

# INFLUÊNCIA DA RADIAÇÃO IONIZANTE E DE BLOQUEADORES DA GLUTATIONA (DEM E BSO) NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS VERO EM CULTURA.

TAKEKO S.KIYAN(\*); INÁCIO F.MENDES(\*\*); CÉLIA S.TAKATA(\*\*);  
COZUE MIYAKE(\*\*); EDDA DE RIZZO(\*\*) e NÉLIDA LÚCIA  
DEL MASTRO(\*)

(\*) COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-CNEN/SP  
(\*\*) INSTITUTO BUTANTAN-SÃO PAULO.

## RESUMO

As células de linhagem VERO por apresentarem sensibilidade e susceptibilidade compatível àquelas das células humanas, são empregadas nas provas de liberação de vacinas virais. Utilizamos dose de 5 e 10Gy de radiação ionizante, oriunda de  $^{60}\text{Co}$ , para estudar a radiosensibilidade de células VERO em cultura, em meio Eagle, bem como o efeito da preincubação em meio contendo dietilmaleato (DEM) 0,2mM e butionina sulfoximida (BSO) 1,0 e 10mM. Os resultados não são conclusivos, porém, há evidências da sensibilização das células por ação dos agentes depletivos da glutathione endógena.

## INTRODUÇÃO

Os efeitos deletéreos das radiações ionizantes para os seres vivos são conhecidos há quase um século, mas após a última guerra mundial com a explosão nuclear em Hiroshima e Nagasaki, a humanidade tomou conhecimento da eficiência destruidora e da amplitude dos efeitos biológicos das radiações por elas produzidas. Tornara-se possível o emprego destas radiações em Medicina Nuclear para fins de diagnóstico e terapêutica e expandiu-se a Radiobiologia para estudar os efeitos biológicos das radiações nos sistemas biológicos.

Quando um sistema biológico é exposto a um feixe de radiações ionizantes surgem lesões detectáveis nos diferentes níveis de organização; assim, tais efeitos podem ser estudados em termos de fragmentos de moléculas inteiras, organelas celulares, células, tecidos, órgãos e organismos [7].

Cada nível de estudo nos fornecerá informações importantes de grande valia para compreensão de fenômenos que se passam em outros níveis de complexidade biológica.

As lesões induzidas pelas radiações em sistemas biológicos podem ser produzidas por mecanismos diretos ou indiretos. No mecanismo direto, a energia da radiação é transmitida diretamente à molécula, lesando-a e consequentemente, tornando-a inadequada ao seu papel biológico. No mecanismo indireto, é o sistema aquoso que sofre alterações estruturais e por excitação ou ionização, dão origem a uma série de espécies químicas bastante difusíveis e reativas, com elétrons não emparelhados denominados radicais livres. O oxigênio potencializa os efeitos indiretos tornando mais graves as radiolesões quando as preparações biológicas são irradiadas em atmosfera de oxigênio. A hipoxia protege as células dos efeitos nocivos das radiações, o que acontece com os tumores sólidos hipóxicos considerados um problema no tratamento de câncer por radioterapia [4][6].

Os efeitos diretos e indiretos sempre coexistem embora seja possível, de acordo com as condições experimentais, fazer com que um ou outro predomine. Nos seres vivos, nos quais a água é o maior componente, os efeitos indiretos mediados pela radiólise da água são os que predominam [7].

A radiosensibilidade ou radioresistência celular depende de diversos fatores, alguns inerentes à própria célula, outros causados por tratamentos que a célula tenha sofrido ou que venha a sofrer antes, durante, ou após a irradiação. Pode ser modificada por agentes físicos como o calor e também pela mudança na taxa de dose.

Diversas substâncias químicas podem modificar a resposta à radiação. Estas substâncias agem por modificação das lesões iniciais, modificação de cinética dos processos de manifestação ou por perturbações metabólicas na célula.

Muitas substâncias têm a propriedade de reduzir os efeitos da radiação quando presentes durante a irradiação. São as substâncias radioprotetoras cujos mecanismos de ação são: produção de anoxia pela diminuição da tensão de oxigênio e consequentemente diminuindo a amplitude da radiolesão; combinação dos radioprotetores com os radicais livres; combinação dos protetores com estruturas críticas das células, tornando-as menos acessíveis aos radicais livres ou às próprias radiações; diminuição da velocidade de multiplicação celular ou por inibição de certos ciclos bioquímicos facilitando a restauração das lesões [6].

Os tióis celulares não protéicos (NPSH) incluem a glutathione (GSH) e outros compostos de baixo peso molecular como a cisteína, cisteamina e coenzima A.

A glutathione é um tripeptídeo glutamil-cistenil glicina, sintetizada intracelularmente pela ação das enzimas - glutamyl cisteina sintetase e glutamina sintetase, é um dos tióis naturais mais abundantes e a sua síntese é controlada por retroalimentação ou feed back de inibição e também pela concentração de substratos no meio como os aminoácidos glutamato, glicina e cisteína [8]. É encontrada em quase todas as células e as diversas funções exercidas são relevantes em muitos campos da biologia como no transporte, metabolismo e proteção celular; em enzimologia, farmacologia, radiação, câncer, toxicidade do oxigênio, toxicologia, endocrinologia, microbiologia e na agricultura. Participa da redução de dissulfetos e outras moléculas, conjuga com compostos de origem exógena e endógena; protege as células contra os efeitos

destrutivos de espécies intermediárias de oxigênio e de radicais livres [12]

A modificação do metabolismo de glutatona pode ser realizada administrando-se inibidores seletivos de enzimas como o BSO (DL-Butationa sulfoximide) ou adicionando compostos que liguem covalentemente com a glutatona como o DEM (diethylmaleato) ou que oxidem o GSH (Ex:diamide)[2][3].

Foi desenvolvido um composto específico que inibe a enzima chave da biossíntese de GSH, - glutamil cisteína sintetase. O composto já citado anteriormente é o BSO específico pela depleção de GSH. As células tratadas com BSO tornam-se deficientes em GSH devido ao seu emprego via metabolismo e não ocorrerá a ressíntese porque a enzima está inibida. A depleção celular de GSH por BSO é de interesse e potencialmente um instrumento útil para determinar o papel de GSH na resposta a radiação de células hipóxicas [5].

As células tratadas com BSO proporcionam um sistema onde pode ser testado o mecanismo de ação de outros compostos depletadores de tióis como o DEM, um composto de afinidade eletrônica com GSH que é um radiosensibilizador hipóxico.

A depleção de GSH celular pode resultar numa maior sensibilidade das células hipóxicas ou aeróbicas às radiações ionizantes [2][3].

O DEM é um bloqueador de GSH, diminuindo os níveis de tiól por meio do bloqueio da glutatona-S-transferase e por ligação covalente com os grupamentos tióis da GSH. A GSH apresenta na sua síntese o mecanismo de "feed back" de inibição, o que acarreta a ressíntese de GSH à medida que diminui o nível de GSH celular. O DEM não é específico pois reage com tióis celulares não protéicos como a coenzima A, ácidos lipóicos, cisteína e tióis protéicos. O DEM inibe as reações celulares de transferência de elétrons, incluindo aqueles envolvidos na utilização de oxigênio [2][3].

As células de linhagem VERO são derivadas das células de rim de macaco verde africano. Estas células são utilizadas por apresentarem sensibilidade e susceptibilidade comparável àquela das células humanas e são largamente empregadas nas provas de liberação de vacinas virais, como por exemplo a vacina contra o sarampo. É uma técnica eficiente e reprodutível para a neutralização específica de antígenos verificada por meio de efeitos citopáticos e formação de placas nas células em cultura [9].

Em vacinas de concentração viral muito baixa fica difícil a verificação dos efeitos citopáticos e formação de placas em células VERO. Com a sensibilização das células pela radiação ionizante e com a potencialização da radiosensibilidade por meio do bloqueio da síntese de glutatona por DEM e por BSO, ficariam as células mais sensíveis às baixas concentrações virais, permitindo obter uma dosagem mais eficiente.

Considerando a grande importância prática destas células o presente trabalho visa iniciar o estudo da sua radiosensibilidade bem como o efeito da preincubação em meio contendo DEM ou BSO.

#### MATERIAL E METODOS:

Material: Células VERO obtidas de ATCC.

Experiência 1. Ensaio preliminar. Verificação da radiosensibilidade das células VERO.

As células na passagem 209 (1º repique) foram semeadas em garrafas tipo "Roux" na concentração de 150.000 células/ml, em meio Eagle adicionado de 10% de soro fetal bovino.

Após 4 dias de crescimento em monocamada a 37°C foi observada a morfologia celular. As garrafas com boa densidade celular foram empregadas, lavadas com 10ml de PBS por 3 vezes, acrescentando-se no final 2ml de PBS (tampão fosfato-salina) e irradiadas em fonte de  $^{60}\text{Co}$  (GAMMACELL 200 da Atomic Energy Canada Ltd) taxa de dose de  $8,24 \times 10^{-2}$  Gy /hora, nas doses 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy e 17 Gy. Ao término da irradiação foram trocados o PBS por meio Eagle + 10% e SFB (soro fetal bovino) e deixadas em incubação a 37°C. Foram realizadas as contagens nos 1º, 3º, 5º e 7º dias após a irradiação. No último dia (7º), as células além de contadas foram também semeadas (2º repique). Nos 1º, 3º, 5º e 7º dias de incubação foram observadas a morfologia e a contagem das células, sendo que no 7º dia foi realizada outra semeadura (3º repique) e assim sucessivamente até o 5º repique (28 dias após a irradiação).

Experiência 2. Irradiação das células VERO (passagem 235) após o tratamento com BSO na concentração de 1mM e 10mM.

As células foram obtidas como na experiência 1 - após 3 dias de crescimento, foram adicionadas às garrafas com células em crescimento logarítmico 1mM e 10mM de BSO e deixados em contato por 18 horas a 37°C. No 4º dia, as células foram lavadas com 10ml de PBS por 3 vezes, adicionado no final 2ml de PBS e irradiado na fonte de  $^{60}\text{Co}$  nas doses de 5Gy e 10Gy de radiação. Foi deixado um lote testemunha sem irradiar e sem tratamento com BSO e um lote tratado com 1mM e 10mM de BSO sem irradiar. Ao término da irradiação o PBS foi decantado e adicionado o meio Eagle acrescido de 10% de SFB, deixado em incubação a 37°C. Foi observada a morfologia no microscópio invertido e a densidade celular por meio da contagem no 1º, 2º, 3º, 4º e 7º dias após a irradiação e realizada a semeadura no 7º dia.

Experiência 3. Irradiação das células VERO (passagem 245) em crescimento logarítmico e tratadas com DEM.

O DEM foi diluído em etanol na concentração de 1:1 v/v e posteriormente em soro fisiológico. No 2º dia após a semeadura as células foram lavadas com 10ml de soro fisiológico e deixadas em contato por 2 horas com:

1º lote: testemunha com solução fisiológica;

2º lote: testemunha com álcool + solução fisiológica;

3º lote: com DEM 0,2mM, etanol e solução fisiológica.

Após este tempo foram irradiadas com 10Gy, em seguida trocada por meio Eagle adicionado de 10% SFB e deixados a 37°C. Foi observada a morfologia no microscópio invertido e a contagem celular nos 3º, 4º, 5º, 6º e 7º dias de incubação.

## RESULTADOS

**Experimento 1.** Na figura 1 encontram-se os dados relativos à sobrevida das células em cultura nos diferentes repiques ou semeaduras após a irradiação. As células VERO demonstraram uma radiosensibilidade diferencial às doses de 5, 10, 15 e 17Gy. Para a dose de 5Gy a manifestação do efeito da radiação aumenta do 1º ao 2º repique, havendo recuperação total já no 3º repique. As células irradiadas com doses a partir de 10Gy não sobreviveram praticamente após o 4º repique (21 dia após irradiação). Verifica-se uma diminuição sistemática da fração de sobrevida para as doses altas, havendo contudo uma inversão para o caso do 2º repique, que apresenta índices inferiores àqueles do 3º repique.

tratadas com 1mM de BSO e irradiadas a 5Gy apresentaram sensibilidade semelhante àquela do grupo testemunha. Entretanto, as células tratadas com 10mM de BSO e irradiadas a 5Gy, apresentaram uma queda no crescimento a partir do 4º dia após a irradiação.

As células, tanto as testemunhas como as tratadas com 1mM BSO e 10mM BSO irradiadas a 10Gy apresentaram sensibilidade semelhante à radiação. O crescimento celular não foi afetado com a adição de 1mM e 10mM de BSO sem irradiação (tabela I).

**Experimento 2.** Experimento realizado com o intuito de verificar a influência do bloqueio da síntese da glutatona na sobrevida das células VERO. As células

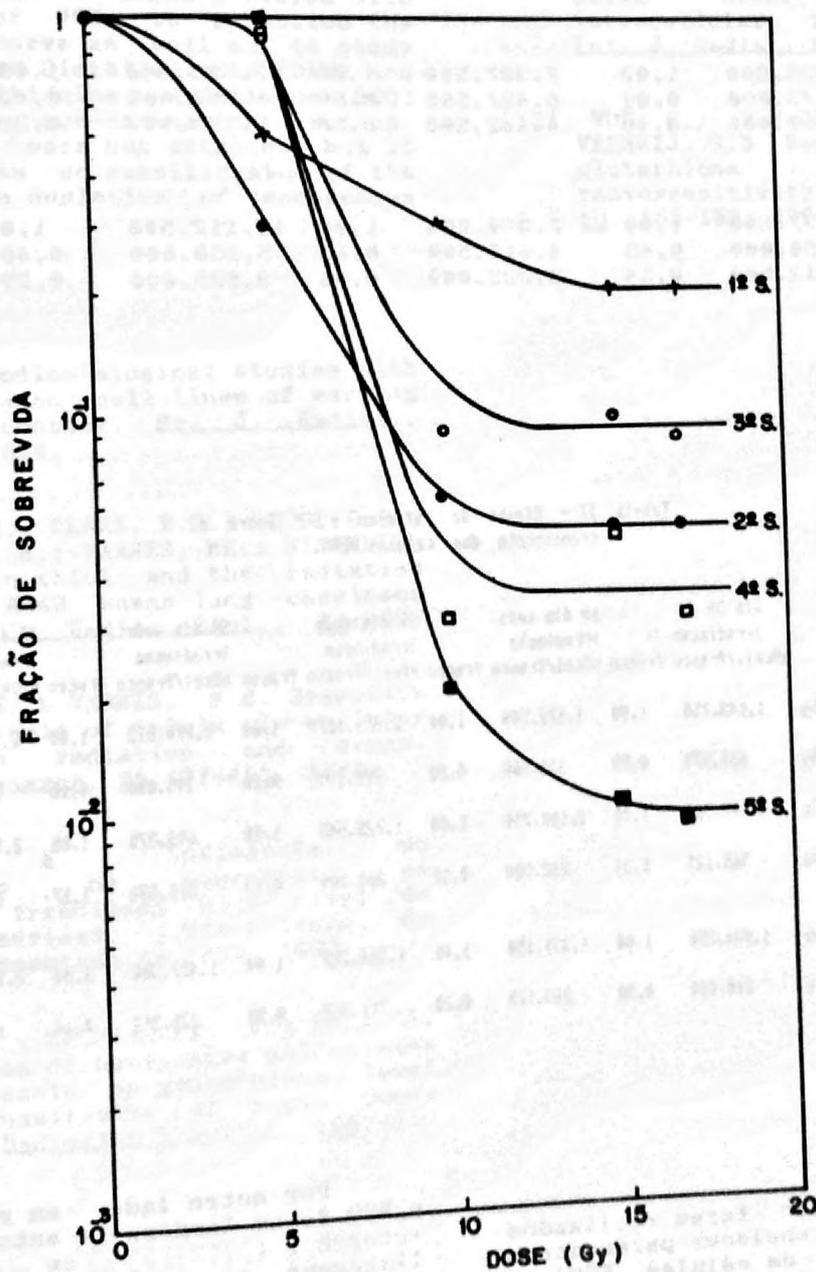


Fig. 1- Fração de sobrevida de células VERO em cultura, em função da dose de radiação para as 5 semeaduras semanais sucessivas após irradiação.

**Experimento 3.** Este experimento foi realizado afim de verificar a influência do bloqueio de grupos tióis na sobrevivência das células VERO.

Nas células não irradiadas, o DEM e o álcool não afetaram o crescimento celular.

Nas irradiadas com 10Gy, as células tratadas com o DEM, com o álcool e a testemunha comportaram-se da mesma maneira, mostrando que a sensibilidade das células nessa faixa de dose, foi extremamente alta não sendo possível portanto detectar o efeito do DEM nas células (tabela II).

Tabela I- Efeito da radiação e BSO sobre o crescimento das células VERO dias após a irradiação.

|                     |      | 1º DIA       |        | 2º DIA       |        | 3º DIA       |        | 4º DIA       |        |
|---------------------|------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
|                     |      | nºcel/frasco | fração | nºcel/frasco | fração | nºcel/frasco | fração | nºcel/frasco | fração |
| SEM/BSO             | 0Gy  | 5.212.500    | 1,00   | 10.125.000   | 1,00   | 12.150.000   | 1,00   | 21.225.000   | 1,00   |
| 2.175.000           | 5Gy  | 3.637.500    | 0,70   | 4.987.500    | 0,49   | 8.437.500    | 0,69   | 8.100.000    | 0,38   |
| cel/frasco          | 10Gy | 3.450.000    | 0,66   | 3.637.500    | 0,36   | 4.800.000    | 0,39   | 3.787.500    | 0,18   |
| antes da irradiação |      |              |        |              |        |              |        |              |        |
| 1mM/BSO             | 0Gy  | 3.825.000    | 1,00   | 7.387.500    | 1,00   | 13.575.000   | 1,00   | 21.600.000   | 1,00   |
| 2.375.000           | 5Gy  | 3.375.000    | 0,88   | 6.487.500    | 0,88   | 6.300.000    | 0,46   | 8.700.000    | 0,38   |
| cel/frasco          | 10Gy | 3.450.000    | 0,90   | 4.162.500    | 0,56   | 5.175.000    | 0,38   | 3.087.500    | 0,18   |
| antes da irradiação |      |              |        |              |        |              |        |              |        |
| 10mM/BSO            | 0Gy  | 3.937.500    | 1,00   | 7.050.000    | 1,00   | 12.112.500   | 1,00   | 21.487.500   | 1,00   |
| 2.887.500           | 5Gy  | 2.550.000    | 0,65   | 4.612.500    | 0,65   | 5.850.000    | 0,48   | 4.068.750    | 0,19   |
| cel/frasco          | 10Gy | 2.512.500    | 0,64   | 3.225.000    | 0,46   | 3.525.000    | 0,29   | 3.243.750    | 0,15   |
| antes da irradiação |      |              |        |              |        |              |        |              |        |

Tabela II - Efeito da radiação e DEM sobre o crescimento das células VERO.

| No de células inicial | DIA DA irradiação | 1º dia após irradiação |        | 2º dia após irradiação |        | 3º dia após irradiação |        | 4º dia após irradiação |        |           |      |
|-----------------------|-------------------|------------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|-----------|------|
|                       |                   | nºcel./frasco          | fração | nºcel./frasco          | fração | nºcel./frasco          | fração | nºcel./frasco          | fração |           |      |
| 168750cels/ml         | 0Gy               | 1.143.750              | 1,00   | 1.672.500              | 1,00   | 2.821.687              | 1,00   | 1.220.812              | 1,00   | 2.553.750 | 1,00 |
| Testemunha            | 0Gy               |                        |        |                        |        |                        |        |                        |        |           |      |
| Soro                  |                   |                        |        |                        |        |                        |        |                        |        |           |      |
| Fisiológico           | 10Gy              | 669.375                | 0,59   | 330.000                | 0,20   | 292.125                | 0,10   | 195.000                | 0,16   | 280.593   | 0,11 |
| Etanol +              | 0Gy               | 1.642.500              | 1,00   | 2.118.750              | 1,00   | 1.725.843              | 1,00   | 693.375                | 1,00   | 2.307.315 | 1,00 |
| Soro                  |                   |                        |        |                        |        |                        |        |                        |        |           |      |
| Fisiológico           | 10Gy              | 568.125                | 0,34   | 262.500                | 0,12   | 262.500                | 0,15   | 811.500                | 1,17   | 232.500   | 0,10 |
| Etanol +              | 0Gy               | 1.046.250              | 1,00   | 1.339.150              | 1,00   | 1.364.287              | 1,00   | 1.437.562              | 1,00   | 2.145.000 | 1,00 |
| DEM 0,2mM +           | 0Gy               |                        |        |                        |        |                        |        |                        |        |           |      |
| Soro                  |                   |                        |        |                        |        |                        |        |                        |        |           |      |
| Fisiológico           | 10Gy              | 210.000                | 0,20   | 265.125                | 0,20   | 311.062                | 0,23   | 235.312                | 0,16   | 189.093   | 0,09 |

## DISCUSSÃO

No presente trabalho foram realizados experimentos afim de estabelecer parâmetros das radiosensibilidades de células VERO em cultura.

A resposta diferencial encontrada põe em evidência as características intrínsecas dos diversos processos metabólicos envolvidos na recuperação ou morte celular bem como as respectivas cinéticas de reação.

Por outro lado, as propriedades do DEM e BSO foram longamente estudadas por diversos autores [1][2][5] em experiências com linhagens de células CHO, HELA, V79 entre outras.

O tratamento com substâncias radiomodificadoras como o BSO e o DEM causam esgotamento da glutatona, um radioprotetor endógeno. Essa diminuição do nível de GSH aumenta a radiosensibilidade inclusive nas células hipóxicas [10][11][12].

Entretanto, os presentes resultados não indicam qualquer evidência de efeitos radiosensibilizadores produzidos, seja pelo bloqueio de grupos tióis pela ação do DEM, seja pela inibição da síntese de GSH pelo BSO. Será necessário o emprego de outros protocolos experimentais a fim de poder concluir a respeito do papel da manutenção dos níveis de GSH na resposta das células VERO à radiação.

#### SUMMARY

The VERO cell line is derived from African Green Monkey Kidney. These cells shown to be useful in assays of viral vaccines due to the sensitivity and susceptibility similar to human cells. Were irradiated. VERO cells in Eagle's medium with 5, 10, 15 and Gy of <sup>60</sup>Co, to establish the radiosensitivity curve as well as to study the effect of 0.2mM Diethylmaleate (DEM) and 1.0 and 10.0mM Buthionine sulfoximine (BSO) added to the pre-incubation medium. Conclusive results were not attained but it seems that there was no sensitization of the cells due to the depletion of endogenous glutathione.

#### REFERENCIAS

- [01] ASTOR, M.B. Radiobiological studies with a series of human cell lines of varying glutathione content. Br. J. Radial., 57:717-722, 1984.
- [02] BIAGLOW, J.E.; CLARK, E.P.; EPP, E.R.; MORSE-GUADIO, M.; VARNES, ME.; MITCHELL, J. Nonprotein thiol and the radiation response of A549 human lung carcinoma cells. Int. J. Radiat. Biol., 44:489-495, 1983.
- [03] BIAGLOW, J.E. & VARNES, M.E. Symposium Thiols. The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. Radiation Research, 95:437-455, 1983.
- [04] BERNARDES, E. Influência do Dietilmaleato na sobrevida de camundongos irradiados e a nível de proteínas séricas. Dissertação de Mestrado apresentado ao IPEN, 1990.
- [05] GUICHARD, M.; LESPINASSE, F.; MALAISE, E.P. Influence of buthionine sulfoximine and misonidazole on glutathione level and radiosenssitivity of human tumor xenografts. Radiation Research, 105:115-125, 1986.
- [06] HALL, E.J. Radiobiology for the radiobiologist, 2a ed., Harper & Row Publishers, New York, 1978.
- [07] LAWRENCE, C.W. Origins and aims Celular Radiobiology. Edward Arnold Limited Publishers, London 1971.
- [08] MEISTER, A. Selective modification of glutathione metabolism. Science, 220:472-477, 1983.
- [09] RHIM, J.S.; SCHELL, K.; CREASY, B.; CASE, W. Biological characteristics and viral susceptibility of an African green Monkey Kidney cell line (VERO). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 132:670-678, 1969.
- [10] SAUNDERS, E.L.; MEREDITH, M.J.; EISERT, D.R.; FREEMAN, M.L. Depletion o glutathione after irradiation modifies survival. Radiation Research, 125:267-276 1991
- [11] VAN DER SCHANS, G.P.; VOS, O.; ROOS-VERHEIJ, S.D.; 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. Int. J. Radiat. Biol., 50:453-465, 1986.
- [12] VOS, O.; VAN DER SCHANS, G.P.; ROOS-VERHEIJ, S.D. Reduction of intracellular glutathione content and radiosensitivity. Int. J. Radiat. Biol., 50: 155-165, 1986.