CO-NH), portanto, a partir de tripeptídeos.

Para cada um dos grupos formados, convencionalmente estabelecidos como A, B, C, D, E e F, descritos no item 3.1, foram colhidas amostras de sangue do plexo ocular para análise de proteínas totais e séricas, nos tempos:

- . $t_{1\phi}$ — No dia da injeção da droga, 1 hora após o tratamento e a irradiação;
- . $t_{3\phi}$ — No terceiro dia, após a injeção da droga e a irradiação;
- . $t_{7\phi}$ — No sétimo dia, após a irradiação.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita uma primeira análise para comparar o efeito dos tratamentos no peso corporal durante 30 dias, utilizando a seguinte nomenclatura:

- . NO = Normal
- . INJ_A = DEM + óleo de amendoim
- . INJ_B = óleo de amendoim
- . INJ_C = DEM + álcool
- . INJ_D = Álcool
- . INIR_A = DEM + óleo + IRR
- . INIR_B = óleo de amendoim
- . INIR_C = DEM + álcool + IRR
- . INIR_D = Álcool + IRR
- . IRR = somente irradiado.

Foi usada a técnica estatística de regressão múltipla aplicada a problemas de análise de variância, segundo o modelo:

$$y_{ij} = \eta + \beta_j + e_{ij}$$

onde:

β_j = Efeito do tratamento ($j = 1, 2, 3, \dots, 10$)

e_{ij} = Resíduo

As conclusões estatísticas foram feitas de acordo com as seguintes hipóteses:

$$H_0 = \text{todos os } \beta_j \text{ são iguais}$$

Com a suposição adicional de que a distribuição dos

resíduos do modelo é normal (observado pelo gráfico probabilístico) e com média zero e variância constante (verificado pelo gráfico dos resíduos x tratamentos), o teste F foi feito através da análise de variância comparando o resultado dos quadrados médios do modelo dividido pelo quadrado dos resíduos, em nível de significância de 5% ($\alpha = 5\%$).

Dado que o teste F rejeitou a hipótese H_0 , isto é, existe uma diferença significativa entre os tipos de tratamentos, por meio do teste DUNCAN, detectou-se em média, quais dos tratamentos tinham significância ($\alpha = 5\%$).

Realizou-se uma segunda análise estatística dos dados de sobrevivência durante 30 dias, utilizando-se a Análise de Variância, por comparação dos 10 tratamentos, sobre a hipótese ($H_0 =$ todos os β_j são iguais), isto é, as médias das taxas de sobrevivência para diferentes tratamentos são iguais.

Dado que o teste F da hipótese H_0 foi rejeitado, utilizou-se o teste DUNCAN para determinar qual dos tratamentos com relação a sobrevivência têm significância ($\alpha = 5\%$).

Realizou-se uma terceira análise para as proteínas totais e as frações séricas (albumina, α_1 , α_2 , beta e gama), durante 7 dias, utilizando-se a técnica estatística de variância, para comparação dos efeitos dia, sexo e tratamento, segundo o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + \gamma_j + \alpha_k + \beta_l + e_{ijkl}$$

- γ_j = Efeito do dia ($j = 1 = 3 = 7$)
 α_k = Efeito do sexo (macho e fêmea)
 β_l = Efeito do tratamento ($l = 1, 2, \dots, 10$)
 e_{ijkl} = Resíduo

Dado que a hipótese (H_0) foi rejeitada, aplicou-se de modo semelhante o teste DUNCAN.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo procedimento GLM do Sistema SAS, no Departamento de Processamento de Dados do IPEN.

3.7 REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS

Usou-se o microcomputador modelo I-7000 PC XT II da ITAUTEC Informática S/A, com "software" Caltec/PC, acoplado à impressora Emília PC, equipamento este cedido pelo CNPq.

Foi estudada a influência do dietilmaleato (DEM), quando administrado em seus veículos (solução alcoólica e óleo de amendoim) sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e proteínas séricas de camundongos irradiados.

4.1 TRATAMENTO COM DEM DILUÍDO EM ÓLEO DE AMENDOIM

4.1.1 Curvas de Sobrevivência

Para os camundongos machos albinos, os resultados obtidos com este tratamento nas taxas de sobrevivência mostram uma diminuição significativa no número de animais sobreviventes à irradiação com 9 GY de ^{60}Co . No grupo de camundongos previamente injetados com DEM (0,418 mM), a sobrevivência foi de 5% aos 30 dias frente a 25% dos animais somente irradiados (Fig. 1A). Os resultados mostram um aumento na radiosensibilidade dos animais em experimentação.

Em outras experiências, mesmo não tendo sido observado sobreviventes entre os animais somente irradiados e os tratados e irradiados, notou-se que os camundongos previamente injetados com DEM 4,18 mM, sobreviveram por um período menor (11 dias) do que aqueles somente irradiados (24 dias), evidenciando também uma radiosensibilização (Fig. 1B).

O DEM (4,18 mM) apresenta uma ação tóxica, já que os

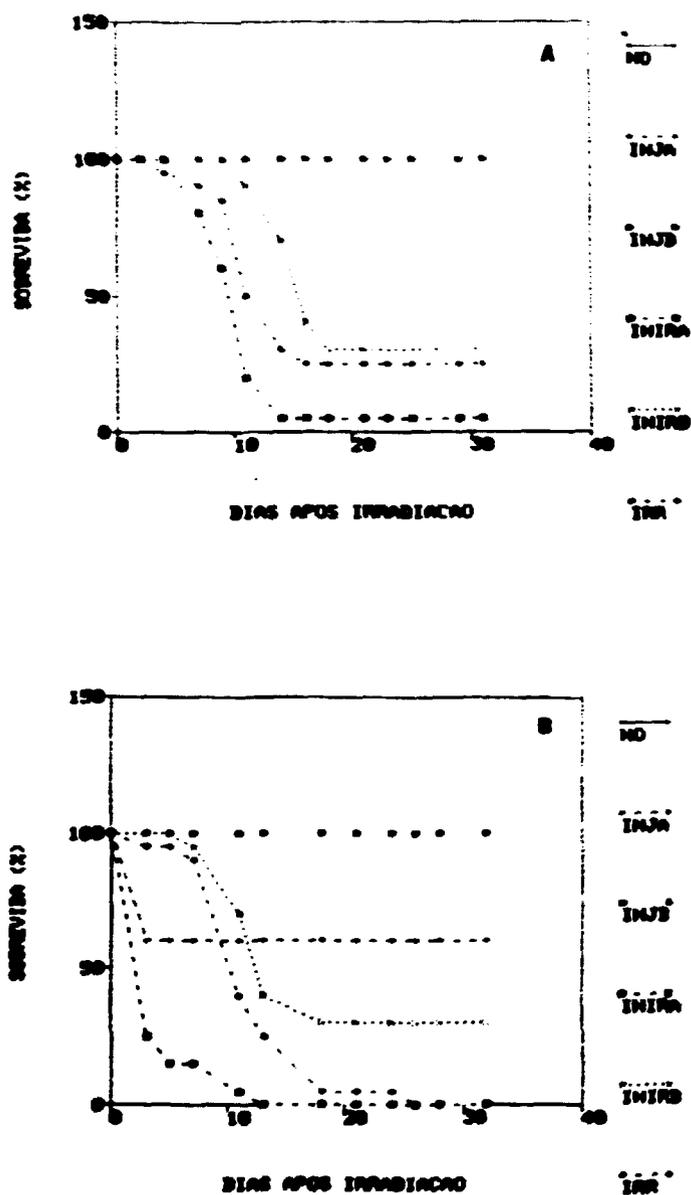


Figura 1 — Sobrevida de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiados (INIRA), tratados com óleo de amendoim e irradiados (INIRB).
 A — Animais tratados com DEM (0,48 mm).
 B — Animais tratados com DEM (4,18 mm).

camundongos controles somente injetados tiveram uma sobrevivência de 60%, ao passo que diminuindo sua concentração (DEM 0,418 mM), houve uma sobrevivência de 100% dos animais injetados.

Para os camundongos previamente injetados somente com o veículo, óleo de amendoim, a sobrevivência foi de 30% após 30 dias em ambos os experimentos, ou seja, maior em relação àquele em que nos somente irradiados foi de 25%, quanto na que fora de 5% (Fig. 1A e 1B). Este resultado aponta uma ação radioprotetora nestas condições.

Do ponto de vista estatístico, os seis grupos (controles, injetados irradiados e irradiados) que se incluem neste teste, mostraram ter comportamentos diferentes.

4.1.2 Curvas de Peso Médio Corporal

Analisando-se as curvas de peso corporal após a irradiação (Fig. 2A), os animais começam a perder peso e esse declínio se dá aproximadamente até o 14º dia, a partir do qual há uma visível recuperação no peso dos sobreviventes. Por volta do 30º dia, os camundongos previamente injetados, praticamente recuperam o peso inicial ou, em alguns casos, até chegaram a superá-los. A diminuição de peso corporal sempre precedeu em vários dias ao início da mortalidade, e apesar dos animais perderem peso, muitos deles sobreviveram. Contudo, no experimento mostrado na Fig. 2B, não observamos recuperação do peso corporal, não havendo sobreviventes neste caso.

Verificou-se ao analisar o peso médio dos animais que

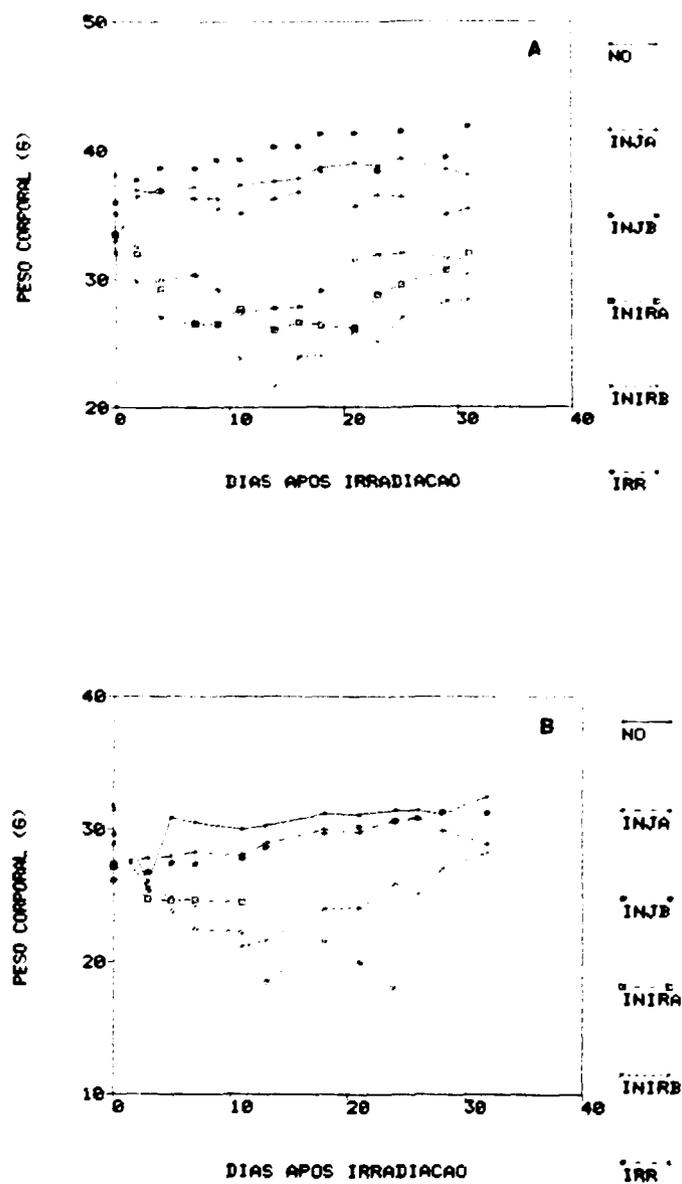


Figura 2 — Pesos médios dos camundongos em função do tempo após a irradiação com Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiados (INRA), tratados com óleo de amendoim e irradiados (INIRB).

A — Animais tratados com DEM (0,418 mM).

B — Animais tratados com DEM (4,18 mM).

as duas concentrações de DEM (0,418 mM e 4,18 mM), e o próprio óleo de amendoim, induzem comportamentos diferentes em relação aos controles, tratados e/ou irradiados. Para o ensaio com o DEM 0,418 mM, os dados analisados apontam um efeito radiomodificador; já no teste com o DEM 4,18 mM, os dados obtidos mostram um predomínio de efeito tóxico. Contudo, percebeu-se uma preponderância do efeito da radiação sobre a ação dos animais tratados.

4.1.3 Análise das Proteínas Séricas (DEM 0,418 mM)*

- Proteína Total: Para os camundongos injetados, injetados irradiados e somente irradiados, nenhuma alteração significativa foi verificada com referência ao sexo, ao número de dias após a irradiação (19, 39 e 79) e ao tratamento dado (Figs. 3A e 3B).
- Albumina (alb): Não se verificou nenhum efeito quando foram comparados machos e fêmeas ou mesmo em consequência do tratamento aplicado. Embora a análise dos dados mostre diferenças individuais nos animais irradiados no 79 dia em relação aos 19 e 39 dias, no global não se percebeu mudanças (Figs. 4A e 4B).
- Alfa Globulinas (α_1 e α_2): Apesar de ser possível observar certas alterações, tanto para as frações de globulinas α_1 , quanto para α_2 , nenhuma modificação sistematicamente significativa foi notada para as variáveis dias após a irradiação (19, 39 e 79 dias), e para os tratamentos aplicados em função dos animais serem machos ou fêmeas (Figs, 5A e 5B, 6A e 6B).

(*) Dados experimentais, vide Apêndice.

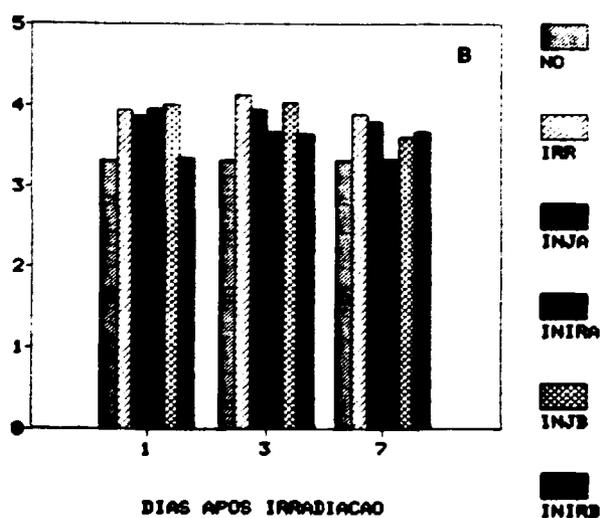
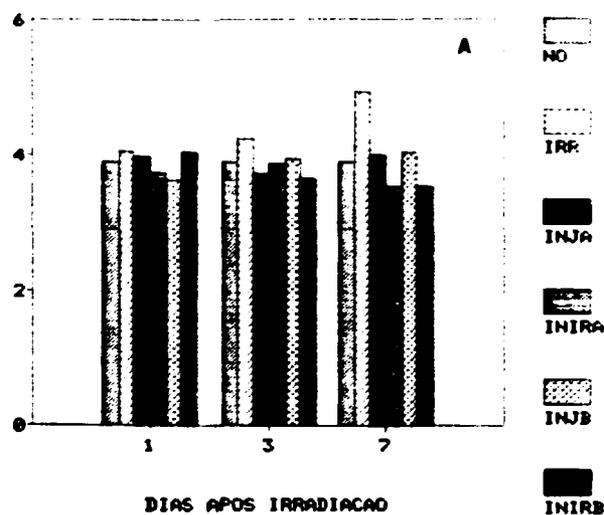


Figura 3 — Distribuição percentual da concentração das proteínas totais (C. P.T.) do soro dos camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiados (INIRA), tratados com óleo de amendoim e irradiados (INIRB).
A — Animais fêmeas
B — Animais machos

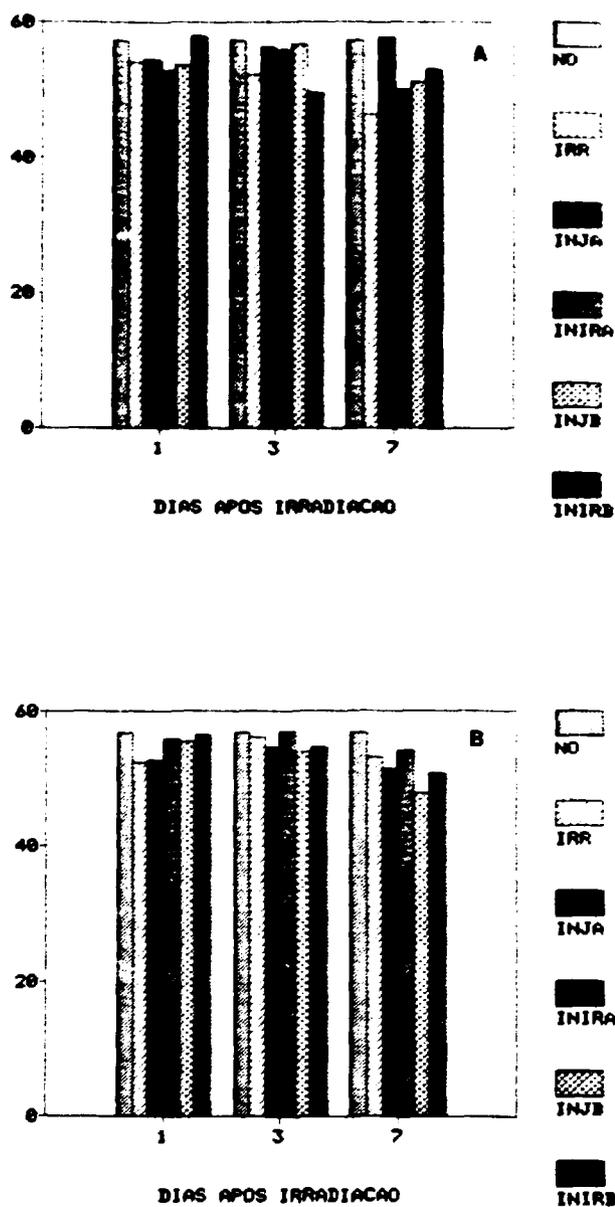


Figura 4 — Variação da concentração de albumina do soro de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co em relação a CPT. Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiados (INIRA), tratados com óleo de amendoim e irradiados (INIRB).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

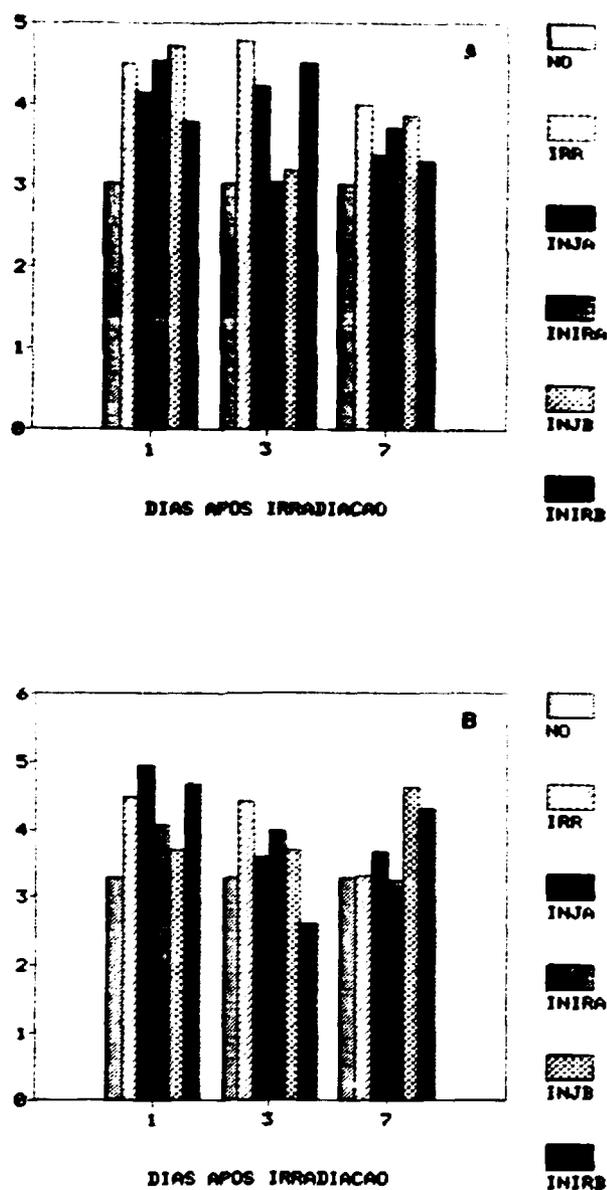


Figura 5 — Distribuição da concentração da fração protéica da alfa globulina (α_1), relativo a CPT dos camundongos em função do tempo após a irradiação de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiados (INIRA), tratados com óleo de amendoim e irradiados (INIRB).

A — Camundongos fêmeas

B — Camundongos machos

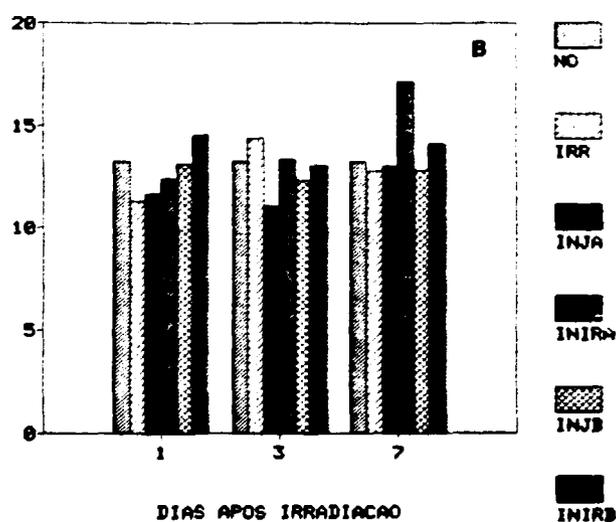
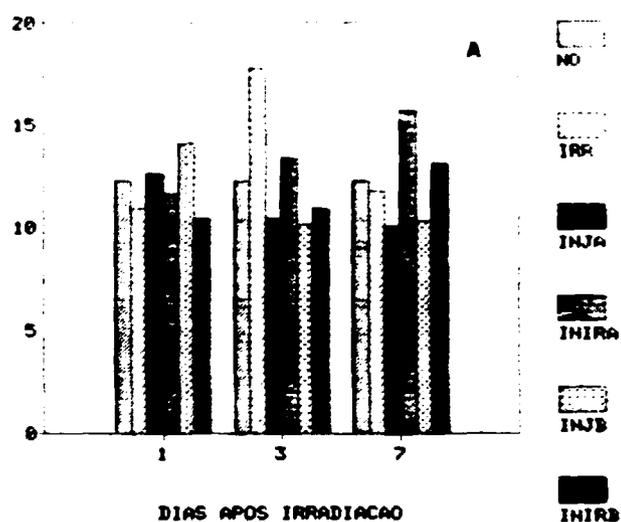


Figura 6 — Alteração da concentração da fração sérica da alfa globulina (α_2) de camundongos em função do tempo após a irradiação com 9 Gy de ^{60}Co , relacionada a CPT. Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiados (INIRA), tratados com óleo de amendoim e irradiados (INIRB).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

- Beta Globulina (β): Houve uma diminuição significativa nos níveis desta fração protéica, em particular, nas fêmeas injetadas e irradiadas em relação aos machos, no 7º dia após a irradiação, quando comparada aos primeiros dias (Figs. 7A e 7B).
- Gama Globulina (γ): Pela análise dos dados, percebeu-se uma queda significativa nos níveis desta fração como consequência da irradiação. É notório, especialmente nas fêmeas, uma diminuição desta fração ao 3º dia em relação aos demais, para os camundongos tratados e irradiados, havendo certa recuperação ao 7º dia. No caso das fêmeas somente injetadas com DEM, aparentemente há um estímulo por volta do 3º dia (Fig. 8A). Para os machos, entretanto, os níveis desta fração pareceram diminuir em função do tempo após a injeção (Fig. 8B). Quanto aos animais machos e fêmeas somente irradiados, notou-se uma diferença significativa já no primeiro dia frente aos controles normais (Figs. 8A e 8B).

4.1.4 Análise das Proteínas Séricas (óleo de amendoim)

- Proteína Total: De acordo com os dados analisados, não houve nenhuma mudança, considerando os animais tratados com óleo de amendoim em função do tempo após a irradiação (Figs. 3A e 3B).
- Albumina (alb): Nenhum efeito sobre os níveis desta proteína foi observado nos animais tratados e irradiados durante o período após a irradiação quando comparado aos seus controles (Figs. 4A e 4B).

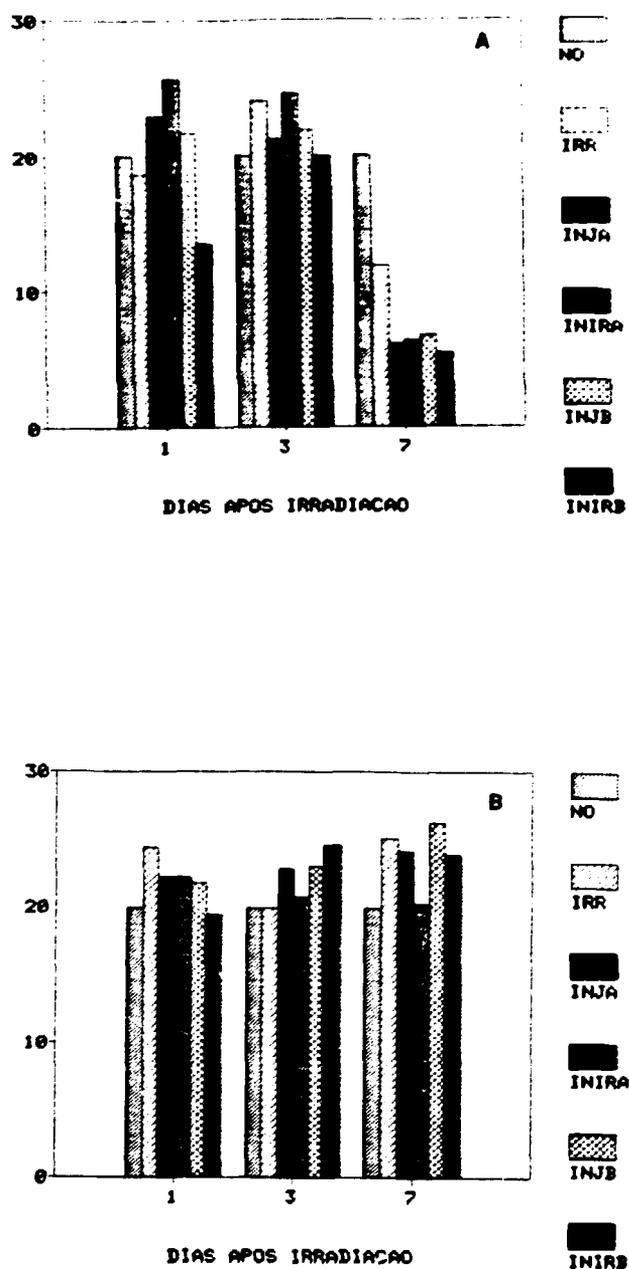


Figura 7 — Distribuição na concentração de beta globulina de soro de camu camu irradiaados com 9 Gy de ^{60}Co , em relação a CPT. Controles normais (NO), irradiaados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiaados (INIRA), tratados com óleo de amendoim e irradiaados (INIRB).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

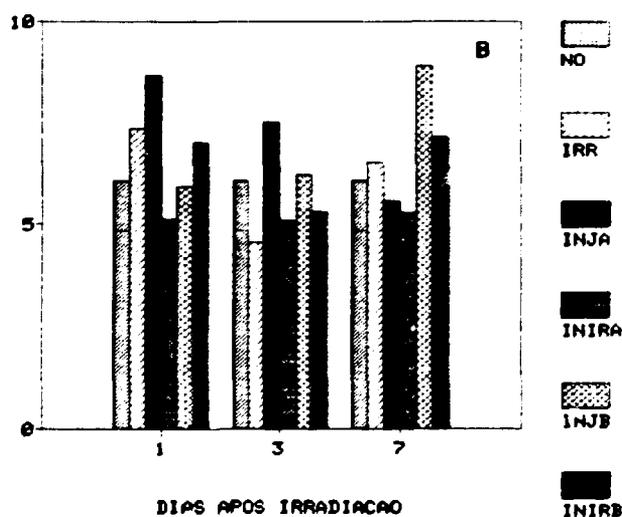
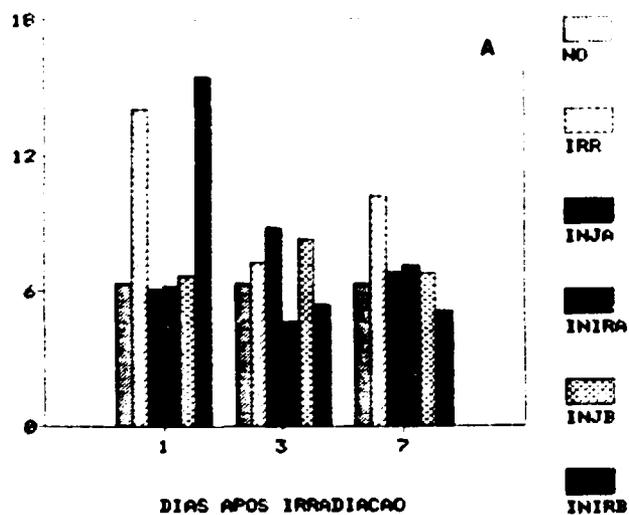


Figura 8 — Distribuição percentual da concentração de gama globulina do soro de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co , em relação a CPT. Controles normais (NO), tratados com DEM (INJA), tratados com óleo de amendoim (INJB), tratados com DEM e irradiados (INIRA), tratados com óleo de amendoim e irradiados (INIRB),
A — Animais fêmeas
B — Animais machos

- Alfa Globulinas (α_1 e α_2): Embora tenham sido verificadas pequenas alterações nas frações séricas de alfa globulina (α_1 e α_2), no contexto geral, não foram evidenciadas quaisquer modificações significativas nos parâmetros analisados (Figs. 5A e 5B, 6A e 6B).
- Beta Globulina (β): São evidentes as reduções destas proteínas séricas no 7º dia após a irradiação, para os camundongos fêmeas injetadas, e injetadas e irradiadas (Fig. 7A). O mesmo não ocorreu com os machos, que não apresentaram mudanças significativas para esta fração protéica, seja em relação ao tratamento propriamente dito ou em função do tempo (Fig. 7B).
- Gama Globulina (γ): Ocorreu um aumento brusco nesta fração protéica nas fêmeas, no 1º dia de tratamento após a irradiação com paulatino decréscimo posterior (Fig. 8A). No entanto, para os machos, observou-se uma pequena elevação no seu nível sérico, no último dia (Fig. 8B).

4.2 TRATAMENTO COM DEM DILUÍDO EM SOLUÇÃO ÁLCOOL ETÍLICO

4.2.1 Curvas de Sobrevida

Os resultados em relação à sobrevida dos animais injetados e irradiados, diferiu entre machos e fêmeas. Para os camundongos fêmeas, previamente injetados intraperitonealmente com DEM, a sobrevida foi de 60% em 30 dias, frente aos 45% dos animais somente irradiados (Fig. 9A). Nos camundongos machos, a sobrevida obtida foi de 45% nos injetados irradiados, diante dos 15% nos somente irradiados (Fig. 9B). O DEM neste solvente apresentou uma ação radioprotetora, provavelmente pela influência da

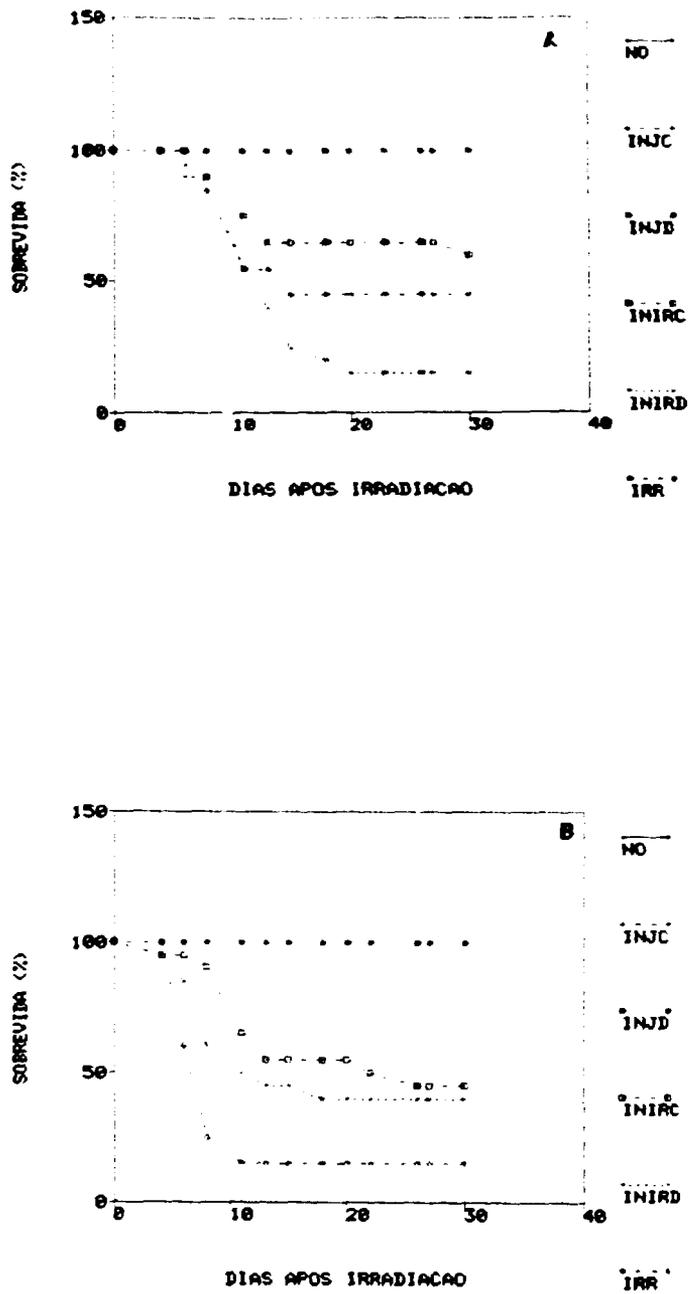


Figura 9 — Sobrevida de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJC), tratados com álcool (INJD), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

ação do próprio veículo (álcool etílico) na solução administrada. Quando tratamos com a solução etanólica, a sobrevivência das fêmeas foi de 15% após 30 dias da irradiação, muito inferior, portanto, aos 45% dos somente irradiados. Notou-se, que o veículo de diluição do DEM, solução de álcool etílico, demonstrou ter ação radiosensibilizadora (Fig. 9A). O efeito foi contrário, quando utilizamos machos, pois a sobrevivência dos injetados e irradiados foi de 40%, diante de 15% dos somente irradiados, conseqüentemente apontando aparentemente um efeito radioprotetor (Fig. 9B). Assim, tanto para animais machos quanto fêmeas, a ação do DEM diluído em álcool é de radioproteção, mesmo que o solvente apresente ação radioprotetora (machos) ou radiosensibilizadora (fêmeas).

4.2.2 Curvas de Peso Médio Corporal

A análise da curva de peso após tratamento com DEM em solução alcoólica, mostrou uma pequena perda de peso a partir do 3º dia e uma recuperação posterior por volta da segunda semana (Figs. 10A e 10B).

Os dados apresentados nas Figuras 10A e 10B para o peso médio de camundongos machos e fêmeas, injetados irradiados ou não, mostraram um comportamento similar, não havendo diferenças relevantes entre os diversos grupos além daquelas produzidas pela ação da radiação.

Para os animais tratados com álcool etílico e irradiados, ao analisarmos estatisticamente o peso médio, verificamos uma rápida recuperação para ambos os sexos. Nas fêmeas, os resultados apontam uma radiosensibilização aparente em relação aos

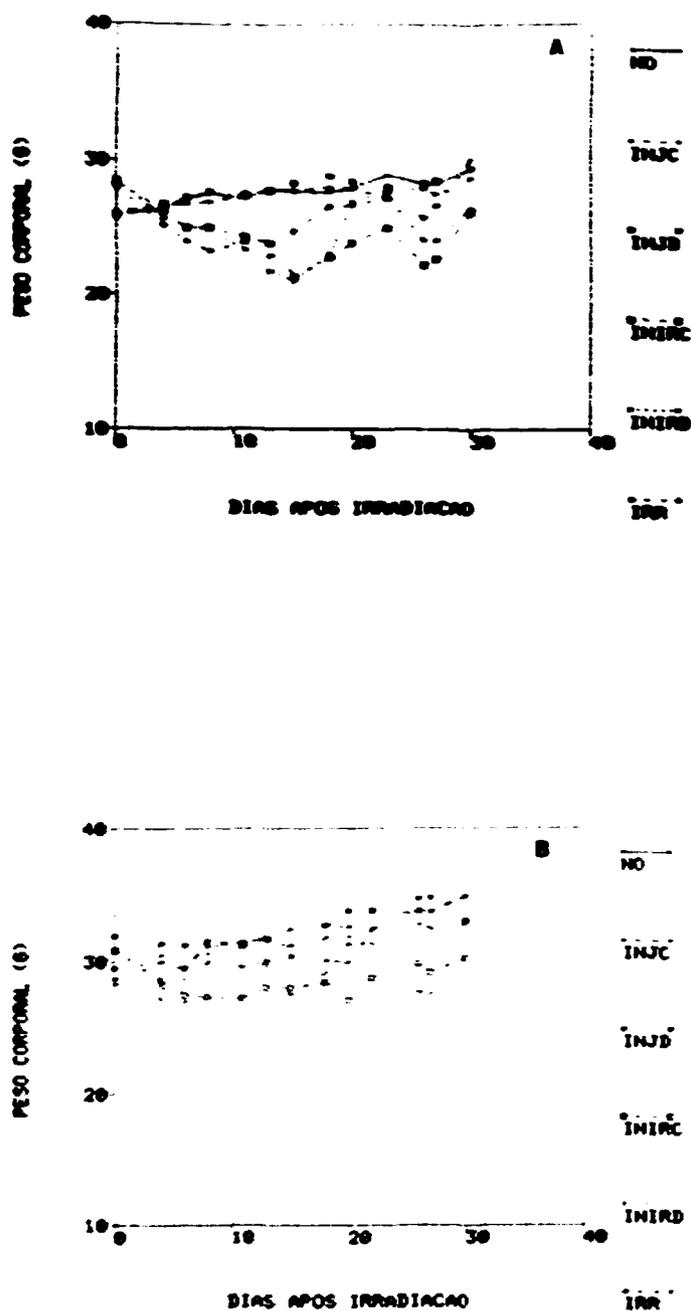


Figura 10 — Pesos médios dos camundongos em função do tempo após a irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), tratados com DEM (INJC), tratados com álcool (INJD), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).

A — Camundongos fêmeas
B — Camundongos machos

somente irradiados (Fig. 10A) e nos machos, uma possível radio-proteção (Fig. 10B).

4.2.3 Análise das Proteínas Séricas

- Proteína Total (PT): Embora tenha havido certa elevação desta fração protéica nos animais injetados, nenhum efeito estatisticamente significativo foi obtido em função do tempo após esse tratamento e entre os diversos grupos injetados, além daquele em relação aos controles (Figs. 11A e 11B).
- Albumina (alb): Verificou-se que ocorreu uma pequena diminuição no nível sérico no 79 dia após a irradiação. Contudo, quando comparou-se o tratamento aplicado aos machos e fêmeas foi observado que não houve diferença significativa de comportamento (Figs. 12A e 12B).
- Alfa Globulinas (α_1 e α_2): Notou-se uma constância da fração de globulina α_1 nas fêmeas em função do tempo após a irradiação e nos machos observou-se um declínio desta fração no 39 dia, em relação aos 19 e 79 dias, respectivamente (Figs. 13A e 13B). Pelo teste de DUNCAN, foram determinados comportamentos diversos em relação aos tratamentos aplicados, igualmente a outra fração de alfa globulina (α_2) (Figs. 14A e 14B).
- Beta Globulina (β): Ocorreu uma diminuição nesta fração nas fêmeas tratadas e irradiadas no 39 e 79 dias após a irradiação, mas o mesmo comportamento não foi notado entre os animais machos (Figs. 15A e 15B). Quando machos e fêmeas foram comparados, houve diferenças entre os diversos tratamentos dados em relação aos controles normais e aos somente irradiados.

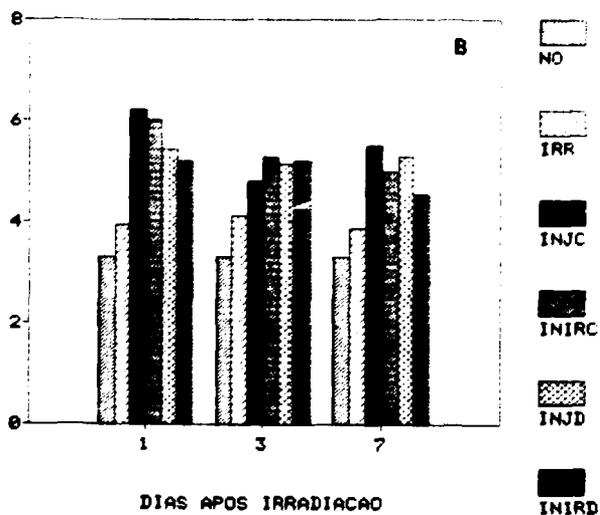
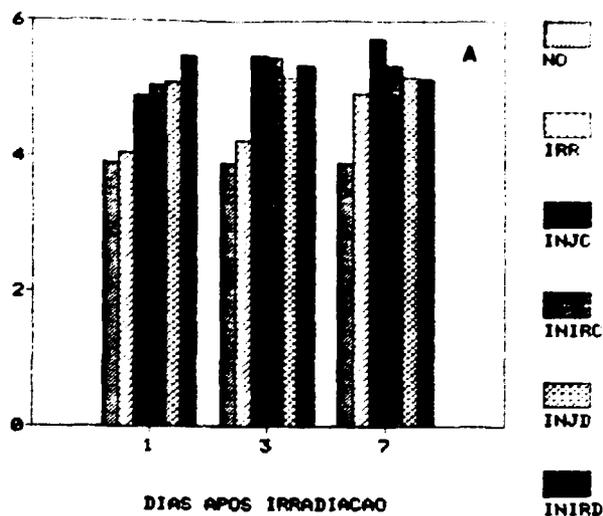


Figura 11 — Distribuição percentual da concentração das proteínas totais (CPT) dos camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJC), tratados com álcool (INJD), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

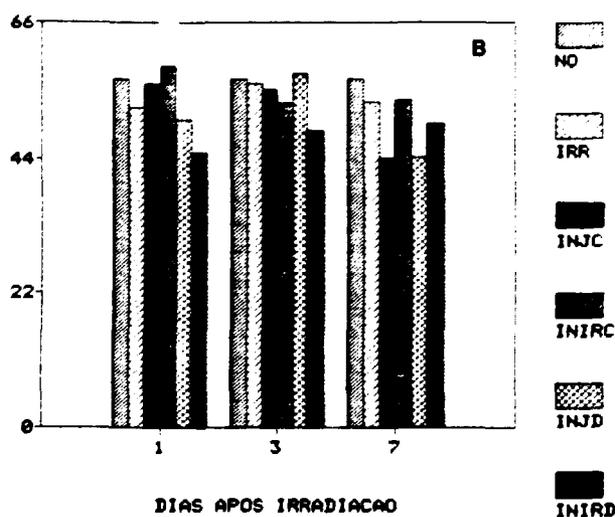
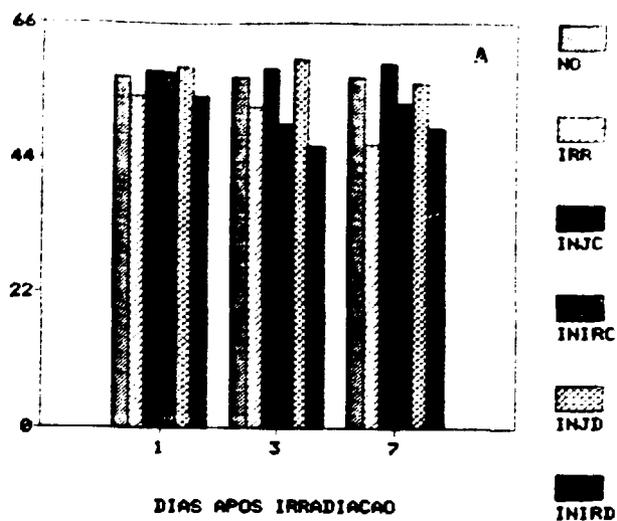


Figura 12 — Variação da concentração de albumina do soro de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co , em relação a CPT. Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJC), tratados com álcool (INJD), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).

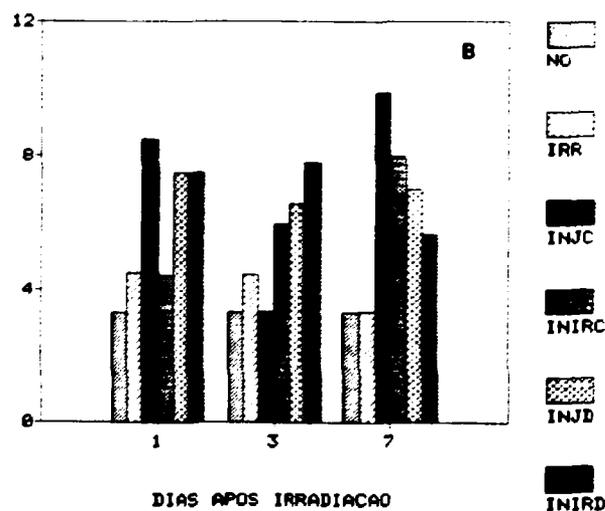
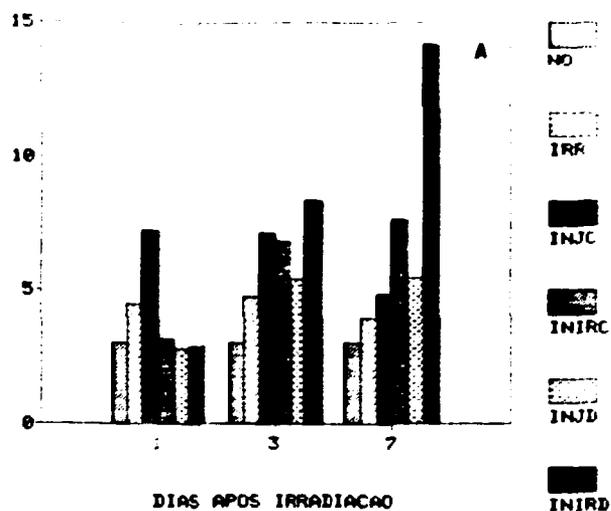


Figura 13 — Alteração da concentração da fração sérica da globulina alfa₁ (α_1) de camundongos em função do tempo após a irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com álcool (INJD), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).
A — Animais fêmeas
B — Animais machos

- Gama Globulina (γ): Mostrou-se um declínio por efeito de radiação, mas esta fração aparece aumentada nas fêmeas tratadas, nos diversos dias após a irradiação, enquanto que, para os machos notou-se um declínio somente no último dia após a irradiação (Figs. 16A e 16B), apontando comportamentos diferentes nos tratamentos aplicados para ambos os sexos.

4.2.4 Análise das Proteínas Séricas (álcool etílico)

- Proteína Total (PT): Mesmo apresentando alterações em relação aos controles nos dias de experimentação, pelo teste de DUNCAN, constatou-se que não houve efeitos diferentes nas proteínas totais em função do sexo e dia após a irradiação (Figs. 11A e 11B).
- Albumina (alb): Embora não sejam observadas mudanças muito perceptíveis no gráfico da fração sérica, os animais tratados apresentaram um comportamento significativamente diferente quanto ao tratamento aplicado e os dias após a irradiação (Figs. 12A e 12B).
- Alfa Globulinas (α_1 e α_2): O álcool na concentração utilizada 0,27%, mostrou um efeito modificador nos animais em estudo, observado nas frações protéicas de alfa globulinas (α_1 e α_2) (Figs. 13A e 13B, 14A e 14B).
- Beta Globulina (β): Verificou-se estatisticamente mudanças significativas nos animais tratados e irradiados, quando comparou-se machos e fêmeas. Nas fêmeas, ocorreu uma diminuição ao nível sérico, no 39 e 79 dias após a injeção e no 79 dia após a injeção e irradiação (Figs. 15A e 15B).

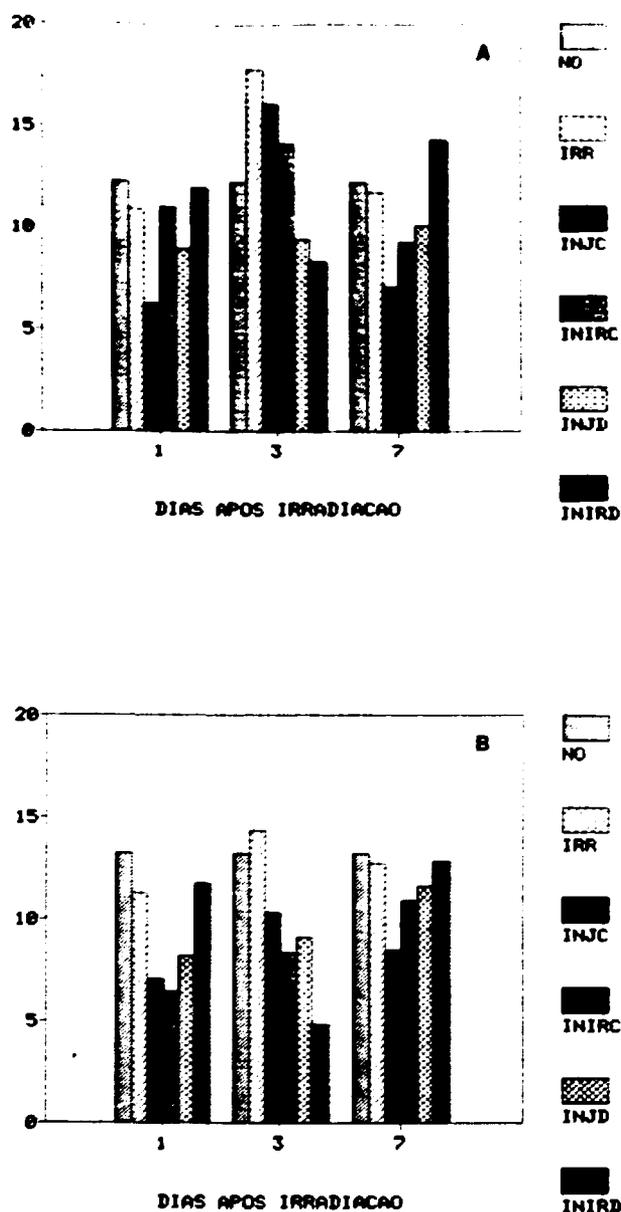


Figura 14 — Distribuição da concentração da globulina alfa₂ (α_2) de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co , relacionada a CPT. Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJC), tratados com álcool (INJD), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

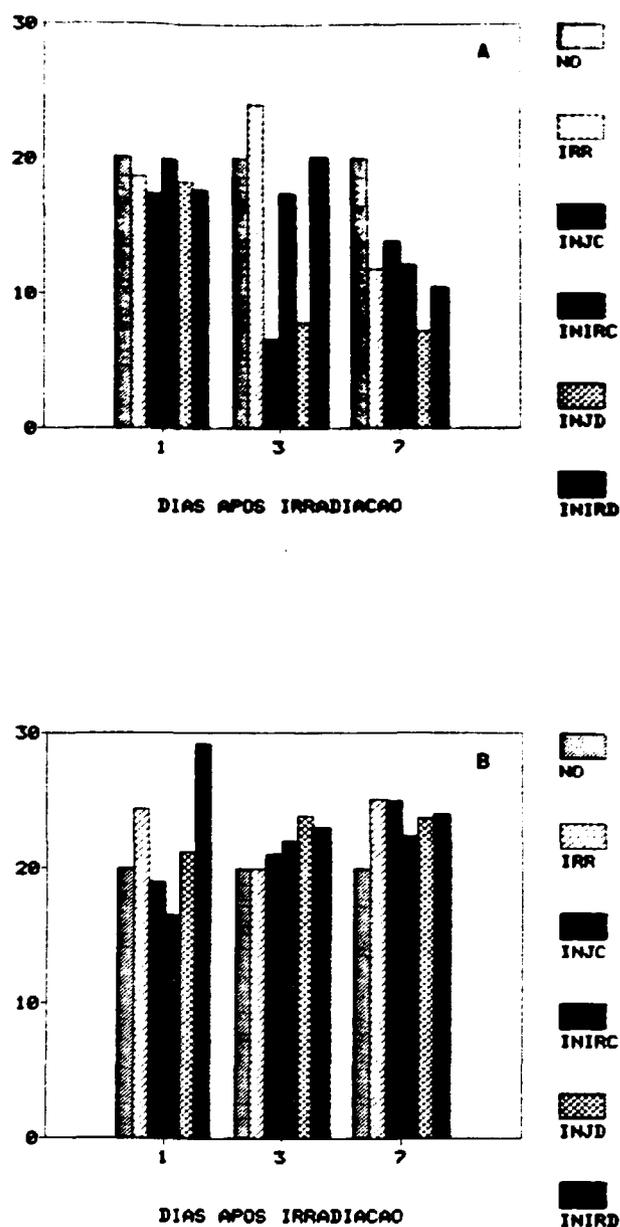


Figura 15 — Variação da concentração da fração sérica da beta globulina de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co , em relação a CPT. Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJC), tratados com álcool (INJD), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

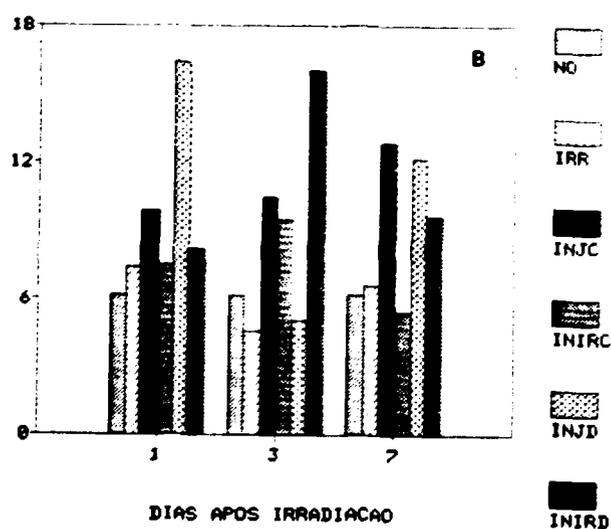
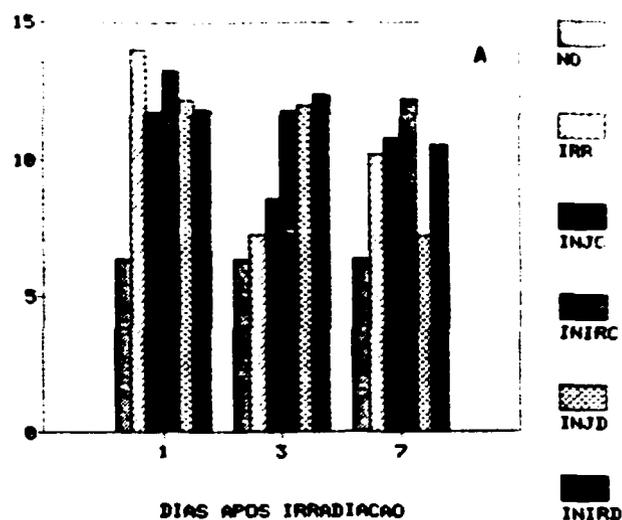


Figura 16 — Distribuição da concentração de gama globulina do soro de camundongos em função do tempo após a irradiação com 9 Gy de ^{60}Co relacionada a CPT. Controles normais (NO), irradiados (IRR), tratados com DEM (INJA), tratados com álcool (INJC), tratados com DEM e irradiados (INIRC), tratados com álcool e irradiados (INIRD).

A — Animais fêmeas

B — Animais machos

- Gama Globulina (γ): O álcool induziu um comportamento completamente diverso quando comparou-se machos e fêmeas. Observou-se para as fêmeas, valores aumentados logo após a injeção (1º dia), tendendo a normalidade ao 7º dia, efeito que se sobrepõe ao da radiação (Fig. 16A). Para os animais machos foi evidenciado um discreto declínio no 3º dia de experimentação (Fig. 16B), havendo diferenças em relação aos controles, mas não em função do tempo após a irradiação.

Procurou-se, neste trabalho, estudar o possível efeito de bloqueio da glutathiona endógena (GSH), na sensibilidade de camundongos, mediante a utilização do DEM diluído nos solventes óleo de amendoim e álcool etílico. Para isso, foram analisadas as taxas de sobrevivência, as curvas de peso corporal e os perfis das proteínas séricas após a irradiação com ^{60}Co .

Para estabelecer o efeito biológico de um determinado agente administrado ao organismo é necessário relacioná-lo com a dose desse agente no sistema específico em observação, mas isto apresenta inúmeros problemas. Com substâncias químicas há sempre incertezas em relação a difusão, penetração e possíveis mudanças na natureza da substância sob investigação, antes que as moléculas ativas atinjam o alvo sobre o qual elas agem. As drogas podem ligar-se de maneira desconhecida a macromoléculas ou a estruturas específicas dentro das células e podem ser transformadas por via metabólica.

No caso do estudo da influência de agentes químicos na radiosensibilidade de mamíferos, a dificuldade ainda é maior por causa da natureza da interação da radiação nos sistemas biológicos, cuja manifestação será o resultado de interações a níveis químico, físico e fisiológico.

Considera-se o ciclo redox da glutathiona como sendo a proteção primária contra os metabólitos tóxicos do oxigênio.

Uma elevação da relação GSSG/GSH nas células provou ser uma medida direta do estresse oxidativo em vários modelos experimentais de síndrome de choque, no trabalho desenvolvido por **NEMETH & BODA** (1989). Esses autores mostraram que o estresse oxidativo nos vários modelos de choque utilizados (isquemia, choque por endotoxina etc.) resultavam na oxidação da glutathiona no sangue.

De acordo com **MITCHELL et al** (1983), as concentrações de GSH intracelular foram diminuídas a menos de 5% dos valores controles quando foi utilizado DEM a 0,5 mM em células de mamíferos em cultura (células de ovário de hamster chinês - CHO), o que induziu uma radiosensibilização das células tanto em ar quanto sob condições de hipóxia. A concentração de 0,418 mM de DEM usada em nosso trabalho é a recomendada por **BUMP et al** (1982) e, é ligeiramente inferior. Mesmo assim, é possível supor a ocorrência de um bloqueio temporário, mas sensível do GSH disponível durante a irradiação. Assim sendo, poder-se-ia esperar uma mudança na resposta do organismo frente a ação do agente bloqueador do GSH.

Há descrição na literatura, que em células de mamíferos em cultura, a proteção química (contra o dano inferido pelos radicais livres produzidos pela radiação, ao incidir nas moléculas críticas) induzida pela GSH via doação de hidrogênio, era importante somente quando este competia com a reação do oxigênio (**VAN DER SCHANS et al**, 1986). Isto significa que a extensão na qual a depleção ou enriquecimento de GSH afeta a radiosensibilidade dependerá fortemente da concentração local de oxigênio. Neste contexto, deve-se considerar que, na maior parte das situações "in vivo", as concentrações locais de oxigênio são menores do que aquelas aplicadas às células em cultura, portanto, não é possí-

vel extrapolar conclusões diretamente dos sistemas "in vitro" para aqueles "in vivo".

Os dados obtidos a partir das curvas de sobrevivência dos camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co , quando submetidos ao tratamento prévio com DEM, apresentaram comportamentos diferentes em relação aos próprios solventes (óleo de amendoim e solução etanólica). Os resultados obtidos mostraram uma diminuição no número de animais sobreviventes à irradiação nos grupos previamente injetados com DEM em óleo de amendoim (0,418 mM). Contudo, quando alteramos a concentração do DEM em óleo de amendoim (4,18 mM), verificamos um certo efeito tóxico. Esse comportamento é bem explicado por HELD et al (1988), que descreve o DEM como sendo uma substância insolúvel em meio aquoso e cuja toxicidade limita o seu uso. Ele, trabalhando com cultura de células, teve melhores resultados com o Dimetilfumarato (DMF), que é mais solúvel e menos tóxico do que o DEM.

A escolha do solvente está relacionada aos trabalhos realizados por BUMP et al (1981 e 1982), onde o DEM foi administrado ip 720 mg/kg em óleo de amendoim, cujo sistema experimental foi tumores EMT₆ irradiados "in vivo". Segundo KOCH et al (1984), entretanto, a maior solubilidade do DEM apresenta-se em solução etanólica.

O óleo de amendoim mostrou ser um radioprotetor em nosso sistema, considerando o maior número de sobreviventes injetados e irradiados, em relação aos animais somente irradiados. Isto está de acordo com os resultados descritos por outros grupos, nos quais, por exemplo, ratos recebendo diariamente 10 mg de me-

til linoleato na dieta, apresentaram tempo de sobrevida aumentada, mas esse efeito benéfico não foi bem esclarecido (DEUEL et al, 1953). Por outro lado, a presença de linoleato foi capaz de reduzir a frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas em linfócitos "in vitro", quando administrado 1 hora após a exposição das células à radiação gama (NORMAN et al, 1988).

Contudo, quando o óleo de amendoim foi administrado junto com o DEM, houve um efeito radiosensibilizador preponderante da droga e não do próprio veículo. Isto comprova os dados da literatura, onde a depleção da glutathiona em células tumorais EMT₂ "in vivo" pelo DEM, a 20% dos valores controles, resultou numa radiosensibilização das células sob hipóxia (BUMP et al, 1981).

Radiosensibilizadores de células hipóxicas foram testados em ensaios clínicos em diversos países (Dinamarca, Grã-Bretanha, Japão, Estados Unidos da América). Em geral, os resultados destes ensaios têm sido desapontadores, fundamentalmente pela limitação decorrente da neurotoxicidade elevada desses compostos (nitro-imidazoles, tais como o misonidazole). A abordagem mais promissora que vem sendo testada é o acoplamento com bloqueadores da GSH (BROWN et al, 1984). A depleção de GSH teria também uma vantagem adicional: sensibilizar paralelamente células hipóxicas e anóxicas (SHRIEVE et al, 1985), já que mesmo havendo controvérsias, na maioria dos casos, esses bloqueadores são eficientes em células em cultura sob hipóxia (BUMP et al, 1981). Por sua vez, BUMP et al (1982), descreveram também, que a combinação do DEM com o misonidazole (MISO), produz um efeito radiosensibilizador (fator modificador de dose $2,0 \pm 0,2$). Assim, a eficácia clínica do MISO em tratamentos de câncer pela radiação, pode

ria ser melhorada pela combinação com drogas que depletam a glutathiona.

Quando tratamos os camundongos com DEM diluído em solução etanólica, verificamos que a droga apresenta um efeito não sensibilizador e até pelo contrário, aparentemente protegeu, "in vivo", denotando uma ação preponderante do veículo nos animais machos. KOCH et al (1984), trabalhando com células malignas de mamíferos em culturas hipóxicas, verificaram que 150 μ M do DEM diluído em álcool produzia efeito sensibilizador.

Os alcóois são bem conhecidos como agentes radioprotetores (BACQ & ALEXANDER, 1966), sendo observada a sua ação nas células, especialmente após prolongadas exposições ou a altas concentrações ao redor de 0,7 M. MOTHERSILL et al (1987) verificaram tanto um efeito transitório radioprotetor do etanol quanto um efeito radiosensibilizador pronunciado que podia ser induzido sob diferentes condições de cultura. Isto sugere mecanismos alternativo de ação do álcool que não podem ser explicados simplesmente pelas propriedades de aprisionamento de radicais hidroxila da molécula de etanol ou pela depleção do O_2 celular provocada pela oxidação metabólica do etanol a acetaldeído (HOLLAENDER, 1960).

Para os camundongos fêmeas, o álcool apresentou uma ação aparentemente de radiosensibilização. SEYMOUR et al (1987) comprovaram efeitos alternativos radioprotetor ou radiosensibilizador em culturas de CHO-K₁ expostas a elevados níveis de etanol. Esses efeitos poderiam estar relacionados a lise de membranas agravados pela exposição à radiação (MEDVEDEV et al, 1977 e ALPER, 1979). Este tipo de resposta à radiação é também encontra

do com lactato e análogos da glicose e inibidores da glicólise, o que reforça as evidências do envolvimento de um mecanismo que incluiria o metabolismo energético glicolítico na resposta a radiação de células tratadas previamente com etanol (SEYMOUR et al, 1987).

Quando tratamos camundongos machos com álcool verificamos um efeito aparente de radioproteção que não foi revertido pela presença do DEM. Outra explicação para esse efeito poderia ser o aproveitamento do etanol como substrato energético, o que estimularia a recuperação celular do dano da radiação (KIEFER, 1971; NISHIZAWA et al, 1979).

A partir de nossos resultados não é possível concluir o tipo de mecanismo ou os mecanismos que estariam envolvidos na radioproteção por etanol em machos concomitantemente com uma radiosensibilização nas fêmeas. No primeiro caso, a radioproteção do veículo foi mantida mesmo após a inclusão do DEM. Pelo contrário, no caso dos animais fêmeas, o efeito sensibilizador do álcool foi revertido quando adicionado o DEM. Este resultado é difícil de explicar, mas evidencia a importância do estado hormonal dos animais na resposta biológica à radiação.

A ação radioprotetora ou radiosensibilizadora de diferentes agentes pode tornar-se manifesta numa determinada faixa de dose, sem contudo, ser evidente em outros níveis. Da mesma maneira, o acompanhamento da ação da radiação nos sistemas biológicos, dependerá do intervalo de doses empregado. Segundo SURINI VASAN et al (1965), é possível avaliar os efeitos biológicos da radiação X em ratos irradiados com dose supra-letal, bem como a

ação de possíveis radiomodificadores, através da análise das mudanças nos níveis de frações das proteínas séricas: proteína total, fração de albumina e globulinas alfa, beta e gama. Nosso intuito foi testar um sistema semelhante, mas em camundongos irradiados com ^{60}Co e numa faixa de dose menor, que permitisse evidenciar tanto uma ação radioprotetora quanto radiosensibilizada, mediante o aumento ou a diminuição dos índices de sobrevivência.

FISCHER et al (1955) verificaram uma diminuição na concentração de albumina e γ -globulinas em soro de ratos irradiados, mas nenhuma alteração nas α e β -globulinas, 7 dias após a irradiação com 800 r (aproximadamente 8 Gy) com uma taxa de dose de 18,5 r/min. Por outro lado, DITZEL (1962) trabalhando com hamsters dourados, encontrou valores diminuídos de albumina e α_1 , α_2 e β -globulinas aumentados, 4 dias após 1500 r (aproximadamente 15 Gy) mas não verificou variações nos níveis de γ -globulinas.

SASSEN et al (1972) descreveram que a vida média da albumina plasmática de camundongos irradiados com 800 r (aproximadamente 8 Gy) e taxa de dose de 100 r/min, era menor em relação aos controles, mas também existia uma taxa de síntese aumentada principalmente 2 ou 3 dias após a irradiação. Isto explicaria, provavelmente, a persistência até o 39 dia de valores de albumina praticamente normais no soro, mas diminuídos extravascularmente.

SURINIVASAN et al (1955) observaram, nos primeiros dias após irradiação supra-letal, um aumento nas proteínas totais, uma diminuição nas frações de albumina e gama globulina e um aumento nas frações de alfa e beta globulinas. Nesse experimento, no 79 dia após a irradiação houve uma drástica diminuição nas pro

teínas totais. Alguns autores descreveram que o metabolismo da albumina podia ser protegido parcialmente por uma combinação de radioprotetores administrados em camundongos antes de serem irradiados com R-X (SASSEN et al, 1972). No entanto, esse comportamento foi diverso em ratos (FISCHER et al, 1956). REUTHER et al (1967), descreveram que a variação que ocorre na fração de gama globulinas podia estar relacionada ao dano extensivo no tecido linfóide e no sistema reticuloendotelial após irradiação de corpo inteiro.

As concentrações das frações de proteínas séricas obtidas no presente estudo, apresentaram poucas alterações estatisticamente significativas além daquelas atribuíveis a ação da radiação, confirmando parcialmente dados de outros autores.

Para os animais tratados com o DEM diluído em óleo de amendoim e irradiados, nenhuma alteração significativa foi notada para as proteínas totais, albumina e frações de α -globulinas. Contudo, as frações de β e γ -globulinas séricas tiveram pequenas modificações quando comparamos camundongos machos e fêmeas. Observou-se pequena diminuição da β -globulina no 7º dia após a irradiação, tanto nos machos quanto nas fêmeas e a γ -globulina diminuiu no 3º dia para as fêmeas e nos 1º e 3º dias nos machos, havendo uma recuperação posterior. Quando administramos o DEM dissolvido em solução etanólica, pequenas alterações foram evidenciadas. Não houve nenhum efeito nas proteínas totais e na albumina, porém houve aparentemente pequenas diminuições nos níveis das outras frações séricas. As α -globulinas apresentaram um pequeno declínio no 3º dia para os machos, as β -globulinas diminuíram levemente nos 3º e 7º dias após a irradiação nas fêmeas, o mesmo não ocorrendo

nas γ -globulinas que apresentaram um pequeno aumento nas fêmeas, e uma diminuição aparente nos machos, no último dia após a irradiação.

Houve pequenas alterações nas proteínas séricas, observadas quando administramos o veículo, solução alcoólica, nos animais machos e fêmeas. Para as fêmeas, foi notado um aumento das α_1 e α_2 -globulinas e uma pequena diminuição das β -globulinas no 7º dia após a irradiação e, para as gamas ocorreram pequenas modificações. Para os camundongos machos, diminuíram as α_1 -globulinas no 7º dia e, α_2 -globulinas no 3º dia após a irradiação, respectivamente e, as γ -globulinas aumentaram aparentemente no 3º dia após o experimento, não ocorrendo nenhuma variação significativa nas proteínas totais, albumina e beta globulina.

Contudo, essas variações, por não serem sistemáticas, não podem ser relacionadas aos maiores ou menores índices de sobrevivência obtidos em cada caso, podendo ser atribuídas à complexidade do processo de manifestação do dano por radiação, aos mecanismos de radioproteção endógena envolvidos, bem como aos fatores que afetam a biosíntese e degradação das proteínas séricas.

- 1 O tratamento com DEM antes da irradiação, aparentemente foi capaz de bloquear parcialmente os níveis de GSH endógena, por quanto houve aumento da radiosensibilidade dos camundongos quando injetados previamente.
- 2 A escolha do solvente a ser utilizado para estudos de radioprotetores ou radiosensibilizadores é de importância fundamental para a manifestação do fenômeno em estudo.
- 3 O óleo de amendoim quando injetado ip previamente a irradiação, apresentou ação radioprotetora em camundongos machos.
- 4 Solução etanólica a 0,27% foi capaz de induzir um aumento da sensibilidade frente a irradiação em camundongos fêmeas, mas uma diminuição nos machos e não permitiu a manifestação da ação do DEM quando utilizada como veículo.
- 5 Nas condições testadas não houve correlação entre as modificações na sobrevida e nos níveis de proteínas séricas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.E. Chemical radiosensitization of hypoxia cells. Br. Med.Bull., 29: 48-53, 1972.
- AKERBOOM, T.P.M.; BILZER, M.; SIES, H. Competition between transport of glutathione disulfide (GSSG) and glutathione S-conjugates from perfused rat liver into bile. F.E.B.S.LETT, 140: 73-76, 1982.
- ALPER, T. Cellular Radiobiology. In: ALPER, T. Cambridge University Press, 1979.
- BACQ, Z.M. & ALEXANDER, P. Fundamental of Radiobiology. Oxford -Pergamon, 1966.
- BEGG, A.C. & TERRY, N.H.A. Modification of stromal radiosensitivity by misonidazole and WR-2721. Br.J.Radiol., 56.
- BIAGLOW, J.E.; VARNES, M.E.; ASTOR, M.; MITCHELL, J.; RUSSO, A. Intracellular thiols: involvement in drug metabolism and radiation response. In: NYGAARD, O.F. & SIMIC, M.G. Radioprotectors and anticarcinogens. Academic Press, eds, 203-237, 1983.
- BIAGLOW, J.E.; VARNES, M.E.; CLARK, E.P.; EPP, E.R. The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. Radiation Research, 95: 437-455, 1983.
- BIAGLOW, J.E.; MORSE-GUADID, M.; VARNES, M.E.; CLARK, E.P.; EPP, E.R. & MITCHELL, J.B. Non-protein thiols and radiation response of A549 human carcinoma cell. Int.J.Radiat.Biol., 44:489, 1983.
- BOREK, C.; DONAHUE, L.; BIAGLOW, J.E. Mechanism for selenium protection against radiation carcinogenesis. Radiat.Res., 1984.

- BOYD, S.C.; SESAME, H.A.; BOYD, M.R. High concentrations of glutathione in glandular stomach: Possible implications of carcinogenesis. Science, 205: 1010-1012, 1979.
- BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L.F. Enzyme-catalysed conjugations of glutathione with unsaturated compounds. Biochem.J., 104: 95-102, 1967.
- BROWN, J.M.; BIAGLOW, J.E.; HALL, E.J.; KINSELLA, T.J.; PHILLIPS, T.I.; URTASUN, R.C.; UTLEY, J.F.; YUHAS, J.M. Sensitizers and protectors to radiation and chemotherapeutic drugs. Cancer Treat. Symposia, 1, 1984.
- BUMP, E.A.; YU, N.Y.; BROWN, J.M. The use of drugs which deplete intracellular glutathione in hypoxic cell radiosensitization. Int.J.Radiation.Oncology.Biol.Phys., 8: 439-442, 1981.
- _____. Radiosensitization of hypoxic tumor cells of depletion of intracellular glutathione. Science, 217, 1982.
- BUMP, E.A.; YU, N.Y.; TAYLOR, Y.C.; BROWN, J.M.; TRAVIS, E.L.; BOYD, M.R. Radiosensitization and chemosensitization by diethylmaleate. In: NYGAARD, O.F.; SIMIC, M.G. Radioprotectors and anticarcinogens. Academic Press, eds, N.Y., 297-325, 1983.
- CASARET, A.P. Radiation Biology. Engliwoodcliffs, N.J., Prentice-Hall, 1968. c.4, p.57-89.
- DEUEL, H.J.; CHENG, A.L.S.; KRYDER, G.D.; BINGEMANN, M.E. The protective effect against X-irradiation of methyl lineolate in the rat. Science, 117: 254-255, 1953.
- DITZEL, J. The effect of total-body X-irradiation on serum proteins in the hamster. Radiation Research, 5: 694-702, 1962.
- FISCHER, M.A.; MAGEE, M.Z.; COULTER, E.P. Studies on the Serum Proteins of the X-irradiated rat. Arc.Biochem.Biophys., 56: 66-75, 1955.

- FLOHE, H.; BENOHR, C.H.; SIES, H.; WALLER, H.D.; WENDEL, A. Glutathione. Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry, George Thieme, Stuttgart, Germany, 1974.
- FREIRE - MAIA, N. Radiogenética Humana. Edgard-Blucher, ed, 1972.
- GOYAL, R.; TARDIF, R.; BRODEUR, J. Influence of a cysteine prodrug L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid, on the urinary elimination of mercapturic acids of ethylene oxide, dibromoethane, and acrylonitrile: a dose-effect study. Can.J.Physiol.Pharmacol., 67, 1989.
- GRIFFITH, O.W.; MEISTER, A. Glutathione: interorgan translocation, turnover/and metabolism. Procl.Natl.Acad.Sci.USA, 76: 5606-5610, 1979.
- GROSCH, S.G. & HOPWOOD, L.E. Modifiable and nonmodifiable damage, protective measures, and regeneration processes. In: GROSCH, D. S. & HOPWOOD, L.E. Biological Effects of Radiations. 2nd ed., Academic Press, ed, 1979.
- HALL, E.J. Chemical and Pharmacological modifiers. In: HALL, E. J. Radiobiol.for the Radiol., 2nd ed., Loal, ed, 1978. p.172-84.
- HELD, K.D.; EPP, E.R.; CLARK, E.P.; BIAGLOW, J.E. Effect of dimethylfumarate on the radiation sensitivity of mammalian cells in vitro. Radiation Research, 115: 495-502, 1988.
- HOLLAENDER, A. Radiation protection and recovery. Pergamon Press-Oxford, 1979.
- KAPPUS, H. & SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. Experientia, 37: 1233-1240, 1981.

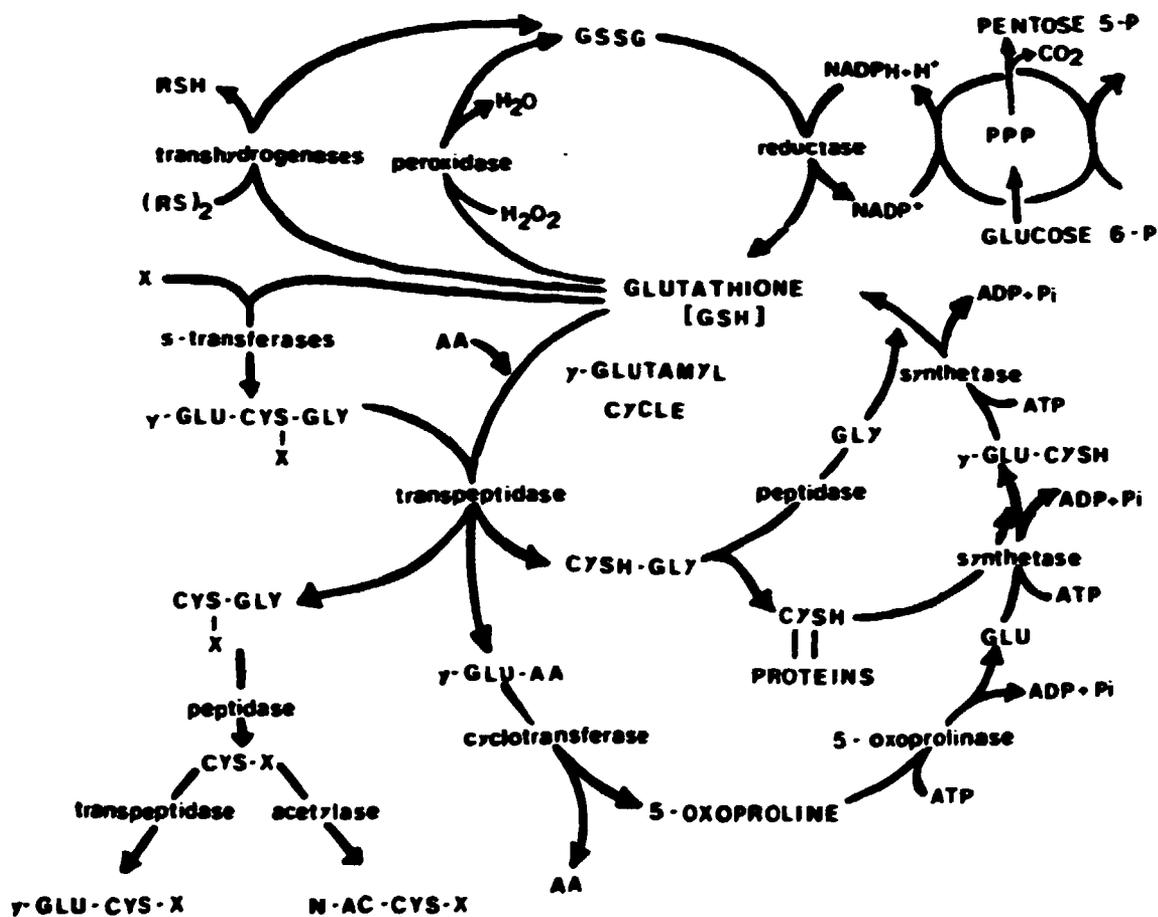
- KIESER, J. The importance of cellular energy metabolism for the sparing effect of dose fractionation with electrons and ultraviolet light. International Journal of Radiation Biology, 20: 325-336, 1971.
- KOCH, C.J.; SOBBE, C.C.; BUMP, E.A. The effect on the km for radiosensitization at 0°C of thiol depletion by diethylmaleate pretreatment: quantitative differences found using the radiation sensitizing agent misonidazole or oxygen. Radiation Research, 98: 141-153, 1984.
- KOROPATNICK, J.; LEIBRANOT, M.; CHERIAN, M.G. Organ-specific metallothionein induction in mice by X-irradiation. Radiation Research, 119: 356-365, 1989.
- KOSOWER, N.S. & KOSOWER, E.M. The glutathione status of cells. Int.Rev.Cytol., 54: 109-160, 1978.
- LEWIS, K.R. & JOHN, B. O núcleo e o cromossomo. In: JOHN, B. & LEWIS, K.R. Hierarquia cromossômica. LTC/EDUSP, ed, 1979.
- LIVESEY, J.C. & REDD, D.J. Measurement of glutathione-protein mixed disulfides. Int. J. Radiat.Oncol.Biol.Phys., 10 suppl., 1984.
- MATSUBARA, J. Metallothionein induction: A measure of radioprotective action. Poster Presentation. Health, 55(2):433-436, 1988.
- McINTYRE, T.M. & CURTHOYS, N.P. The interorgan metabolism of glutathione. Int.J.Biochem., 12: 545-551, 1980.
- MEDVEDEV, B.I.; FUTODIENKO, Yu U.; YAGUVHINSKY, L.S.; KUVIN, M. A. The role of biomembrane lipids in the molecular mechanism of ion transport radiation damage. In: Proceeding of the 4th International Congress of the IRPA, Paris (IRPA, FONTEWAY aux ROSES, France): 217-219, 1977.

- MEISTER, A. & ANDERSON, M.I. Glutathione. Ann.Rev.Biochem., 52: 711-760, 1983.
- MEISTER, A. Glutathione metabolism and transport. In: MEISTER, A. Radioprotectors and anticarcinogens. Academia, ed, 121-167, 1983.
- MENEGHINI, R. Cuidado com os radicais livres. Ciênc.Hoje, 18 (3): 8-10, 1985.
- _____. A toxicidade do oxigênio. Ciênc.Hoje, 28(5): 57-62, 1987.
- MEREDITH, M.J. & REED, D.J. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. J.Biol.Chem., 257:3747-3753, 1982.
- MEYERS, C.F.; KATKI, A.; TRAVIS, E. Effect of tocopherol and selenium on defenses against reactive oxygen species and their effect on radiation sensitivity. Acad.Sci., 329: 419-426, 1982.
- MITCHELL, J.B.; RUSSO, A.; BIAGLOW, J.E.; McPHERSON, S. Cellular glutathione depletion by diethylmaleate or buthionine sulfoximine. No effect of glutathione depletion on the oxygen enhancement ratio. Radiat.Res., 96: 422, 1983.
- MONTHERSID, C.; SEYMOUR, C.B.; MORIARTY, M.J. Radiobiologic response of CHO-K₁ cells from gamma radiation damage. Acta Radiologica Oncology, 1987.
- MOURA, R.A.A.; PURCHIO, A.; ROSSI, A.L.R.; STRUFALDI, B.; NOGUEIRA, D.M.; HOXTER, G.; COUTINHO, J.O.; ALMEIDA, T.V. Técnicas de Laboratório. In: MOURA, R.A.A., 2ª ed., Livraria Atheneu, ed, 1982.
- NÉMETH, I. & BODA, D. The ratio of oxidized/reduced glutathione as an index of oxidative stress in various experimental models of shock syndrome. Biomed.Biochem.Acta., 48(2/3): 53-57, 1989.

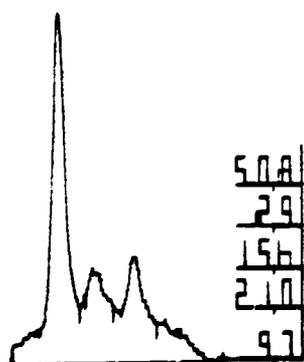
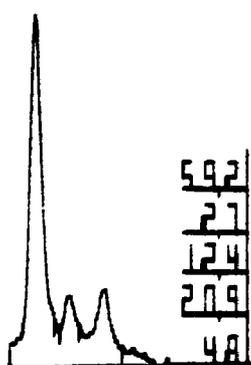
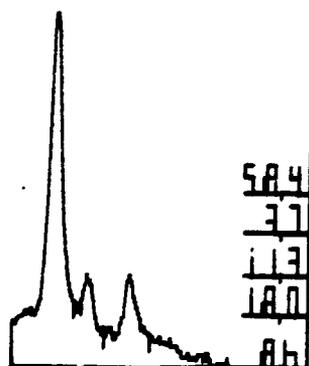
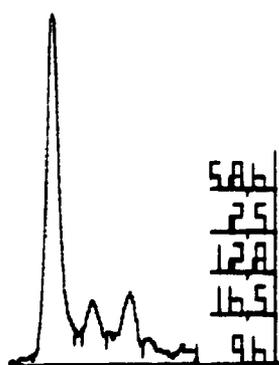
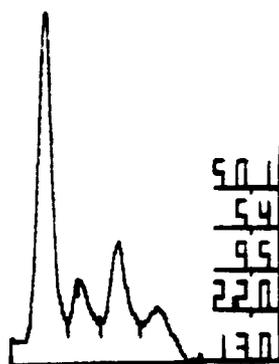
- NISHIVAWA, J.; SATO, C.; MORITA, T. Alteration in the survival of X-irradiated cells by 2,4-dinitro-phenol depending on ATP deprivation. International Journal of Radiation Biology, 35: 15-22, 1979.
- NORMAN, A.; McBRIDE, W.H.; BENNETT, L.R.; MELLO, R.S.; IWAMOTO, K.; HIDMI, H. Postirradiation protection of chromosomes by linoleate. Int.J.Radiat.Biol., 54(4): 521-524, 1988.
- ORMSTAD, K.; LASTLON, T.; ORRENIUS. Translocation of aminoacids and glutathione studied with the perfused kidney and isolated renal cells. F.E.B.S.LETT., 112: 55-59, 1980.
- ORRENIUS, S.; ORMSTAD, K.; JEWELL, S. Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells. Fed.Proc., 42: 3177-3188, 1983.
- REED, D.J. & MEREDITH, M.J. Glutathione conjugation systems and drug disposition. In: ROE, D.A.; CAMPBELL, T.C. Drugs and Nutrients, (6): 179-224, N.Y., 1984.
- REED, D.J.; ORRENIUS, S. The role of methionine in glutathione biosynthesis by isolated hepatocytes. Biochem.Biophys.Res.Comm., 77: 1257-1264, 1977.
- REUTER, A.; SASSEN, A.; KENNES, F. Incorporation of labeled aminoacids in serum and tissue proteins from normal and X-irradiated mice. Radiat.Res., 30: 445-454, 1967.
- SAS - USER'S GUIDE: Statistic, version S.Cary, NC, SAS Institute, 1985.
- SASSEN, A.; KENNES, F.; REUTER, A.; TELLA, M. Catabolism of serum albumin in X-irradiated mice. Radiat.Res., 52: 193 - 203, 1972.
- SHRIEVE, D.; DENEKAMP, J.; MINCHINTON, A.I. Effects of glutathione by buthionine sulfoximine on radiosensitization by oxygen and misonidazole in vitro. Radiation Research, 102: 283-294, 1985.

- SIES, H.; WEFERS, H.; GRAF, P.; AKERBOOM, T.P.M. Hepatic hydroperoxide metabolism: studies on redox cycling and generation of H_2O_2 . In: HARRIS, R.A.; CORNELL, N.W., eds. Isolation, Characterization, and Use of hepatocytes. Elsevier, New York, 341-348, 1983.
- SURINIVASAN, M.N.; BASU, S.K.; GHOSE, A. Effect of chemical radioprotectors on serum proteins of rats exposed to gamma radiation. Indian Journal of Experimental Biology, 23:490-492, 1985.
- TOWLE, L.R. & PIRRO, J.P. A glutathione depletion by diethylmaleate and buthione-sulfoximine. Its effect on the response of mammalian cells to hyperthermia. Radiation Research Society, 32nd ed., 1984.
- TSAO, B. & CURTHOYS, N.P. The absolute asymmetry of orientation of γ -glutamyltranspeptidase and aminopeptidase on the external surface of the rat renal brush border membrane. J.Biol.Chem., 255: 7708-7711, 1980.
- VAN DER SCHANS, O. Vos; ROOS-VERHEIJ, W.S.; LOHMAN, P.H.M. The influence of oxygen on the induction of radiation damage in DNA in mammalian cells after sensitization by intracellular glutathione depletion. GSH and oxygen concentration. Int.J. Radiat.Biol., 50(3): 453-465, 1986.
- WILLIAMSON, J.M.; BOTTCHEER, A.; MEISTER, A. Intracellular delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. Proc.Natl.Acad.Sci., 79: 6246, 1982.
- WINDHOLZ, M.; EUDAVARI, S.; STROUMTSOS, L.Y.; FERTIGO, M.N. The Merck Index. Merck & Co. Inc., Rahway, 1976.
- YUHAS, J.M.; SPELLMAN, J.M.; CULO, F. The role of WR2721 in radiotherapy and/or chemotherapy. Cancer Clic.Trials.B., 211-216, 1980.

APÉNDICE

METABOLISMO DA GLUTATIONA


MODELO DE PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS



Camundongos fêmeas:

a. Controle

b. Óleo de amendoim

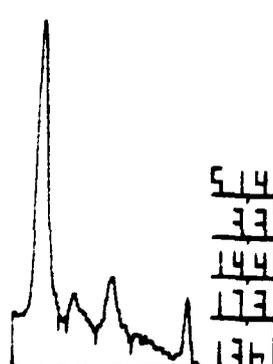
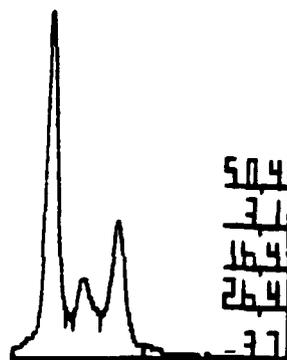
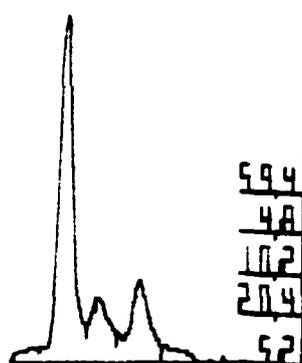
c. DEM

d. Óleo de amendoim + IRR

e. DEM + IRR

f. Irrradiado

MODELO DE PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS



Camundinhos machos:

a. Controle

b. Óleo de amendoim

c. DEM

d. Óleo de amendoim + IRR

e. DEM + IRR

f. Irrradiado