

EFEITO DA RADIAÇÃO DE ^{60}Co EM CÉLULAS PERITONEAIS

Anna Lucia C. H. Villavicencio
Nêlida Lucia del Mastro

Divisão de Radiobiologia
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Comissão Nacional de Energia Nuclear
São Paulo

SUMÁRIO

Este trabalho mostra como o efeito da irradiação gama de ^{60}Co modifica o nível das células peritoneais de camundongos albinos. As células foram obtidas de exudato peritoneal, fixadas e estocadas em ácido acético glacial a 30% contendo 0.5% de cristal violeta. Nos exudatos dos animais testemunhas e irradiados foram feitas análises e contagens dos diferentes tipos celulares nos tempos 1 hora, 3 dias e 6 dias após irradiação com 9.0 Gy. Todas as células da população do exudato peritoneal mostram uma diminuição 3 dias após a irradiação com 9.0 Gy mas as diferentes populações celulares decrescem em proporções desiguais. Os dados reafirmam a discrepância na radiosensibilidade das diversas células peritoneais.

ABSTRACT

This work deals with the effect of ^{60}Co gamma irradiation on the levels and quality of peritoneal cells of albino mice. The cells were obtained from peritoneal exudate, fixed and stained in 30% glacial acetic acid containing 0.5% crystal violet. On exudates from irradiated and control animals the qualitative analysis and the counting of different cell populations were performed one hour, three days and six days after irradiation with 9 Gy. All the cell populations from the peritoneal exudate shown a decrease 3 days after the irradiation with 9.0 Gy but the different cellular populations diminished in unlike proportions. The data reaffirm the discrepancy in radiosensitivity of the diverse peritoneal cell populations.

INTRODUÇÃO

Os efeitos da radiação podem ser úteis para a preservação da vida ou deletérios. Por isso, é importante conhecer as ações da radiação sobre células, tecidos e organismos. A radiação incidindo sobre um organismo atinge simultaneamente diversos sistemas bioquímicos e cada um pode apresentar uma resposta diferente e uma sensibilidade diversa à radiação(3), podendo surgir diversos tipos de lesões. Os efeitos nas células não são de modo algum exclusivos da radiação e se assemelham às alterações produzidas por uma variedade de outros agentes físicos e químicos.

Os linfócitos são células muito sensíveis à radiação ionizante. É conhecido que após a irradiação de corpo inteiro, estas células são rapidamente diminuídas na circulação(5). Fagócitos mononucleares do sangue periférico são geralmente considerados ser resistentes à radiação(2). Os monócitos do sangue possuem a capacidade de migrar em resposta a fatores quimiotáticos e transformam-se em macrófagos(2,7,8). Os macrófagos, que variam muito em tamanho e forma, são as primeiras formas de defesa do organismo, uma vez que nos tecidos os monócitos evoluem para locais anatômicos, incluindo a cavidade peritoneal. Além disso, os macrófagos de certos tecidos, tais como os da cavidade peritoneal e do pulmão, proliferam quando estimulados apropriadamente(1). Em condições fisiológicas, o mecanismo principal da renovação ainda não está totalmente esclarecido, se é decorrente da proliferação dos macrófagos existentes ou pela migração dos monócitos do sangue(8). Sabe-se há décadas que os macrófagos de animais infectados com certos microrganismos diferem morfológicamente e metabolicamente dos macrófagos normais. Os fagócitos mononucleares podem ficar ativados pela exposição às linfocinas provenientes de linfócitos T sensibilizados ou pela ação de endotoxinas bacterianas(8). As células de mamíferos são ativadas e afetadas pela ação da irradiação "in vivo" ou "in vitro" e o processo de ativação de macrófagos pode ser considerado como consequência da irradiação do organismo, provavelmente de maneira indireta, talvez pelo estímulo da fagocitose de produtos de degradação formados como consequência da interação da radiação nos tecidos. É geralmente aceito que os macrófagos são relativa-

mente radioresistentes quando sua capacidade funcional é medida imediatamente após a irradiação(4). Entretanto, estudos tem mostrado que doses de 0,5 a 0,8 Gy podem produzir trocas de tempo-dependência na função e crescimento dos macrófagos. Há estudos que mostram que monócitos cultivados, após quatro dias de irradiação são reduzidos significativamente com doses de 5,0 Gy ou maiores(4).

O presente trabalho visa estabelecer a relativa radiosensibilidade de diversos tipos celulares presentes no exudato peritoneal de camundongos irradiados mediante a contagem diferencial das diferentes populações de células a diversos tempos após irradiação.

MATERIAL E MÉTODOS

- Animais

Foram utilizados camundongos albinos do biotério do IPEN, machos com idades variando de 7 a 12 semanas e peso corporal inicial oscilando entre 22 e 27 gramas, os grupos foram constituídos a partir de ninhadas simultâneas, da seguinte forma:

Lotes de animais testemunhas para cada dia estabelecido

Lotes de animais irradiados também para cada dia pré-estabelecido

Estes animais foram alojados em gaiolas metálicas para camundongos, sem restrição de água e dieta usual.

- Obtenção das Células do Exudato Peritoneal

No estudo da variação dos diferentes tipos celulares encontrados na cavidade peritoneal, foram observados os seguintes tipos de células:

- . Fagócitos Mononucleares (Macrófagos + Mononucleares)
- . Macrófagos
- . Mononucleares (Monócitos + Linfócitos)
- . Polimorfonucleares (Eosinófilos, Neutrófilos, Basófilos)
- . Mastócitos

Para cada um dos grupos formados, convencionalmente estabelecidos como A e B, descritos anteriormente, foram colhidas amostras de exudato peritoneal nos tempos:

t 0: No dia da irradiação (uma hora após)

t 3: Três dias após a irradiação

t 6: Seis dias após a irradiação

Para cada ponto foi computado o resultado da contagem de células provenientes de 5 animais. A colheita do exudato peritoneal foi realizada posteriormente a injeção i.p. de 3 ml de solução fisiológica heparinizada em animais anestesiados, sacrificados e exanguinados. Após leve massagem no abdome durante alguns minutos, foi colhido 0,9 ml do exudato em tubos de plástico contendo 0,1 ml do fixador e corante cristal violeta (0,5% de cristal violeta dissolvido em ácido acético glacial a 30%). As amostras colhidas foram guardadas em geladeira até o momento da contagem e identificação das células.

- Quantificação e Qualificação das Células

A contagem das células totais foi realizada em câmara de Neubauer. O total das células encontradas foi multiplicado pelo fator de câmara $\times 10^4$, o que determina a quantidade de células por 1 ml.

A análise diferencial foi realizada colocando-se alíquotas do material sobre lâminas recobrimo-as com lamínulas. Foram contadas 200 células, utilizando-se o método de varredura em ziguezague, e registradas as correspondentes porcentuais de cada população celular. O valor absoluto de cada tipo celular foi obtido mediante a relação com o número de células totais multiplicados pela porcentagem encontrada de cada tipo e dividido por cem, obtendo-se desta forma o total de células peritoneais de cada tipo.

- Irradiação dos Animais

A irradiação foi efetuada em uma fonte gama de ^{60}Co . com uma taxa de dose média de 375 Gy/h. Irradiou-se 3 animais por vez, dentro de uma câmara de papelão de 9 cm de diâmetro e 18 cm de altura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos camundongos expostos à radiação de corpo inteiro com doses de 9 Gy de radiação gama, foram observadas particularmente as

alterações ocorridas na população celular de exudato peritoneal de 3 grupos diferentes de animais.

Alguns lotes de animais utilizados apresentaram um nível inicial bem mais alto de macrófagos. Isto sugere que estes animais tenham sido submetidos a estímulos outros por exemplo parasitos usuais em animais de laboratório, onde a ativação dos macrófagos já tivesse sido desencadeada.

A fig. 1-A e fig. 1-B, nos mostra, tanto nos animais testemunhas durante todo experimento como nos animais no dia de irradiação, que o número de células monoculares é mais alto que o de os macrófagos, sugerindo assim que estes não foram previamente estimulados. Já ao terceiro dia após irradiação, há um aumento relativo dos macrófagos e uma diminuição dos mononucleares, destacando-se os macrófagos por suas estruturas observadas microscópicamente bem mais vacuolizadas e típicas de células ativadas. Nota-se também uma queda no número total das células de todos os tipos observados com exceção dos mastócitos que não se alteram no período de avaliação.

Para os animais do grupo 2, observando a fig. 2-A e 2-B nota-se que em relação aos seus próprios testemunhas, os macrófagos inicialmente estariam em maior número em relação aos mononucleares, indicando um estímulo prévio desta células. Ao 3º dia de irradiação observa-se que há uma queda significativa de todos os tipos celulares com exceção dos mastócitos novamente, neste período. Ao 6º dia da irradiação há uma tendência de recuperação do nº de células.

No grupo 3 observando-se os resultados obtidos representados nas figuras 3-A e 3-B, verificamos mais uma vez uma queda de modo geral das células do exudato peritoneal estudadas, com exceção mais uma vez das mastócitos, embora observa-se neste grupo, tal como no grupo 1, que inicialmente os mononucleares estão em maior quantidade que os macrófagos, ao 3º dia decaem os mononucleares e os polimorfonucleares e os macrófagos permanece quase igual ao seu nº inicial. Observações microscópicas porém nos mostra este tipo celular com características bem mais evidentes de estimulação por seus grandes vacúolos e forma característica. Mesmo ao 6º dia de irradiação porém, neste grupo as células em estudo não tenderam a re-

cuperação de seus valores iniciais.

A contagem de células peritoneais em animais de laboratório como o camundongo, poderia vir a ser utilizada para a estabelecer uma correlação entre a dose de radiação aplicada e a resposta biológica do organismo como um todo. As mudanças nos níveis das diversas populações celulares examinadas, produzidas pela interação da radiação ionizante nos tecidos, caracterizam a diversidade de radiosensibilidade entre elas. No caso dos macrófagos, as mudanças ocorridas dizem respeito ao número e ao aspecto morfológico que traduz as alterações produzidas pelas consequências bioquímicas da irradiação. Neste caso, a irradiação produzirá uma ativação de macrófagos semelhante à que acontece como consequência de estímulos imunológicos. Por outro lado, a estimulação imunológica prévia modificaria a radiosensibilidade das células (Tabela 1). Isso vai ao encontro das evidências que mostram semelhança de espécies oxidadas de oxigênio envolvidas em processos tais como inflamação, interação da radiação ionizante nos tecidos vivos e a própria respiração aeróbica(6).

Tabela 1 - Porcentagem dos diversos tipos celulares remanescentes no exudato peritoneal 6 dias após irradiação dos camundongos em relação aos valores obtidos no dia da irradiação.

T I P O C E L U L A R	G R U P O S		
	1	2	3
CÉLULAS TOTAIS	22	28	21
FAGÓCITOS MONO	22	44	21
MACRÓFAGOS	52	64	35
MONONUCLEARES	3	9	5
POLIMORFONUCLEARES	23	50	25
MASTÓCITOS	75	60	80

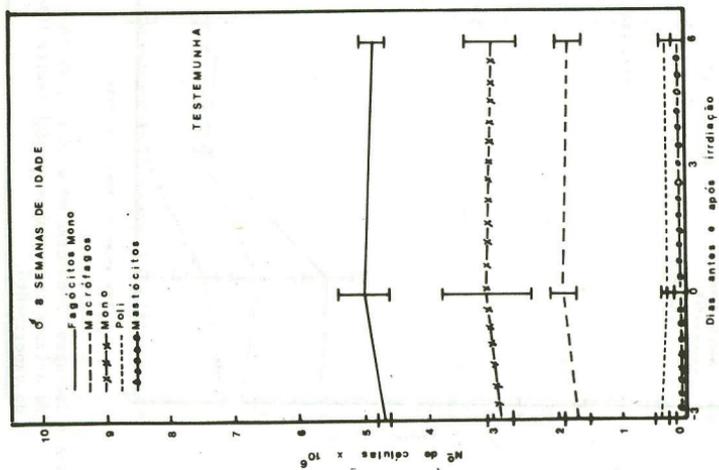


Fig. 1-A - Contagem de células no exudato peritoneal de animais testemunhas, nos diferentes dias do experimento.

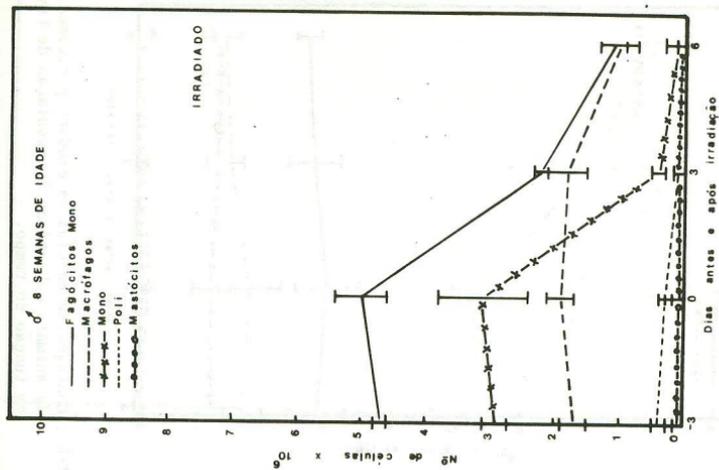


Fig. 1-B - Contagem de células no exudato peritoneal de animais submetidos à irradiação de 9 Gy de ^{60}Co em função do tempo.

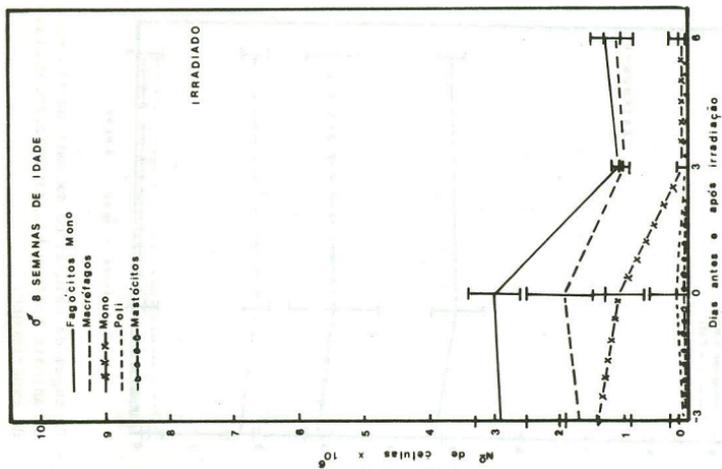


Fig.2-A - Contagem de células no exudato peritoneal de animais testemunhas, nos diferentes dias do experimento.

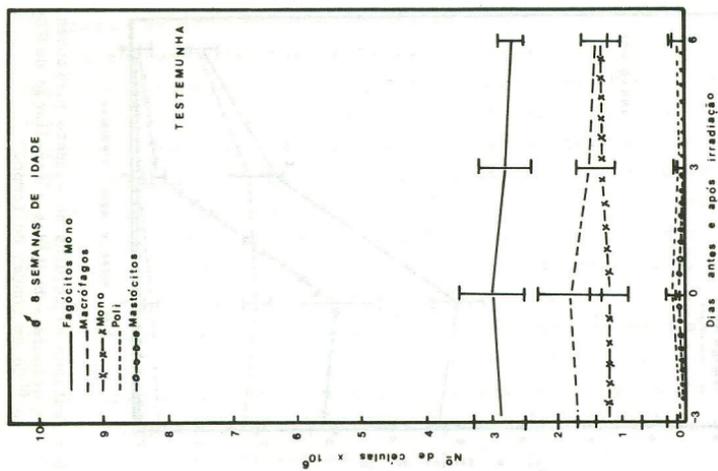


Fig.2-B - Contagem de células no exudato peritoneal de animais submetidos à irradiação de 9 Gy em função do tempo.

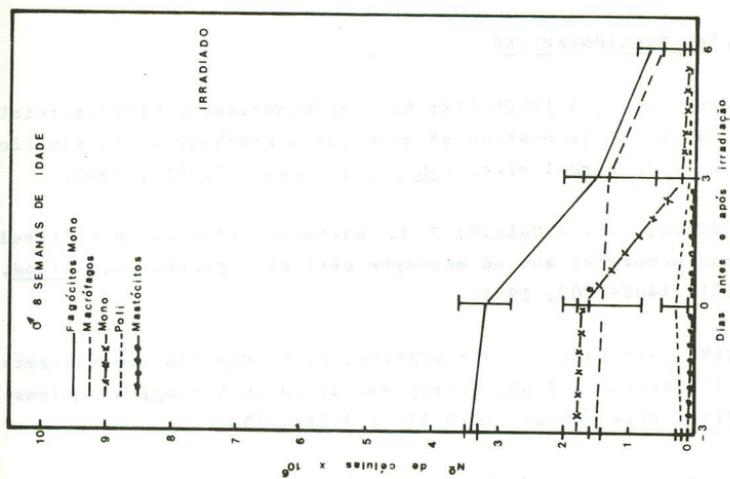


Fig. 3-B - Contagem de células no exudato peritoneal de animais submetidos à irradiação de 9 Gy em função do tempo.

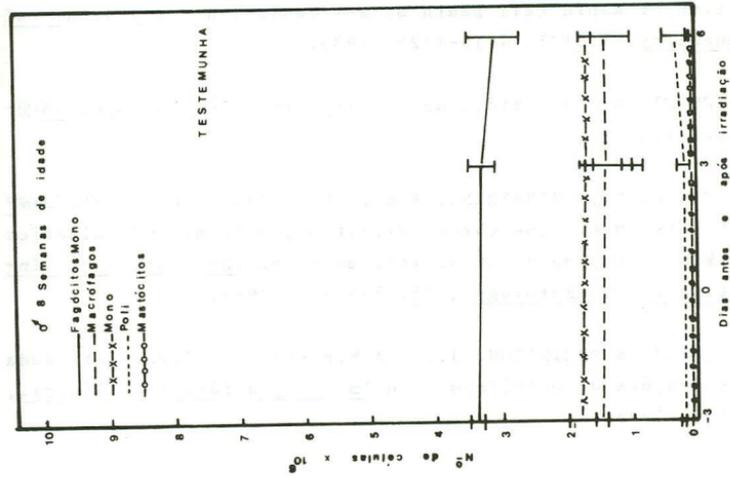


Fig. 3-A - Contagem de células no exudato peritoneal de animais testemunhas, nos diferentes dias do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - BOWDEN, D.H.; ADAMSON, I.Y.R.: Role of monocytes and interstitial cells in the generation of alveolar macrophages: I. Kinetic Studies of normal mice. Lab. invest., 42: 511-517, 1980.
- 02 - BUESCHER, E.S. & GALLIN; J. I. Radiation effects on cultured human monocytes and on monocyte-derived macrophages. Blood, 63(3): 1402-1407, 1984.
- 03 - BUTLER, J.; LAND, E. J.; SWALLOW, A. J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. Radiat. Phys. Chem., 24(3/4): 273-282, 1984.
- 04 - GALLIN, E.K.; GREEN, S.W.; DARDEN, J. Defective Fc mediated phagocytosis in - irradiated mouse peritoneal macrophages. Int. J. Radiat. Biol., 45(5): 459-467, 1984.
- 05 - LOWENTHAL, J. W. Activation of Mouse Lymphocytes inhibits induction of Rapid cell Death By X-irradiation the Journal of Immunology, 135(2): 1119-1125, 1985.
- 06 - MENEHINI, R. A toxicidade do oxigênio. Ciência Hoje, 28(5): 57-62, 1987.
- 07 - VAN FURTH, R.; NIBBERING, P.H.; VAN DISSEL, J.T.; DIESSELHOFF-DEN DULK, M.C. The characterization, origin, and kinetics of skin macrophages during inflammation. The Journal of Investigative Dermatology, 85: 398-402, 1985.
- 08 - WING, E.J. & REMINGTON, J.S. A hipersensibilidade retardada e as funções do macrófago. in Imunologia Básica e Clínica, 93-107, 1978.