



22 a 27 de abril de 1990

**ANAIS - PROCEEDINGS****INFLUÊNCIA DO DIETILMALEATO NA SOBREVIDA DE CAMUNDONGOS IRRADIADOS E A NÍVEL DE PROTEÍNAS SÉRICAS**Eliane Bernardes  
Nélida Lúcia Del MastroDepartamento de Aplicações em Ciências Biológicas  
Divisão de Radiobiologia  
Comissão Nacional de Energia Nuclear-IPEN-CNEN/SP**SUMÁRIO**

O uso de drogas radiomodificadoras que alteram o efeito da radiação, protegendo ou sensibilizando células ou organismos, apresenta grande interesse nos casos de radioterapia de tumores. A glutatona (GSH) pode ser considerada o principal radioprotetor endógeno. O dietilmaleato (DEM) é uma substância que bloqueia o GSH intracelular. O objetivo deste trabalho visa estabelecer a competência radiomodificadora do DEM em dois veículos, óleo de amendoim e solução de etanol, ao reduzir o nível de GSH intracelular, por meio da análise das curvas de sobrevivência de camundongos irradiados e a nível de percentagens relativas de proteínas séricas. Grupos de animais foram previamente injetados intraperitonealmente com 0,3 ml de solução de DEM (418 e 150  $\mu\text{M}$ ) nos dois veículos e irradiados com dose aguda de 9 Gy ( $^{60}\text{Co}$ ), uma hora após a injeção. A sobrevivência dos camundongos foi acompanhada durante 30 dias e os perfis eletroforéticos das proteínas séricas 1,3 e 7 dias respectivamente após a irradiação. A análise dos resultados mostra que a ação do DEM na radiosensibilidade de camundongos depende do veículo utilizado, já que os próprios veículos apresentam ação radiomodificadora.

**ABSTRACT**

The use of radiomodifying drugs that alter the radiation effect, protecting or sensitizing cells and organisms, presents great interest in tumor radiotherapy. Glutathione (GSH) can be described as the major endogen radioprotector. The diethylmaleate (DEM) is a drug able to block intracellular GSH. This work aims at the establishment of the radiomodifying competence of DEM administered in two different vehicles, peanut oil and aqueous ethanolic solution by the analysis of mouse survival curves as well as the relative percentages of serum proteins. Groups of animals were previously injected intraperitoneally with 0.3 ml of 418 e 150  $\mu\text{M}$  DEM respectively in each one of the vehicles one hour before irradiated with an  $^{60}\text{Co}$  acute dose of 9 Gy. The survival of mice was followed during 30 days and electrophoretic profiles of serum proteins 1,3 and 7 days after irradiation. The results showed that the action of DEM on mouse radiosensitivity depends on the vehicles used, considering that both media showed a radiomodifier action.

## INTRODUÇÃO

Tem sido demonstrado que tióis celulares, tais como a glutathiona (GSH), protegem as células dos danos oxidativos por reagirem com peróxidos e hidroperóxidos, (BIAGLOW e cols.1984), bem como formando conjugados com agentes tóxicos, muitos dos quais agentes quimioterapêuticos, através de uma via metabólica mediada por peroxidase (FOUREMA, 1989, STEVENS e cols,1985).

A glutathiona é um tripeptídeo de estrutura: L- $\gamma$ -glutamil L-cisteinil-glicina sendo provavelmente o tiol não proteico (NPSH) mais abundante de baixo peso molecular, presente nos sistemas biológicos. É também de grande interesse na indústria de medicamentos (MEISTER e ANDERSON, 1983). Ela é considerada por muitos como sendo o principal radioprotetor endógeno, pela sua capacidade em desintoxicar o organismo das espécies ativas geradas pela radiação (KUMAGAI, 1986).

Este tripeptídeo participa numa série de processos radioquímicos e bioquímicos que são de grande importância na determinação da resposta das células à radiação. A disponibilidade de cepas de células humanas deficientes em GSH abriu novas abordagens ao estudo do papel que o GSH desempenha nesses processos. Assim, foi possível estabelecer que o GSH é uma substância chave também no mecanismo de radiosensibilização por misonidazole (RÉVESZ e EDGREEN, 1982).

Existem evidências de que o L-2-oxothiazolidina-4-carboxilato é capaz de aumentar os níveis intracelulares do GSH. Por outro lado, considera-se o dietilmaleato como capaz do bloqueio de GSH, assim como a butionina sulfoximida seria capaz de inibir a sua síntese. O tratamento de células de mamíferos com butionina sulfoximida (BSO) ou dietilmaleato (DEM) resulta em uma diminuição no GSH intracelular e nos níveis de ligações SH não proteicas (VANDERSCHARS, 1986). Desta maneira, o dietilmaleato (DEM) é um reagente de ligação tiol com especificidade para a glutathiona por causa da sua abundância relativa e sua capacidade de reação.

A capacidade radioprotetora de uma substância pode ser evidenciada de várias maneiras, dependendo do tipo de experimento realizado. Com mamíferos em experimentação, ela é evidenciada quando uma quantidade maior de animais sobrevive a uma dose letal de radiação ou quando eles têm maior tolerância à radiação do que a usual.

Segundo SURINIVASAN e cols, 1985, é possível avaliar o efeito da radiação e a ação de possíveis radiomodificadores mediante a análise das mudanças nos níveis de frações das proteínas séricas: proteínas totais, albumina, globulinas alfas, beta e gama. As proteínas séricas colaboram para a manutenção do meio interno do organismo, permitem solubilizar substâncias insolúveis em água e transportá-las como complexos solúveis até os locais apropriados aonde serão descarregados, através de uma série de reações. Carregam também nutrientes essenciais para as células como o transporte de ácidos graxos, pela albumina, e transportam produtos de um órgão para outro. Assim, a concentração dessas substâncias no plasma é geralmente proporcional à sua demanda. Algumas das proteínas séricas como as gama-globulinas têm enorme importância biológica como anticorpos.

O presente trabalho tem por objetivo o estudo do efeito da diminuição do GSH, mediante o seu bloqueio com DEM, na sobrevivência de camundongos irradiados e sua influência nos níveis de proteínas séricas. Visa dessa maneira, estabelecer a competência radioprotetora ou radiosensibilizadora dos agentes injetados nos diferentes grupos de animais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados camundongos suíços, albinos heterozigotos do biotério do IPEN, machos e fêmeas com idades variando de 8 a 10 semanas e peso corporal inicial oscilando entre 25 a 30 gramas.

Para o estudo de sobrevivência, foram separados grupos constituídos de 20 animais cada: testemunhas sem irradiar, animais são irradiados, animais tratados e animais tratados e irradiados. A sobrevivência foi acompanhada por um período de 30 dias após a irradiação.

Para ensaios de análise de proteínas séricas, foram montados grupos de 15 animais cada, para cada tipo de tratamento, sendo utilizados 5 animais/dia/tratamento, nos 1º, 3º e 7º dias após a irradiação. O sangue foi extraído do plexo ocular com ajuda de uma pipeta Pasteur. Após a formação do coágulo a 37°C os soros foram obtidos no sobrenadante da centrifugação por 10 minutos, numa centrífuga Internacional a 220 rpm.

### Irradiação

Os animais foram irradiados com dose única de 9 Gy, numa fonte de  $^{60}\text{Co}$  Gammacell 220, em grupos de 3 animais dentro de uma caixa cilíndrica de papelão. A taxa de dose utilizada foi de 5 Gy/min em média.

### Tratamentos

A administração do DEM (SIGMA) que é o ester dietílico do ácido 2-butenodióico foi feita por via intraperitoneal (ip) numa concentração de 418 e 150  $\mu\text{M}$  aproximadamente 1 h antes da irradiação. O DEM é insolúvel em soluções aquosas e solúvel em álcool e éter.

A substância foi administrada utilizando 2 veículos:  
a) óleo de amendoim comercial POLYFARMA; b) solução alcoólica diluída a 0,027% (KOCH e cols., 1984).

### Análise das proteínas séricas

Foi feita análise das proteínas séricas por eletroforese em cellogel, seguindo a metodologia clínica usual (MOURA e cols., 1982). Foram utilizadas fitas de acetato de celulose de 14 x 2 cm - Polygel - (INLAB) umedecidas em metanol 40%, utilizando solução tampão da MERCK (pH 8,6; 220 V, 5 mA). A leitura foi feita num densitômetro da Zenite a 560 nm. A determinação de proteína total foi realizada utilizando o método de biureto

com leitura espectrofotométrica a 545 nm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo MITCHEL e cols., 1983, as concentrações de GSH celular são diminuídas a menos de 5% dos valores controles quando é utilizado DEM a 0,5 mM em células em cultura de hamster chinês. A concentração utilizada em nosso trabalho foi aquela recomendada por BUMP e cols, 1982 (0,418 mM) e é ligeiramente inferior àquela. Mesmo assim, é possível supor que acontecera um bloqueio temporário e sensível do GSH disponível durante a irradiação. Assim sendo, é de se esperar uma mudança na resposta do organismo frente a ação desse agente bloqueador do GSH.

Na Fig. 1 são apresentados os resultados da influência do DEM diluído em óleo de amendoim na sobrevivência de camundongos machos. Os resultados mostraram uma diminuição do número de animais sobreviventes à irradiação nos grupos de camundongos previamente injetados com DEM a  $4,18 \times 10^{-4}M$ , sendo 5% a sobrevivência a 30 dias nos animais tratados, frente a 25% nos animais somente irradiados. É possível observar que o próprio veículo, óleo de amendoim, apresenta ação radiomodificadora mas não tão pronunciada quanto DEM + óleo combinados.

No caso de utilizar o DEM (150  $\mu M$ ) diluído em álcool absoluto e logo por diluições sucessivas, com solução NaCl 0,85% até a concentração final 0,027% em álcool, o efeito é contrário quando se utilizam tantos animais machos quanto fêmeas (Fig. 2A e fig 2B).

Os resultados em relação à sobrevivência dos animais tratados com dietilmaleato diluído em solução alcóolica, nos mostra que há uma proteção do DEM para camundongos fêmeas, em relação aos tratados com álcool e somente irradiados, sendo a sobrevivência de 60% em 30 dias, frente aos tratados com álcool de 15% e 45% dos somente irradiados (Fig. 2A). Quando utilizamos camundongos machos, os dados obtidos mostram aumento de sobreviventes à irradiação nos grupos de camundongos previamente injetados com DEM em relação aos tratados com álcool e irradiados, sendo a sobrevivência de 45% do grupo com álcool e 15% de sobreviventes irradiados num período de 30 dias (Fig. 2B).

Um resultado que desperta interesse é a resposta diversa do próprio veículo, solução alcóolica, nos animais machos ou fêmeas. Fenômenos deste tipo estão bem documentados na extensa literatura sobre efeitos biológicos das radiações que menciona a diversidade de radiosensibilidade dos organismos dependendo da espécie, sexo, condições metabólicas entre muitos outros fatores (BACQ & ALEXANDER, 1961).

Em relação a análise das proteínas séricas, os dados analisados para proteína total, confirmam aqueles da literatura (MELBY e cols, 1976), isto é, variaram entre 4,0 a 6,0g/ml, para todos os animais em estudo, tratados e irradiados (Tabela 1 e tabela 2). Para os controles de camundongos machos somente irradiados, não tiveram alterações significativas nas proteínas totais e albumina em relação ao controle, havendo uma pequena diminuição na fração de gamaglobulina. O mesmo ocorreu com os animais tratados com óleo de amendoim e DEM diluído em álcool e tratados e irradiados. Já para os animais tratados com álcool e os trata-

dos e irradiados, observa-se um incremento na fração de gamaglobulinas. Nesta fração protéica estão incluídas as imunoglobulinas (anticorpos) do organismo, conseqüentemente apresentam grande variação de níveis como conseqüência de processos patológicos. Seus valores se encontram aumentados em processos associados a doenças infecciosas e hepatopatias.

Nossos resultados mostram níveis de gamaglobulinas, diminuídos nos grupos pré-tratados com drogas radiomodificadoras (DEM combinados com óleo de amendoim). Isto é, um fator básico na radiosensibilização, através de indução de imunodepressão do organismo após a irradiação. Porém, quando os animais são pré-tratados com DEM combinado com álcool, aparentemente apresentam um efeito protetor, expressado pelo aumento nas defesas imunológicas do corpo para a irradiação.

Nos experimentos realizados com camundongos fêmeas no grupo somente irradiados, não se observou mudanças significativas em relação ao grupo testemunha. As alterações aparentes foram em relação aos grupos pré-tratados com DEM combinado com álcool e estes irradiados, onde teve um pequeno aumento nas frações de gamaglobulina. Isto comprovaria os dados da literatura (SEYMOUR e cols, 1986), que o álcool apresenta um pequeno efeito radioprotetor em camundongos (PATERSON & MATHEUS, 1951), em bactérias (HOLLANDER & STAPLETON, 1953), em sementes e bulbos de plantas (RILEY, 1956) e protozoários (KIMBAL & GAUTIER, 1951). Contudo, no caso de camundongos fêmeas, mesmo havendo um acréscimo nos níveis de gamaglobulinas pela ação do álcool, não houve radioproteção mas, pelo contrário, houve uma radiosensibilização aparente.

O papel desempenhado pelo estado de oxidação de sulfidrilas protéicas na sensibilidade frente a radiação, já fôra objeto de análise por outros autores (CHADWIG e cols, 1988). Deficiências no metabolismo de GSH como conseqüência da falta de incorporação de cisteína induz uma maior radiosensibilidade. Contudo, permanece a indagação se o aumento de sensibilidade frente a irradiação decorre da indução de um dano maior ou da falta de reparo.

Nossos resultados mesmo não sendo conclusivos, ilustram a importância da disponibilidade de GSH na radiorresistência de camundongos, e evidencia a necessidade de ensaios aprimorados para determinar os níveis precisos de GSH em tecidos alvos para a obtenção de dados definitivos.

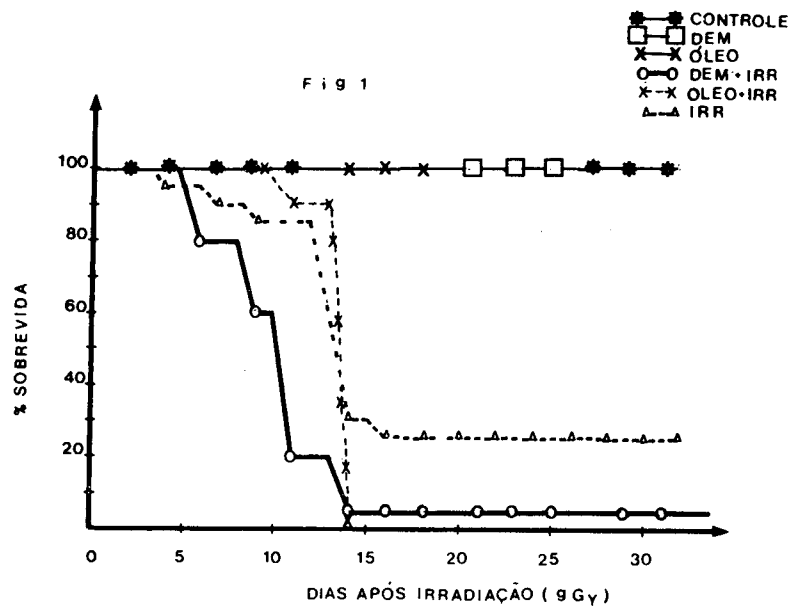


FIG.1 - Influência do DEM + óleo de amendoim na sobrevivência de animais (camundongos machos) controlés e submetidos à irradiação de 9 Gy de  $^{60}\text{Co}$  em função do tempo.

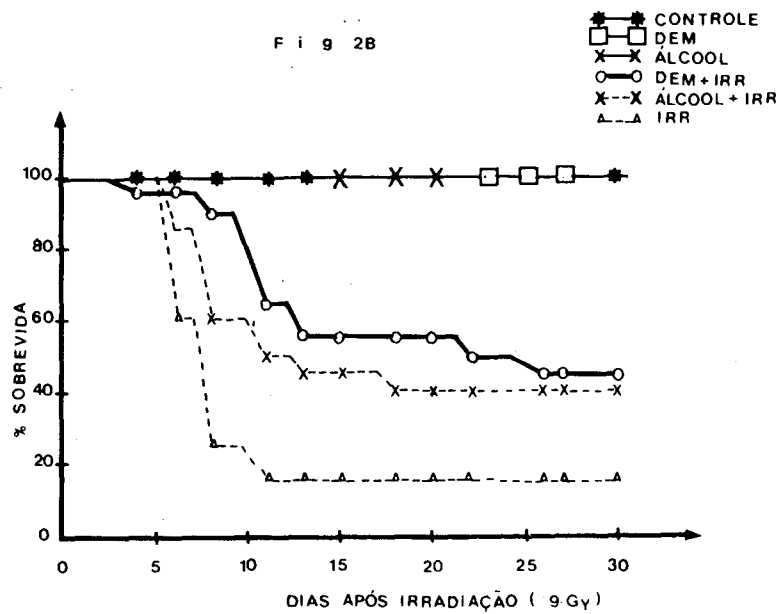
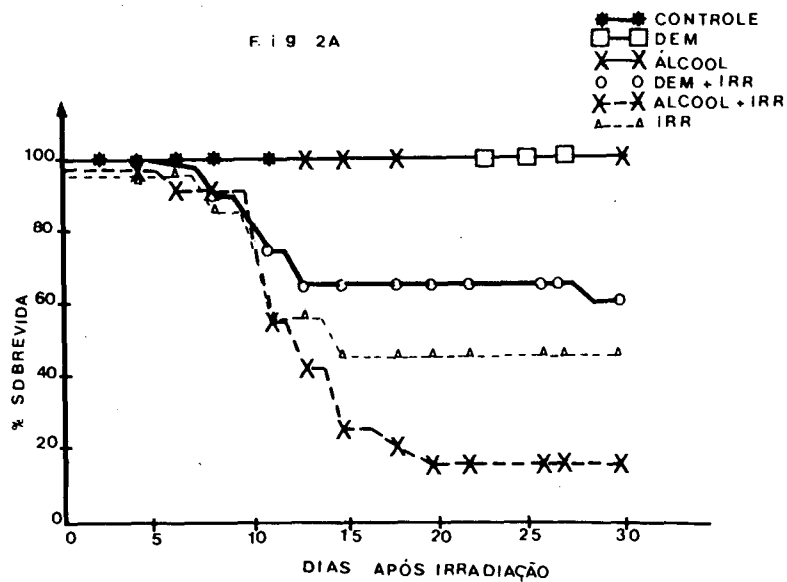


FIG.2 - Influência do DEM + Solução alcólica na sobrevivência de animais submetidos a irradiação de 9 Gy de  $^{60}\text{Co}$  vs tempo.  
A) Camundongos fêmeas e B) Camundongos machos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BIAGLOW, J.E., VARNES, M.E., EPP E.R., CLARK, E.P. and AS-TOR, M. Factors Involved in Depletion from A 549 Human Lung Carcinoma Cells: Implications for Radiotherapy Journal Radiation Oncology Biol. Phys. 10:1221, 1227, 1984.
- 2 - CHADWIK, K.H.; BRIDGES, B.A. CEC/AECII workshop on Methods of Determining Differential Radiosensitive in Humans Int. Journal Radiat. Biol. 53 (3):483-489, 1989.
- 3 - FOUREMA, G.L. and LING, T.E.E.. Peroxidase-Mediated Formation of Glutathione Conjugates from Polycyclic Aromatic Dihydrodiols and Insecticides. Archives of Biochemistry and Biophysics. 269(1):55-68, 1989.
- 4 - KOCH, C.J, STOBRE, C.C. and BUMP, E.A. The effect on the km for Radio sensitization at 0°C of thiol Depletion by Diethylmaleate Pretreatment: Quantitative Differences Found using the Radiation Sensitizing Agent Misonidazole of oxygen. Radiation Research, 98, 141-153, 1985.
- 5 - KUMAGAI, H. Glutathione and Glutamylpeptides. Progress Industrial Microbiology. 24; 259-268, 1986.
- 6 - MELBY Jr., E. C. ALTIMOR, N.H. Handbook of laboratory. Animal Science, 3, 1976.
- 7 - MITCHELL, J.B., RUSSO, A., BIAGLOW, J.E. and MCPHERSON, S. Cellular Glutathione Depletion by Diethylmaleate or Butthionine Sulfoximine: No effect of Glutathione Depletion on the oxygen Enhancement Ratio. Radiation Research. 96, 422-428, 1983.
- 8 - 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 - SP/RJ. LIVRARIA ATHENEU-1982.
- 9 - REVESZ, L. The Role of Endogenous Thiois in Intrinsic Radioprotection. Journal Radiat. Biol. 47(4):361-368, 1985.
- 10 - SEYMOUR, C.B., MOTHERSILL, C. MORIATY, M.J. and TRIPTON, K. F.. The effect of ethanol on the Radiation Response of CHO-K<sub>1</sub>. The British Journal of Radiology. 60, 577-581, 1987.
- 11 - SURINIVASAN, M.N. BASU, S.K. and CHOSE, A. Effect of Chemical Radioprotectors on Serum Proteins of Rats Exposed to Gamma Radiation. Indian Journal of Experimental Biology. 23:490-492, 1985.



12. VANDERSCHARS, G.P., VOS, M.D., O.; ROOSVERHEIJ, W.S. and LOHMAN, P.H.M. The influence of oxygen on Induction of Radiation Damage in DNA in Mammalian, Cell After Sensitization by Intracellular Glutathione Depletion. GSH and Oxygen Concentration. In: Journal Radiation Biol. 50 (3): 453-465, 1986.

TABELA 1 - Valores de Proteína Total e Frações de Proteínas Séricas (albumina e gamaglobulina) de camundongos fêmeas de 8-10 Semanas após diversos tratamentos

Tratamento	Tempo após Irradiação	PT (g%)	ALB (g%)	Gama (g%)
Controle		4,0±0,8	57,8±3,8	6,3±1,2
DEM + ÓLEO	1 h	3,9±0,1	54,4±6,7	6,0±2,6
	3º dia	3,7±0,3	56,3±8,6	7,6±3,3
	7º dia	4,2±0,3	61,2±5,4	6,3±1,7
Óleo	1 h	3,6±0,3	53,6±4,3	6,7±2,8
	3º dia	3,9±0,6	56,6±2,08	8,3±2,0
	7º dia	4,0±0,16	51,1±5,7	11,0±8,7
Óleo IRR	1 h	-	-	-N.D
	3º dia	3,6±0,3	59,0±2,4	5,4±2,4
	7º dia	3,5±0,3	54,7±4,7	5,8±2,4
DEM+Óleo+IRR	1 h	3,7±0,1	52,8±5,3	6,2±1,9
	3º dia	3,8±0,4	55,0±6,3	3,6±2,3
	7º dia	3,5±0,4	47,3±3,8	8,12±0,9
Só Irradiado	1 h	3,6±0,2	57,6±7,5	7,3±5,2
	3º dia	3,3±0,3	49,7±7,7	7,0±2,9
	7º dia	3,7± -	57,5± -	6,3± -
DEM + ALC	1 h	5,0±	58,2±	11,6±
	3º dia	5,8±	68,6±	N.D.
	7º dia	5,6±0,59	59,4±	N.D.
DEM+ALC+IRR	1 h	5,2±	53,3±	11,1
	3º dia	5,4±0,3	56,3±13,6	6,8±3,9
	7º dia	4,3±1,7	52,5± 7,7	7,6±8,0
Álcool	1 h	5,1±0,01	57,25± 4,5	7,0±0,4
	3º dia	5,4±0,4	60,15± 5,7	N.D.
	7º dia	5,17±0,17	56,2± 3,3	7,2±3,2
ALC + IRR	1 h	5,5±0,28	58,5±11,0	8,8±2,4
	3º dia	5,3±0,07	56,15± 3,7	11,9±1,7
	7º dia	5,2± -	49,4± -	8,1± -

TABELA 2 - Valores de Proteínas Total e Frações Proteínas Séricas (albumina e gamaglobulina), de camundongos machos 8-10 semanas após diversos tratamentos.

Tratamento	Tempo após Irradiação	PT (g%)	Alb (g%)	Gama (g%)
Controle	-	3,3±1,1	58,0±4,3	8,2±0,14
DEM + ÓLEO	1 h	3,8±5,3	52,6±5,3	8,6±5,16
	3º dia	3,9±0,23	54,6±4,9	7,5±1,2
	7º dia	3,8±0,6	51,3±4,6	5,5±1,3
Óleo	1 h	4,0±0,27	55,5±4,3	5,9±3,7
	3º dia	4,0±0,3	53,8±3,3	6,2±1,6
	7º dia	3,65±0,35	47,7±5,8	7,7±4,2
Óleo IRR	1 h	3,2±0,43	56,3±4,3	5,0±3,0
	3º dia	3,6±0,88	52,5±6,4	5,32±1,6
	7º dia	3,6±0,25	50,6±3,6	7,16±1,0
DEM+Óleo+IRR	1 h	3,9±0,05	55,8±4,0	5,14±0,9
	3º dia	3,3±1,15	53,6±8,7	5,1±1,2
	7º dia	3,3±1,15	54,0±6,0	5,3±1,3
Só Irradiado	1 h	3,58±0,36	54,23±4,0	6,36±0,9
	3º dia	3,92±0,14	59,48±7,0	3,14±1,6
	7º dia	3,26±1,21	55,5±1,96	5,10±1,3
DEM + ALC	1 h	6,3 ±	56,4 ±	9,2 ±
	3º dia	4,8 ±10	55,1 ±2,8	13,7 ±9,0
	7º dia	5,5 ±0,4	43,9 ±0,14	12,8 ±1,7
DEM+ALC+IRR	1 h	6,2 ±2,5	58,9 ± 3,2	7,4 ±1,4
	3º dia	5,28±0,4	52,9 ±11,0	9,4 ±4,9
	7º dia	5,0 ±0,14	35,90± 2,2	5,4 ±1,2
ÁLCCOL	1 h	5,43±0,67	50,2 ± 9,4	9,7 ±3,6
	3º dia	5,35±1,9	55,8 ±13,0	N.D.
	7º dia	5,3 ±0,4	44,0 ± 6,8	12,1 ±2,5
ÁLC + IRR	1 h	4,89±0,26	44,8 ± 4,6	8,15±2,3
	3º dia	5,2 ±1,9	48,0 ± 6,7	9,2 ±4,0
	7º dia	43,2 ±3,7	51,0 ± 4,4	7,9 ±2,2