

BR8921113

INIS-BR--1619

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

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO DE ^{60}Co NA SOBREVIVÊNCIA DE DIFERENTES
LINHAGENS DE CAMUNDONGOS. RADIOMODIFICADORES E RESPOSTA CELULAR**

ANNA LUCIA CASANAS HAASIS VILLAVICENCIO

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

Orientadora: Dra. Nélida Lucia Del Mestre

SÃO PAULO
1988

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

AValiação DO EFEITO DA RADIAÇÃO DE ^{60}Co NA SOBREVIDA DE

DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS.

RADIOMODIFICADORES E RESPOSTA CELULAR

ANNA LÚCIA CASAÑAS HAASIS VILLAVICENCIO

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

Orientadora: Dra. Nélida Lucía Del Mastro

SÃO PAULO

1988

AGRADECIMENTOS

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

À Dra. Nêlida Lucia Del Mastro,

Chefe da Divisão de Radiobiologia do IPEN, pelo relevante papel exercido em minha formação profissional, orientação desta dissertação, ensinamentos, estímulo e amizade.

Ao Prof. Dr. Bernardo Leo Wajchenberg,

por nos ter introduzido no campo das aplicações de radioisótopos e nas pesquisas radioimunológicas.

Ao Dr. Laercio Vinhas,

Diretor de Segurança Nuclear no IPEN, pelo interesse manifesta do pela evolução dos trabalhos de pesquisa que constituem o objeto desta dissertação, enquanto estivemos sob sua diretoria.

Ao Dr. Roberto Fulfaro,

Diretor de Aplicações de Técnicas Nucleares, pelo incentivo às pesquisas realizadas em nossa divisão.

À Dra. Vânia Caira Borghi,

por sua valiosa ajuda, permitindo o uso do micro computador a ela cedido pelo CNPq.

Aos colegas do Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas,

pela valiosa colaboração com que contribuíram na execução deste trabalho.

À Vanda Donizetti Redondo Silveira,

pelas sugestões referentes à análise estatística.

À Antonio Soares de Gouveia e sua equipe, em particular à Edna Maria Lourenço Lopes,

Chefe de Divisão do CPD deste Instituto, pela programação e processamento dos dados.

Ao msc. Roberto Villavicencio Alegria,

pelo incentivo, apoio e cooperação constantes.

• 12

Aos meus pais

FRANZ e FANNY

Dedico

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO DE ^{60}Co NA SOBREVIDA DE
DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS.
RADIOMODIFICADORES E RESPOSTA CELULAR**

ANNA LÚCIA CASAÑAS HAASIS VILLAVICENCIO

R E S U M O

Foi feita uma avaliação da capacidade de proteose-peptona, derivados do imidazole, Azomycin e levamisole, de modificar a resposta à irradiação com dose única de 8 ou 9 Gy de ^{60}Co em camundongos albinos provenientes do biotério do IPEN e comparadas as respostas com as de outras linhagens e origens. Ao nível de alterações dos índices de sobrevivência à irradiação, observou-se que proteose-peptona, azomycin, e proteose-peptona + azomycin apresentam um efeito radioprotetor. Levamisole por sua vez, mostrou-se radiosensibilizador. As taxas de sobrevivência, contudo, foram diversas para as diferentes linhagens ensaiadas. Foram acompanhadas as modificações nas curvas de peso corporal dos animais para todos os experimentos durante 30 dias. As análises qualitativa e quantitativa 2 horas, 3 e 6 dias após irradiação de macrófagos esféricos, mononucleares (células com aparência de monócitos ou linfócitos), polimorfonucleares e mastócitos do peritônio dos animais em estudo, mostraram que a radiação interfere de modo diferencial na cinética das células peritoneais.

**EVALUATION OF ^{60}Co RADIATION EFFECT IN THE SURVIVAL OF
DIFFERENT MOUSE STRAINS.**

RADIOMODIFIERS AND CELLULAR RESPONSE.

ANNA LÚCIA CASANAS HAASIS VILLAVICENCIO

A B S T R A C T

The radiomodifier capacity of proteose-peptone (PP), imidazole derivatives such as azomycin and levamisole against an 8 or 9 (single dose of ^{60}Co irradiation of mice from IPEN animal house was evaluated, being the biological responses compared with other mouse strains. It is concluded that PP, azomycin and PP + azomycin behaved as radioprotectors, while levamisole appeared as a radiosensitizer. The various strains showed differences in their survival indexes. The changes in body weight curves of mice from all the experiments were followed during 30 days. Qualitative and quantitative analysis 2 hours, 3 and 6 days after irradiation of typical macrophages, mononuclear cells (monocytes and lymphocytes), polymorphonuclear and mast cells from peritonium of test animals showed that radiation interfered in a differential way in the kinetics of peritoneal cells.

Í N D I C E

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Material biológico	19
2.2. Irradiações	19
2.3. Curvas de sobrevivência e peso	20
2.4. Obtenção de células peritoniais	21
2.5. Análise das células do exsudato peritoneal ...	22
2.6. Tratamentos	23
2.6.1. Proteose Peptona (PP)	23
2.6.2. Derivados do Imidazole	24
2.6.3. Tratamento conjunto PP + AZO	25
2.6.4. Cisteína	26
2.7. Análise estatística	26
2.8. Representações gráficas	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Influência de Proteose-Peptona e irradiação so bre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e cé lulas do peritônio de camundongos de diferentes linhagens	29
3.1.1. Linhagens resistentes à radiação. Ca- mundongos albinos do IPEN e EPM	29
3.1.1.1. Taxas de sobrevivência	29

3.1.1.2.	Peso médio corporal	31
3.1.1.3.	Células de Peritônio	31
3.1.2.	Linhagens sensíveis à radiação: C57BL/6 e C57BL/10	36
3.1.2.1.	Taxas de sobrevivência	36
3.1.2.2.	Peso médio corporal	36
3.1.2.3.	Células do Peritônio	36
3.2.	Influência de derivados de imidazole e irradiação, sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e células do peritônio de camundongos de diferentes linhagens	42
3.2.1.	Linhagens resistentes à radiação. Camundongos albinos do IPEN submetidos a tratamento com Azomycin (AZO)	42
3.2.1.1.	Taxa de sobrevivência	42
3.2.1.2.	Peso médio corporal	44
3.2.1.3.	Células do Peritônio	44
3.2.2.	Linhagem sensível à radiação. Camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com Azomycin (AZO)	49
3.2.2.1.	Taxa de sobrevivência	49
3.2.2.2.	Peso médio corporal	49
3.2.3.	Linhagem resistente à radiação. Camundongos albinos do IPEN submetidos a tratamento com Levamisole (Lev)	49
3.2.3.1.	Taxa de sobrevivência	49
3.2.3.2.	Peso médio corporal	52
3.2.3.3.	Células do Peritônio	52

3.2.4.	Linhagem sensível à radiação. Camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com Levamisole (Lev)	56
3.2.4.1.	Taxa de sobrevivência	56
3.3.	Influência do tratamento conjunto PP + AZO e irradiação, sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e células do peritônio de camundongos de diferentes linhagens	58
3.3.1.	Linhagem resistente à radiação. Camundongos albinos submetidos a tratamento com PP + AZO	58
3.3.1.1.	Taxa de sobrevivência	58
3.3.1.2.	Peso médio corporal	58
3.3.1.3.	Células do Peritônio	61
3.4.	Influência de cisteína (CIS) e irradiação sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e células do peritônio de camundongos	66
3.4.1.	Linhagem resistente à radiação	66
3.4.1.1.	Taxa de sobrevivência	66
3.4.1.2.	Peso médio corporal	66
4.	DISCUSSÃO	70
5.	CONCLUSÕES	85
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos biológicos das radiações podem ser úteis para a preservação da vida, como na terapia do câncer, ou deletérios. 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, podendo surgir diversos tipos de lesões. É importante, por isso, conhecer as ações exercidas pelas radiações incidindo sobre as células, tecidos e organismos.

Os seres vivos estão sendo constantemente bombardeados por vários tipos de radiação: luz visível, luz infravermelha, radiação ultravioleta, ondas de rádio, radiação ionizante e radiação por partículas, podendo todos eles apresentar manifestações de transferência de energia.

As radiações ionizantes exercem sua atividade nos tecidos no plano químico, por meio da ionização das moléculas das células. A ionização implica numa alteração da carga molecular, que se realiza pela remoção de um elétron da nuvem de elétrons que circunda o núcleo do átomo. As partículas α e β , podem produzir lesão cutânea nos casos de aplicação externa, porém, quando derivam de radioisótopos apli

cados internamente podem irradiar diversos órgãos, dependendo da distribuição particular do isótopo. Com respeito à radiação eletromagnética, os raios gama e os X são muito semelhantes, diferindo em sua origem. Os raios gama possuem grande penetrabilidade causando lesões nos tecidos profundos.

Todos os organismos vivos são constituídos por células que são compostas por: membrana externa, citoplasma e núcleo. Os componentes químicos das células são de natureza diversa: carboidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, mucopolissacarídeos, eletrólitos, água etc..., sendo a água o principal constituinte com aproximadamente 70% da massa celular. Quando a célula é bombardeada ou irradiada por radiações ionizantes, vários fenômenos ocorrem e vários dos componentes químicos podem ser atingidos com a consequente ionização, o que os tornam quimicamente muito reativos e podem ocorrer por exemplo, a formação de ligações químicas, rupturas moleculares em proteínas e ácidos nucleicos e assim por diante. Sendo a água o componente químico mais abundante ele constitui o alvo mais provável da radiação e os radicais livres formados reagem com os demais constituintes provocando alterações secundárias indiretas^{11,38}.

Cronologicamente, os eventos resultantes da troca de energia entre a radiação e a matéria se processa na seguinte ordem:

- **Fase física:** na qual a radiação ao atingir os constituintes moleculares provoca sua excitação e ionização, e cuja duração aproximada é de 10^{-14} de segundo. Não há tratamento e a proteção é a blindagem;

- **Fase físico-química:** onde, em consequência da ionização, se formam radicais livres, quebra de ligações S-H; N-H e C-H, transferência de energia etc, cuja duração é de 10^{-14} a 10^{-12} de segundo. Como tratamento poderia ser feita alguma proteção pela injeção de aditivos antes da irradiação;

- **Fase química:** em que os radicais livres formados continuam a reagir com os demais constituintes celulares, promovendo a quebra das ligações C-C, C-N, formando radicais secundários, produtos estáveis passam a aparecer e dando origem a produtos tóxicos. Começa o dano ao DNA e RNA, enzimas são ativadas e inativadas, depleção de SH, peroxidação em lipídeos, dano geral a biomoléculas. A duração é de 10^{-12} a 10^{-7} segundos. A toxicidade dos produtos começa e como medida de proteção e tratamento temos a proteção parcial dos "scavengers" e antioxidantes, catalase e glutathione peroxidase protegendo contra o H_2O_2 formado. Temos radicais SH protegendo e sistemas de enzimas atuando;

- **Fase biológica:** onde se manifestam os efeitos bioquímicos, fisiológicos, metabólicos, morfológicos e outros, há um estado onde os efeitos químicos e biológicos coincidem, no tempo de 10^{-3} a 10 segundos onde os peróxidos orgânicos, radicais secundários, H_2O_2 , hidroperóxidos continuam a agir po

rêm muitas reações bioquímicas são interrompidas e começa o reparo do DNA. A proteção e o tratamento pós-irradiação deveria começar. De 10 segundos a 10 horas, a maioria das reações são completadas, porém as reações secundárias continuam, onde a mitose das células irradiadas é diminuída, reações bioquímicas bloqueadas, rompimento de membrana etc. Podem ser aplicados tratamentos convencionais para radioacidentados ou pacientes de radioterapia⁰².

As radiações podem alterar ou destruir as células vivas, trazendo como consequência ao sistema ao qual pertencem, efeitos deletérios ou não⁰³. Das interações entre as radiações ionizantes e os organismos vivos sobressaem dois tipos de efeitos: os efeitos genéticos e os efeitos somáticos. A radiosensibilidade não é homogênea para as diferentes células, tecidos, órgãos ou organismos em face da mesma dose de radiação. Assim, nos vertebrados, por exemplo, há células que são especialmente radiosensíveis e células que são mais radioresistentes. Entre os fatores que influenciam a radiosensibilidade celular, se incluem a atividade mitótica, a fase da mitose, o grau de diferenciação celular e o metabolismo¹⁴.

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.

O oxigênio, elemento imprescindível à manutenção de nossa vida não se transforma em água diretamente. Durante as reações de que participa, formam-se algumas espécies in-

intermediárias denominadas espécies ativadas de oxigênio (EAO), que reagem com as moléculas orgânicas, alterando-lhes as propriedades. Em decorrência de sua configuração eletrônica, a molécula de oxigênio tem forte tendência a receber um elétron de cada vez, formando, durante as reações, espécies intermediárias que são fortes oxidantes. Duas delas - o ânion radical superóxido e o radical hidroxila - apresentam um elétron desemparelhado no orbital externo. Constituem, pois, espécies radicais fortemente reativas. Há indícios de que as EAO formadas no metabolismo celular produzem lesões no ADN e em outras estruturas das próprias células, fenômeno causador de doenças e provavelmente relacionado com o processo de envelhecimento^{32, 33}.

As reações dos radicais livres ocorrem em cadeia e o início delas pode ser produzido por três tipos de processos: homólise de pontes, fotólise de alta energia ou radiólise e reação de redução de elétron³⁹. Diretas ou indiretas essas alterações determinarão os efeitos biológicos. Num sentido mais amplo, qualquer transferência de energia de qualquer natureza para os organismos vivos pode determinar um efeito biológico.

As reações de radicais livres são importantes nos sistemas biológicos e críticas no espectro dos processos biológicos. A ação catalítica de muitas enzimas e transporte da cadeia de elétrons envolve a transferência de um elétron do radical livre intermediário³⁹.

A célula tem várias formas de se defender das EAO, fundamentalmente através da ação das enzimas. Além das enzimas, há os antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione e as vitaminas C e E, que reagem diretamente com as EAO, destruindo-as. É preciso destacar que o organismo sabe aproveitar o potencial destruidor dessas espécies para proteger-se contra bactérias e outros microorganismos invasores^{32,33}.

A reatividade química dos radicais livres é geralmente alta e é influenciada pela temperatura, pela concentração de moléculas ao seu redor e ainda pela natureza do solvente³⁹.

Com relação à sobrevivência dos seres vivos, interessa o distúrbio do estado de equilíbrio dinâmico dos sistemas de renovação celular, já que a recuperação do organismo está intimamente ligada à capacidade de regeneração dos elementos funcionais.

As substâncias com potencial radioprotetor ou radiosensibilizador podem agir ao nível químico bem como ao nível da expressão fisiológica do efeito biológico da radiação.

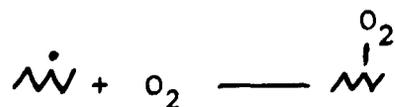
Certo número de compostos orgânicos que contêm enxofre, particularmente os que possuem um grupo sulfidril (-SH), protegem as células contra o dano por radiação⁶. Alguns deles são constituintes normais das células e proteínas que contêm sulfidrilas, por exemplo, os encontrados nos cromossomos dos organismos. Estas substâncias naturalmente

protetoras são, sem sombra de dúvida, efetivas em proteger as células contra efeitos nocivos das radiações, mas é possível obter proteção adicional mediante a aplicação de outros tratamentos.

De acordo com várias hipóteses os compostos sulfidrilícos bloqueiam o processo pela reação com os radicais livres em competição pelo O_2 . Os maiores radioprotetores são os mercaptanos orgânicos, em particular os aminoácidos cisteína e cisteína, os quais contêm um átomo de hidrogênio lábil; menos eficientes são certamente outros aminoácidos e álcoois. O modelo mais popular para explicar a radioproteção por compostos SH postula que o radical macromolecular livre formado no alvo celular, por ação direta ou indireta, é restaurado pela transferência do átomo de hidrogênio do grupo SH do protetor¹¹.



Reações de reparo deste tipo tem sido observadas por técnicas de radiólise. Na ausência de agentes protetores de radical livre \dot{M} é um precursor do dano molecular, expresso após em nível celular. Na presença do oxigênio, o radical pode ser convertido no radical peróxido.



A competição entre o hidrogênio endógeno tal como o RSH e o oxigênio podem ser um determinante da extensão do dano¹¹.

A proteose-peptona é um digerido de proteínas contendo proteoses, polipeptídeos e aminoácidos ricos em grupos $-SH$. Quando injetado na cavidade peritoneal, ela produz uma reação inflamatória inespecífica, propriedade esta que é aproveitada em estudos farmacológicos e imunológicos.

Quando há uma inflamação, aparecem sinais químicos que orientam as células fagocitárias do sangue a se dirigirem para o sítio atingido. Há início de fagocitose, ao mesmo tempo em que se cria um estímulo para a produção de EAO nas membranas da célula fagocitária, que produz o ânion superóxido (O_2^-) por meio de uma enzima oxidase. A partir de O_2^- formam-se outras EAO, o ânion radical superóxido (SO_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) que é um oxidante poderosíssimo, capaz de reagir com qualquer molécula orgânica de forma quase instantânea. Estas espécies intermediárias matam as bactérias invasoras que acabam sendo fagocitadas³³.

Há vários processos degenerativos provocados ou influenciados por EAO, por exemplo: artrite, catarata, enfisema, doença de Parkinson, diabetes aloxânica, lesão isquêmica, porfiria aguda intermitente, transformação maligna e envelhecimento. Em outras afecções, os EAO são formados por vias diferentes. Em todos os casos patológicos, porém, a ação da catalase, da superóxido dismutase e de outras defesas existentes nas células não é suficiente para resistir a uma pro-

dução elevada das EAO e as células acabam mortas e o tecido sofre lesões³³. Assim, as EAO produzidas pela radiação ionizante são também produzidas durante a respiração aeróbica e durante o desenvolvimento do processo inflamatório.

Por causa da ubiquidade do oxigênio molecular nos organismos aeróbicos e sua habilidade de aceitar elétrons os radicais livres derivados do oxigênio são freqüentes mediadores de muitos processos normais, patológicos ou reações tóxicas de radicais livres³⁹.

As EAO são usadas assim como agente terapêutico, por exemplo, nas câmaras hiperbáricas, na radioterapia, como agentes quimioterápicos, nos mecanismos de ação de antibióticos bleomicina e adriamicina e também usadas no combate à malária e doenças de Chagas³³.

Nas reações inflamatórias, os tipos fundamentais de glóbulos brancos que tomam parte são: polimorfonucleares, linfócitos, mastócitos, monócitos e macrófagos. Cada uma destas células desempenha um papel distinto e entra na resposta inflamatória de acordo com uma relação seqüencial definida¹². Os polimorfonucleares (POLI) são classificados em três tipos, de acordo com as granulações encontradas no citoplasma: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os linfócitos tem uma mobilidade que é mais ou menos casual, de modo que raramente se acumulam em zona inflamatória durante os estádios precoces da resposta. Aparecem, no processo inflamatório mais tardiamente e, por isso, são característicos da inflamação crônica. A fun-

ção mais importante do linfócito, em zona inflamatória, parece ser a de liberar anticorpos.

Os linfócitos têm a característica de ser extremamente radiosensíveis²⁷.

O mastócito, muito raro no sangue circulante, representa a fonte de reserva principal de histamina e heparina¹³. Estes dois mediadores químicos são liberados quando os mastócitos e os basófilos são lesados, e participam do controle da inflamação. Os fagócitos mononucleares, denominação dada por alguns autores para macrófagos e monócitos, tem morfologia e função semelhantes. Pensa-se que eles derivam de fontes diferentes e, em condições normais, são encontrados em locais diversos. Ambos vivem muito mais tempo que os polimorfonucleares, provavelmente semanas ou meses. São encontrados em grande número no local da reação inflamatória e como estas células podem permanecer ativas em pH abaixo de 6,8¹², persistem após a destruição dos polimorfonucleares pela acidose crescente do meio. Nos estádios tardios da inflamação podem fagocitar os polimorfonucleares mortos, já que uma das funções importantes destas células é a digestão celular ou de detritos, realizada por meio de suas enzimas hidrolíticas. Os fagócitos mononucleares são importantes não somente na defesa direta contra os microorganismos patogênicos por meio da fagocitose, mas também em uma variedade de processos imunológicos incluindo a estimulação de linfócitos, a regulação das respostas destes e a resistência a células tumorais⁵⁷. Os monó-

citos do sangue possuem a capacidade de migrar para focos de inflamação em resposta a fatores quimiotáticos e transformam-se em macrófagos ^{10, 35, 57}. 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, por exemplo, os da cavidade peritoneal e do pulmão, proliferam quando estimulados apropriadamente. 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 ⁵⁷. Sabe-se, há décadas que os macrófagos de animais infectados com certos microorganismos diferem morfológica e metabolicamente dos macrófagos normais. Os fagócitos mononucleares podem ficar ativados pela exposição às linfocinas provenientes de linfócitos T sensibilizadores ou pela ação de endotoxinas bacterianas ⁵⁷.

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 acionado em consequência da irradiação do organismo, provavelmente de maneira indireta, talvez pelo estímulo da fagocitose de produtos de degradação formados em consequência da interação da radiação nos tecidos. Macrófagos e monócitos circulantes são considerados radioresistentes ²⁷. É aceito por muitos que os macrófagos são relativamente radioresistentes quando sua capacidade funcional é medida imediatamente após a irradiação. Entretanto, es

tudos têm revelado que doses de 0,5 a 8,0 Gy podem produzir mudanças 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 ou mais Gy²⁰.

Os granulócitos, em sua função sem implicar divisão celular, também são radioresistentes⁵⁴.

Alguns compostos, por exemplo, endotoxina bacteriana, são capazes de ativar os macrófagos diretamente. Outros agentes como células mortas de *Corynebacterium parvum* demonstram ativar os macrófagos tanto diretamente, atuando sobre o próprio macrófago, quanto indiretamente, induzindo linfócitos T a liberar o fator de ativação de macrófago⁵⁷. Os macrófagos ativados são maiores do que os normais e a migração é muito aumentada. Os macrófagos ativados apresentam um metabolismo alterado quando comparados com os normais e demonstram uma maior utilização de glicose através da derivação hexose-monofosfato e uma maior atividade da enzima de membrana, adenil-ciclase, e da enzima citoplasmática, desidrogenase lática⁵⁷. Os macrófagos ativados também têm um maior número de lisossomos contendo enzimas hidrolíticas; além disso, os macrófagos ativados possuem uma atividade antimicrobiana aumentada, uma maior capacidade de regular as respostas dos linfócitos e uma maior atividade inespecífica de inibição de tumores ou tumoricidas. Métodos variados de ativação de macrófagos produziram populações de macrófagos que matam patógenos

microbianos mas não células tumorais; o inverso também já foi demonstrado. Portanto, se os macrófagos são definidos como estando ativados através de um critério, não se pode concluir que estes macrófagos adequar-se-ão a todas as outras propriedades e funções que foram ativados por outros meios. A pinocitose e a fagocitose estão entre as principais atividades dos macrófagos⁵⁷.

Os macrófagos parecem ter um papel importante na resolução dos focos inflamatórios e na inflamação crônica. Sabe-se que os macrófagos têm uma função de limpeza. Além disso, podem liberar uma variedade de enzimas hidrolíticas que contribuem para os processos inflamatórios. Vários estímulos levam os macrófagos a liberar no espaço extracelular enzimas degradativas, por exemplo, as hidrolases ácidas, colagenases e o ativador do plasminogênio. Estes produtos macrofágicos desempenham um papel importante no desenvolvimento de necrose nos sítios inflamatórios e portanto na patogênese de certas doenças^{57, 12}.

Algumas formas de câncer são susceptíveis à radiação e são radiocuráveis, em muitos casos a irradiação é empregada interrompendo a formação da lesão maligna. Quando não dispomos de um agente quimioterápico eficaz contra certo tipo de câncer, freqüentemente a radiação representa o único instrumento para combater o tumor. Devemos lembrar, no entanto, que na irradiação do tumor os tecidos normais como a pele e as estruturas ao redor deste, podem também ficar expostas e serem lesadas.

A própria radioterapia está baseada na produção de EAO pela decomposição das moléculas de água e a conseqüente destruição das células tumorais³³.

Assim, surge a necessidade do estudo e desenvolvimento de substâncias radiomodificadoras capazes de proteger os tecidos sadios e outras de radiosensibilizar o tecido tumoral, potencializando ou diminuindo os efeitos de uma dada dose de radiação²³. A substância ideal seria que exercesse ambas as ações simultaneamente.

Os efeitos biológicos produzidos por radiações ionizantes são consideravelmente menores na ausência de O_2 que em sua presença. Este fato foi descoberto nos anos de 1920, e sua possível aplicação foi notada nos anos 30. Entretanto, a natureza universal do "efeito de O_2 ", é de completa significância para o tratamento de tumores humanos, e soluções para o problema não emergiram até os anos 50, quando numerosos estudos clínicos se iniciaram com o oxigênio hiperbárico e mais recentemente com radiosensibilizadores de células em hipóxia¹⁹, no sentido do controle das taxas de O_2 de controle local⁰⁹.

Muitas substâncias são conhecidas como capazes de modificar o efeito da radiação nos organismos. Na prática, não é sempre possível decidir se um tratamento que modifica a radiosensibilidade de um tecido o faz mudando as reações químicas que conduzem ao dano macromolecular ou se modifica a resposta fisiológica da célula em presença de tal dano. Deri-

vados do imidazol, como os nitroimidazóis constituem um grupo de compostos que sensibilizam células tumorais (células hipóxicas) normalmente resistentes à radiação e são assim muito úteis em radioterapia^{36,37}. De modo geral, compostos que apresentam eletroafinidade, como é o caso dos nitroimidazóis, nitrofuranos, nitrobenzenos e quinonas podem estimular diferencialmente a sensibilidade de células hipóxicas à radiação^{01,26}. Na maioria dos casos, porém, o máximo grau de sensibilização atingido não excede ao efeito sensibilizador do oxigênio. A eficiência da sensibilidade produzida por estes compostos tem sido diretamente relacionada com seu potencial de redução de um elétron e algumas hipóteses atribuem o efeito sensibilizador a um mecanismo de ação direta^{20,31}. Estes compostos aumentariam a probabilidade de aprisionamento de elétrons aumentando o número de radicais livres nos sítios de ionização^{01,11}. Os mecanismos moleculares para a radiosensibilização por compostos com eletroafinidade têm sido postulados não só em termos de processos químicos da radiação, mas também em função da toxicidade nas células e especialmente da depleção dos protetores biológicos, por exemplo, os tióis¹¹.

Alguns tipos de tumores oferecem resistência a tratamentos radioterápicos e quimioterápicos. Se a remoção cirúrgica não pode eliminar estas células, o tumor volta a crescer e ocorrer¹⁸. As células confinadas no interior dos tumores, são hipóxicas ou anóxicas. Em 1960, descreveram-se muitos compostos por terem a capacidade de sensibilizar microorganismos hipóxicos. A sensibilização por compostos do grupo Ni

tro é relacionada com a eletroafinidade do composto. Estes compostos têm sido usado para aumentar a formação de radicais livres.

No caso dos nitroimidazóis, dependendo da posição do grupo nitro (NO_2) a droga pode se tornar mais ou menos eficiente como radiosensibilizador de células hipóxicas. Ambos O_2 e Nitroimidazóis difundindo nos capilares, são metabolizados pela massa da célula tumoral. O O_2 é metabolizado rapidamente e percorre uma distância de 150 - 200 μ no capilar. Por outro lado, drogas como o nitroimidazol são vagarosamente metabolizadas, o que é uma de suas propriedades essenciais para sensibilização de células hipóxicas. Conseqüentemente elas são capazes de se difundir em maiores distâncias que o O_2 e reagir com a célula hipóxica, em apreciável concentração²³.

Isto tem sido confirmado experimentalmente por biópsias de espécimens de áreas necróticas de tumores de pacientes onde foi verificado que a concentração do nitroimidazol é 70% - 80% da do plasma sanguíneo. Os nitroimidazóis, de certo modo, sensibilizam parcialmente todas as células hipóxicas, e desta maneira são muito mais efetivos que a alta pressão de O_2 , o qual sensibiliza completamente algumas das células hipóxicas periféricas do tumor²³.

Certos imidazóis, em geral, são de interesse na terapia do câncer por sensibilizarem células hipóxicas à radiação e por ser ademais seletivamente tóxicos para células hipóxicas. A habilidade da radiosensibilização dos nitroimida

zóis por exemplo, é exercida pela presença dos grupos nitro, entretanto a toxicidade hipóxica é relatada como sendo provocada pela redução enzimática deste grupo por intermediários que reagem com nucleófilos celulares. Alterações bioquímicas causadas pela incubação de células com nitroimidazóis sob condições hipóxicas "in vitro", inclui formação de DNA, depleção intracelular do -SH não protéico e queda dos níveis de -SH protéico⁵⁶.

Um esquema metabólico para a redução do grupo nitro inclui a formação de um radical ânion nitro ($R-NO_2^-$) pela aceitação de um elétron. Esta reação é suprimida pelo oxigênio molecular. Sabe-se que o dano indireto em DNA em termos de quebras de pontes e danos na base de timina pela radiação ionizante é dependente de uma grande extensão dos radicais hidroxilas formados pela radiólise da água e em aumento na presença do oxigênio. Postula-se que um 2-nitroimidazole que mimetiza o efeito do oxigênio, pode agir ao afetar o nível das bases de DNA como exemplificado pela formação do produto tipo 5,6 - dihidroxidihidrotimina³⁷.

O B J E T I V O S

- 1) Estabelecer a capacidade de proteose-peptosa, cisteína e derivados de imidazol, de modificar a resposta à radiação de ^{60}Co em camundongos.
- 2) Comparação das respostas entre animais albinos, C57BL/6 e C57BL/10.

O estudo será realizado em três níveis:

- a) Análise das alterações dos índices de sobrevivência à irradiação;
- b) Modificação nas curvas de peso corporal dos animais submetidos a experimentos e;
- c) Análise qualitativa e quantitativa das células peritoneais dos animais examinados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Utilizaram-se camundongos albinos, C57BL/6 e C57BL/10, machos e fêmeas com idades variando de 8 a 12 semanas, provenientes dos biotérios do IPEN, da Escola Paulista de Medicina (EPM) e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP, mantidos no biotério do IPEN em dieta usual de laboratório e água fresca ad libitum.

2.2. IRRADIAÇÕES

As irradiações foram feitas em uma fonte gama de ^{60}Co , Gamma Cell 220, (Atomic Energy of Canada, ltd.). A fonte tinha uma atividade aproximada de 2.300 Ci ($8,5 \times 10^{13}\text{Bq}$) em setembro de 1984. As dimensões da câmara de irradiação são 15,49 cm de diâmetro por 20,47 cm de altura. A fonte, propriamente dita, está localizada no centro de uma blindagem de chumbo e consiste em 26 varetas, cada uma possuindo 7 pastilhas de ^{60}Co , num total de 182 pastilhas. A dose foi de 8,0 Gy para os primeiros experimentos e de 9,0 Gy para os realizados 12 meses após. Irradiaram-se 3 animais por vez, dentro de uma câmara de papelão de 9 cm de diâmetro e 19 cm de altura, com uma taxa de dose média de 375,56 Gy/h.

A dose foi recalculada todos os meses, levando-se em consideração um decaimento de 0,989% por mês ($T_{1/2}^{60}\text{Co}$: 5,263 anos).

2.3. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA E PESO

Para a realização dos experimentos com diferentes drogas, os animais foram alojados em gaiolas metálicas para camundongos, em grupos de 5 a 10 animais por gaiola. Os animais foram pesados individualmente, identificados por grupos e protocolados de acordo com cada droga.

Em cada experimento para curvas de sobrevivência, os grupos foram constituídos a partir de ninhadas simultâneas, da seguinte forma:

- A) Lote de 5 animais testemunhas;
- B) Lote de 10 animais tratados com a substância a ser ensaiada;
- C) Lote de 20 animais irradiados;
- D) Lote de 20 animais irradiados e tratados.

O acompanhamento da experiência foi efetuado durante 30 dias após irradiação, com registro diário do número de sobreviventes e pesagem 3 vezes por semana.

2.4. OBTENÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS

Paralelamente às experiências realizadas sobre o efeito dos tratamentos na sobrevivência dos animais após irradiação, foi realizado um estudo da variação dos diferentes tipos celulares encontrados na cavidade peritoneal.

Foram observados os seguintes tipos de células:

- . Fagócitos mononucleares (macrófagos + mononucleares);
- . Macrófagos típicos;
- . Mononucleares (células com morfologia semelhante à dos monócitos ou linfócitos);
- . Polimorfonucleares (eosinófilos, neutrófilos, basófilos);
- . Mastócitos.

Para cada ponto foi computado o resultado da contagem de células provenientes de 5 animais.

Para cada um dos grupos formados, convencionalmente estabelecidos como A, B, C e D, descritos no item 2.3. foram colhidas amostras de exsudato peritoneal nos tempos:

t 3: No dia da injeção, quando necessário, três dias antes da irradiação;

T 0: No dia da irradiação e injeção de droga, quando foi o caso;

t 3: Três dias após a irradiação;

t 6: Seis dias após a irradiação.

A colheita do exsudato peritoneal foi realizada posteriormente à injeção ip de 3 ml de solução salina heparinizada em animais anestesiados, sacrificados e exangüinados. Após leve massagem do abdômen durante alguns minutos, foi colhido 0,9 ml de exsudato 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.

2.5. ANÁLISE DAS CÉLULAS DO EXSUDATO PERITONEAL

A análise diferencial foi realizada colocando-se alíquotas do material sobre lâminas recobertas por lamínulas e foram contadas 200 células no microscópio (Zeiss, ocular 12,5X e objetiva de 40X), utilizando-se o método de varredura em zig-zag, e registradas as correspondentes porcentagens de cada tipo celular. O valor absoluto de cada tipo celular foi obtido mediante a relação com o número de células totais multiplicadas pela porcentagem encontrada de cada tipo e dividido por cem, obtendo-se desta forma o total de células peritoneais de cada tipo.

A contagem das células totais foi realizada em câmara de Neubauer. O total das células encontradas foi mul-

tiplicado pelo fator da câmara (10^4), o que determina a quantidade de células por ml.

2.6. TRATAMENTOS

Os tratamentos utilizados foram os seguintes:

2.6.1. Proteose - Peptona (PP)

A Proteose Peptona é um hidrolisado de proteínas que contém proteoses, peptonas e aminoácidos, recomendado para a cultura de patógenos e particularmente para a produção de toxinas bacterianas (Control 671123, Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA, Guardado a $15 - 30^{\circ}\text{C}$).

Este composto injetado na cavidade peritoneal produz um exsudato inflamatório com efeito máximo no 39 dia após a injeção (28). Assim, nesta experiência, observou-se a sequência:

- 19) Injeção ip de PP 0,75 mg/0,75 ml por camundongo dos animais correspondentes aos grupos B e D. A PP foi dissolvida em solução salina (NaCl 0,85%) e esterilizada por fervura durante 30 minutos;
- 29) Irradiação dos grupos C e D após 3 dias da injeção;
- 39) Registro do peso corporal individual dos animais sobreviventes em intervalos de dois a três dias;

- 49) Registro do número de sobreviventes durante 30 dias.

2.6.2. Derivados do imidazole

- a) Azomycin, quimicamente é o 2-nitro-1H-imidazole (LD50 iv em camundongos 80 mg/kg segundo Index Merck). Esta substância quando injetada no organismo é absorvida em questão de horas, motivo pelo qual se observou o protocolo seguinte:

19) Injeção ip de Azomycin (Lote 122 F-0220, Sigma) 0,8 mg/0,5 ml por camundongo nos animais correspondentes aos grupos B e D. O azomycin foi preparado em solução alcalina fervente e depois ajustado o pH para 7,2.

29) Irradiação dos grupos C e D, 2 horas após a injeção. As demais etapas são semelhantes às descritas para o tratamento anterior.

- b) Levamisole, conhecido como Tetramisole, é quimicamente o (-)-2,3,5,6-tetraidro - 6 - fenilimidazo [2,1-b] tiazole (solubilidade em água 21 g/100 ml a 20°C).

Esta substância também é absorvida rapidamente pelo organismo, por isso, observou-se a seguinte:

19) Injeção ip de levamisole contendo 0,1mg/0,1 ml por camundongo nos animais correspondentes aos grupos B e D. O Levamisole foi preparado a partir de comprimidos de Ascariidil, dissolvidos em salina, removido o insolúvel por centrifugação, sendo a solução resultante posteriormente esterilizada em autoclave.

20) Irradiação dos grupos C e D uma hora após a injeção. As demais fases seguiramos procedimentos descritos anteriormente.

2.6.3. Tratamento conjunto PP-Azomycin (AZO)

Como em Radioterapia é de interesse combinar os efeitos de substâncias radioprotetoras de ação sistêmica e radiossensibilizadora de ação localizada, este experimento foi planejado para se conhecer o efeito da ação combinada de dois radiomodificadores que aparentemente agiriam por vias diversas. A seqüência de operações acha-se descrita a seguir:

19) Injeção ip de PP nos diferentes grupos B e D como já descrito no item 2.3.;

20) Três dias após a injeção ip de PP, injetou-se AZO duas horas antes da irradiação nos correspondentes grupos B e D;

- 39) Irradiação dos grupos C e D. As demais etapas seguem o procedimento já descrito.

2.6.4. Cisteína

É um aminoácido, conhecido quimicamente como L-cisteína, $C_3H_7NO_2S$ ou ácido 2-amino-3-mercaptopropanóico (CIS).

Esta substância, quando injetada no organismo, é rapidamente absorvida, motivo pelo qual se observou a seguinte:

- 19) Injeção ip de cisteína contendo 15 mg/0,5 ml por camundongos nos animais correspondentes aos grupos B e D. A CIS foi preparada em solução salina, NaCl 0,85% em tampão fostato 0,5M pH 7,2.
- 29) Irradiação dos grupos C e D, 30 minutos após a injeção. As demais fases seguem o procedimento já descrito.

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita uma primeira análise para comparar tipos de Linhagens, Células e Tratamentos.

Usando a técnica estatística Regressão Múltipla, aplicada a problemas de Análise de Variância para um experimento fatorial 4 x 4 replicado, segundo o modelo:

$$Y_{ti} = \eta + \zeta_t + \beta_i + \omega_{ti}$$

onde:

ζ_t = Efeito de tratamento

β_i = Efeito de linhagem ou tipo de células

ω_{ti} = Interação

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

A) Todos β_i são iguais;

B) Todos ζ_t são iguais;

Com a suposição adicional de que a distribuição dos erros do modelo é normal com média (verificado graficamente - gráfico de vidur) zero e variância σ^2 , o teste F foi feito através da análise de variância comparando o resultado dos quadrados médios (Q_m) dividido pelo quadrado médio residual, em um nível de significância de 5% ($\alpha = 5\%$).

Dado que o teste acima foi rejeitado, isto é, existe diferença significativa entre tipo de linhagem, tipo de células e tipo de tratamento, por meio do teste de DUNCAN, detectou-se em média quais dos efeitos eram significativamente diferentes ao nível de significância $\alpha = 5\%$.

Realizou-se uma segunda análise para a sobrevivência e peso médio durante os 30 dias, utilizando-se a técnica estatística "Análise de Variância", para comparação de 4 tipos

de tratamento (NO, IR, INJ, INJ/IR), sobre a hipótese ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$), isto é, as médias dos pesos e da taxa de sobrevivência dos tratamentos são iguais.

Dado que o teste de hipótese acima foi rejeitado, utilizou-se o teste de DUNCAN para detectar em média qual dos efeitos são significativamente diferentes, ao nível de significância $\alpha = 5\%$.

A análise estatística dos dados foi realizada pelo procedimento GLM do sistema SAS⁴², no Departamento de Processamento de Dados do IPEN.

2.8. REPRESENTAÇÕES GRÁFICAS

Usou-se o microcomputador modelo 1-7000 PC XT II da Itautec Informática S/A., com "software" Caltec/PC., acoplado à impressora Emilia PC, equipamento este cedido pelo CNPq.

3. RESULTADOS

3.1. Influência de Proteose-Peptonas (PP) e irradiação sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e células do peritônio de camundongos de diferentes linhagens.

3.1.1. Linhagens resistentes à radiação. Camundongos albinos do IPEN e EPM.

3.1.1.1. Taxas de sobrevivência

Para os machos das linhagens albinas, tanto oriundas do IPEN, como da EPM, os resultados obtidos na taxa de sobrevivência mostram um aumento significativo no número de animais sobreviventes à irradiação com 9 Gy ^{60}Co . Nos grupos de camundongos do IPEN previamente injetados com PP, a sobrevivência foi de 72% aos 30 dias nos animais tratados frente a 40% nos animais somente irradiados (Fig. 1 A). Resultado semelhante foi obtido com animais oriundos da EPM, onde os índices de sobrevivência foram 67% e 39% respectivamente (Fig. 1 B).

Estatisticamente, mostrou-se que os controles normais e os controles injetados comportam-se igualmente na taxa de

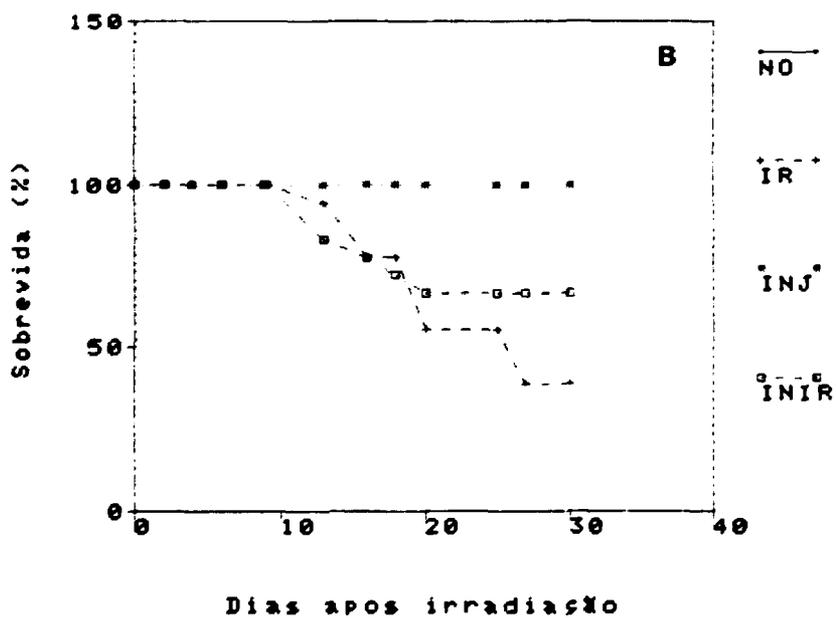
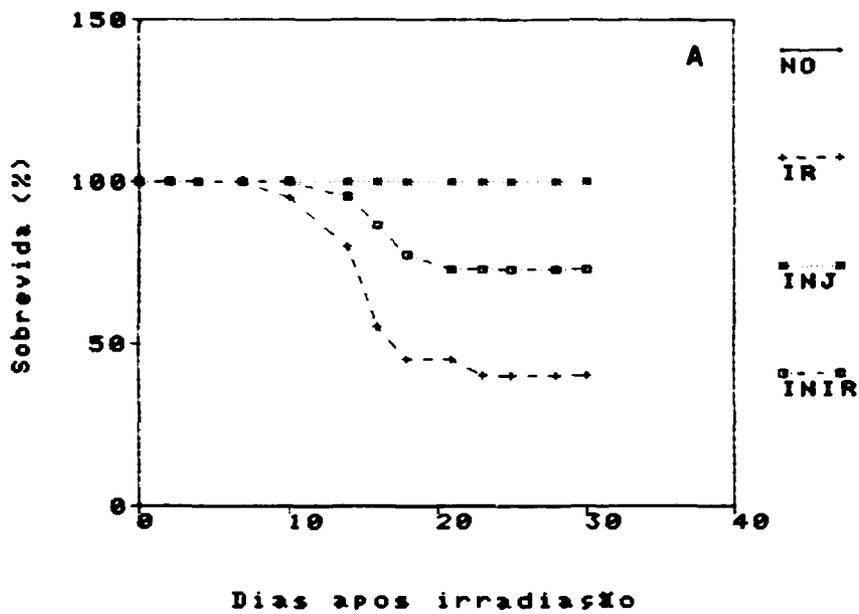


FIGURA 1. Sobrevida de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), tratado com PP(INJ) e tratados + irradiados(INIR). A - Animais do IPEN e B - Animais da EPM.

6

sobrevida, diferindo dos irradiados, que por sua vez diferem dos injetados e irradiados.

3.1.1.2. Peso médio corporal

Analisando-se as curvas de peso, vemos que após a irradiação os animais irradiados injetados, ou não, começam a perder peso e esse declínio se dá aproximadamente até o 14º dia a partir do qual há uma visível recuperação. Por volta do 30º dia praticamente se recupera o peso inicial ou em alguns casos até chega a superá-lo (Figs. 2 A e 2 B).

A diminuição de peso dos animais sempre precede em vários dias ao início de sua mortalidade, e apesar de todos os animais perderem peso, muitos deles sobreviverão.

Verificou-se, estatisticamente, para o peso médio dos animais que as duas linhagens albinas demonstraram ter o mesmo comportamento para os animais irradiados injetados ou não.

3.1.1.3. Células do Peritônio

Macrófagos

- **Efeito da PP** - 3 dias após a injeção ip, de PP, houve um aumento destas células de 39% para 64%, entretanto, 6 e 9 dias após a injeção, o número total de células decaiu e permaneceu quase constante ao redor de 51% (Fig. 3 A).

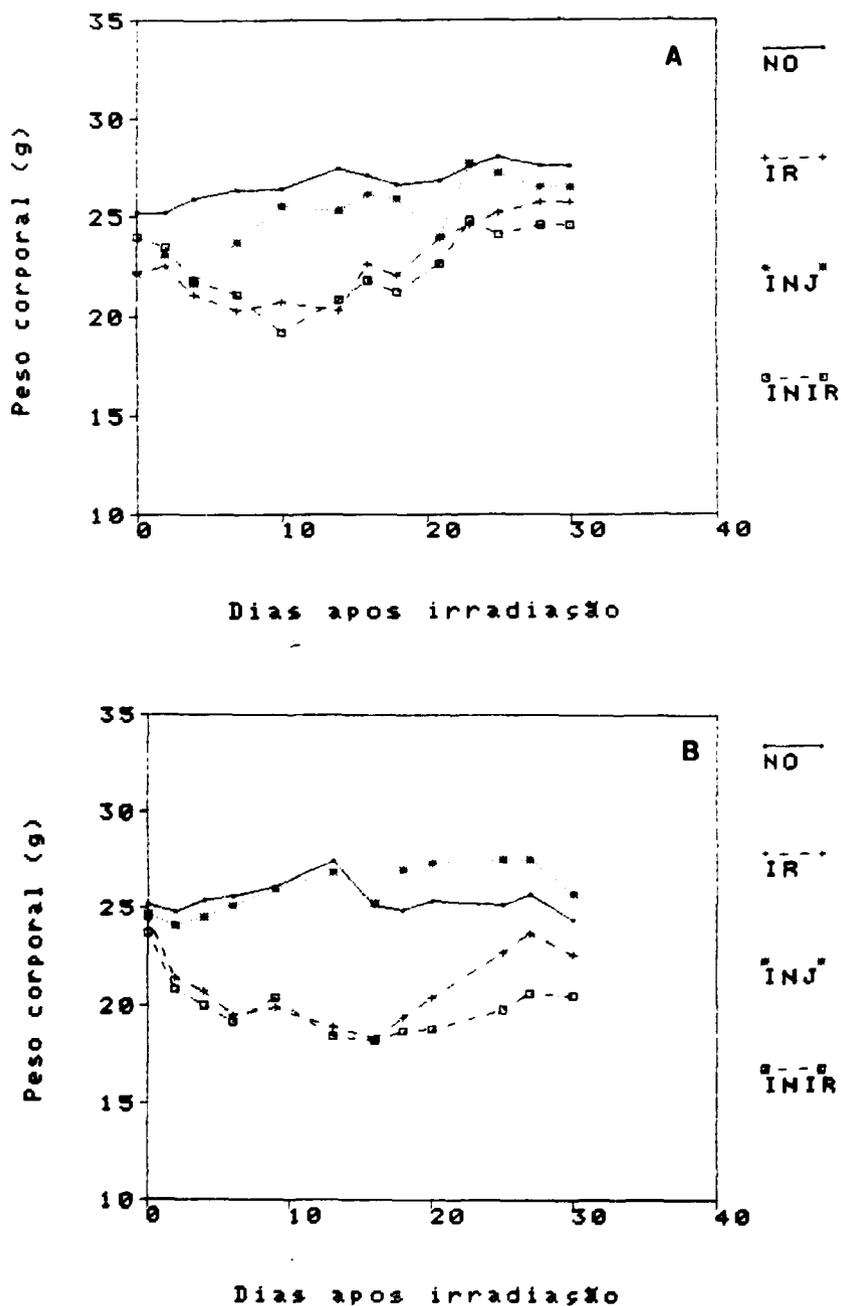


FIGURA 2. Pesos médios dos camundongos em função do tempo após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com PP (INJ) e tratados + irradiados (INIR). A - Animais do IPEN e B - Animais da EPM.

- **Efeito da Radiação** - observou-se que para as células somente irradiadas, 3 e 6 dias após a dose de 9 Gy, houve um aumento de 35% para 73% e 79%, respectivamente (Fig. 3 A).

- **Efeito da PP + irradiação** - após 3 dias de injeção ip, há um aumento, como já observado nas células estimuladas com PP. Três dias após a irradiação, aproximadamente duplicou-se a população peritoneal, embora no 6º dia após irradiação e 9 dias após a injeção, o número total destas células decaiu para valores aproximados ao número de células de animais somente injetados (Fig. 3 A).

=

Mononucleares (MONO)

- **Efeito da PP** - no 3º dia após a injeção, observou-se uma diminuição de 49% para 29% no número total destas células, aumentando no 6º dia após a injeção para 40% e estabilizando-se nesses valores (Fig. 3 B).

- **Efeito da Radiação** - observou-se uma queda de 56% para 17% no 3º dia e 10% no 6º dia após a irradiação (Fig. 3 B).

- **Efeito da PP + irradiação** - o decréscimo das células é visível no 3º e no 6º dia de injeção, tendo sua queda máxima no 3º dia após a irradiação, tendendo posteriormente a recuperar o valor inicial (Fig. 3 B).

Polimorfonucleares (PMN)

- **Efeito da PP** - embora seja baixo o número de células deste tipo, há uma queda no número total delas, que fica mais evidenciada no 6º dia da injeção, tendendo a uma recuperação posterior (**Fig. 3 C**).

- **Efeito da Radiação** - observou-se um comportamento semelhante ao das células provenientes de animais injetados (**Fig. 3 C**).

- **Efeito da PP + irradiação** - também neste grupo, observou-se uma diminuição no 6º dia da injeção e no 3º da irradiação, com uma leve tendência de aumento posterior (**Fig. 3 C**).

Mastócitos (MAST)

- **Efeito da PP** - não houve mudanças significativas nesta população celular; observou-se uma queda aparente no nº total destas células 3 dias após a injeção; há um leve aumento no 6º dia e nova queda aparente no 9º dia da injeção (**Fig. 3 D**).

- **Efeito da irradiação** - é semelhante o comportamento ao das células provenientes de animais injetados (**Fig. 3 D**).

- **Efeito conjunto PP + irradiação** - observou-se, um comportamento semelhante ao anterior, diferindo apenas no

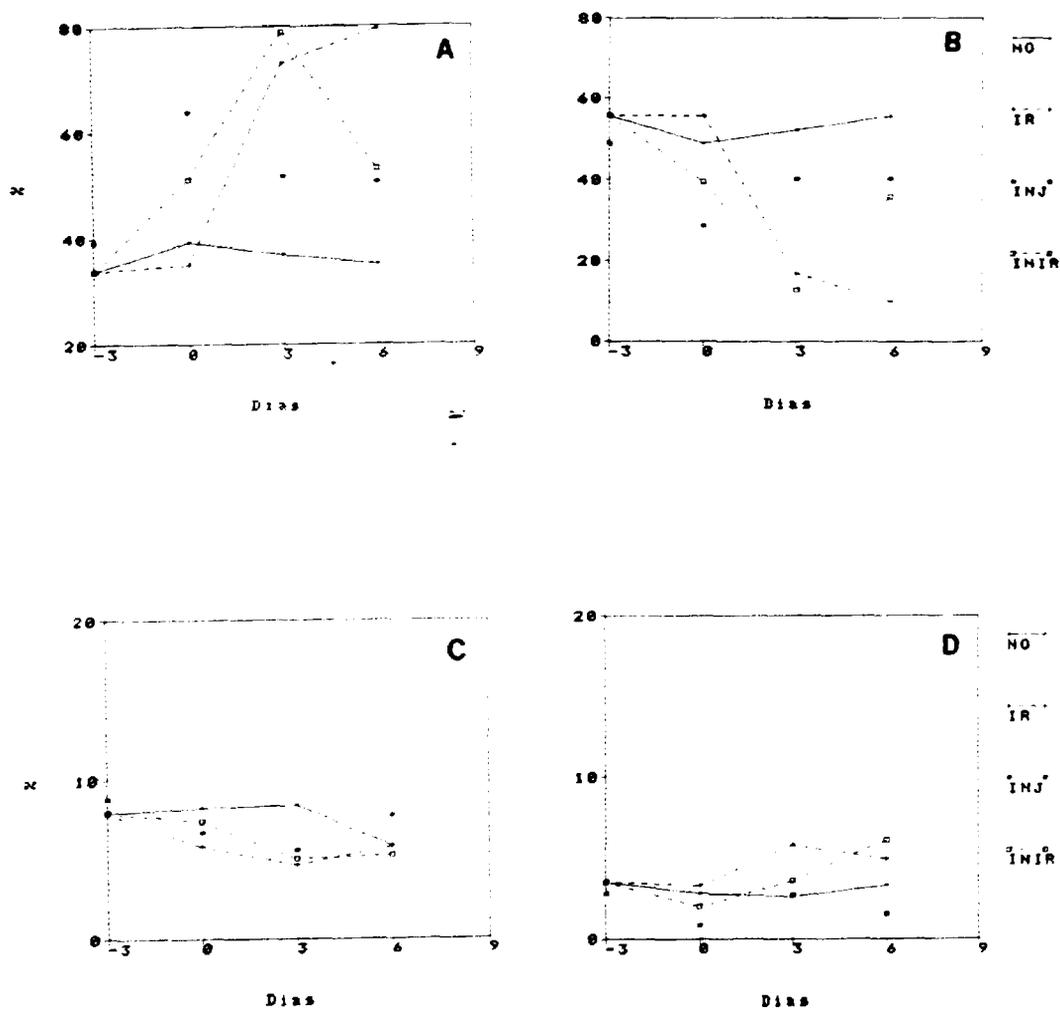


FIGURA 3. Percentual de células peritoneais em função do tempo após irradiação com 9,0 Gy de ^{60}Co , controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com PP (INJ), tratados + irradiados (INIR). **A** - Macrófagos; **B** - Mononucleares; **C** - Polimorfonucleares; **D** - Mastócitos.

9º dia após a injeção (e 6º da irradiação) onde há um aumento aparente destas células (Fig. 3 D).

3.1.2. Linhagens sensíveis à radiação: C57BL/6 e C57BL/10

3.1.2.1. Taxas de sobrevivência

Os camundongos machos da linhagem C57BL/6, demonstraram ser mais sensíveis à irradiação pois tanto os tratados como os não tratados que foram submetidos à irradiação com a dose anterior, não sobreviveram 16 dias após a irradiação (Fig. 4 A).

3.1.2.2. Peso médio corporal

A análise da curva de peso deste experimento mostra perda de peso constante a partir do 3º dia, não havendo recuperação posterior (Fig. 4 B).

Embora o experimento termine antes dos 30 dias propostos, os dados analisados estatisticamente demonstraram que tanto para o peso médio como a taxa de sobrevivência os irradiados tratados ou não com PP apresentam a mesma radiosensibilidade diferindo apenas dos controles não irradiados.

3.1.2.3. Células do Peritônio

Macrófagos

- Efeito da PP - para as 2 linhagens, no 3º dia

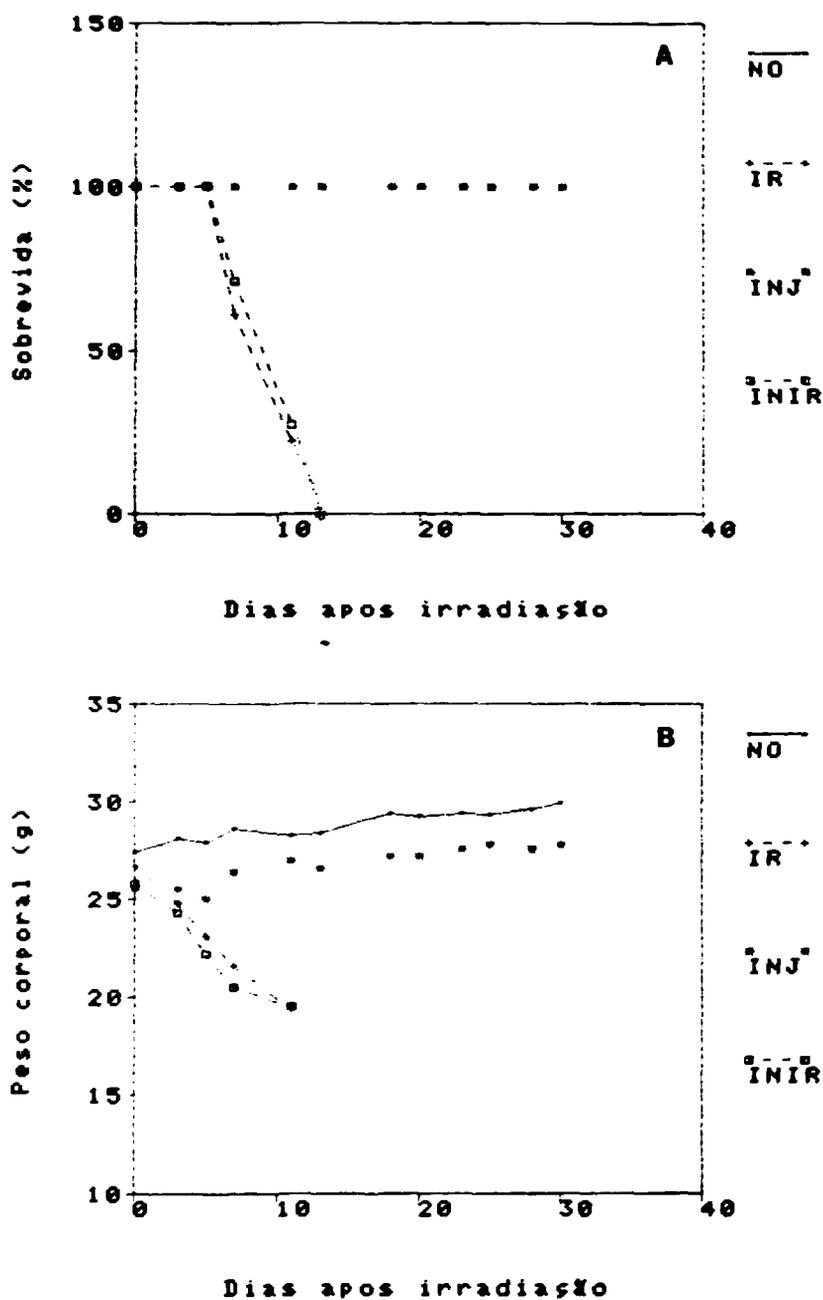


FIGURA 4. Representações gráficas da sobrevivência e variação de peso de camundongos da linhagem C57BL/6. Com controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com PP (INJ) e tratados + irradiados (INIR). A - Porcentagem de sobrevivência em função do tempo, após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . e B - Pesos médios em função do tempo após irradiação.

da injeção nota-se um aumento destas células, de 37% para 47% nos C57BL/6 e de 27% para 44% para C57BL/10, com um decréscimo nos dias subsequentes, (Figs. 5 A e 6 A).

- **Efeito da Radiação** - para a linhagem C57BL/6 há uma resposta maior destas células, aumentando de 28% para 68% no 3º dia e 80% no 6º dia. Para os C57BL/10, há um aumento de 28% para 45% no 3º dia e 54% no 6º dia (Figs. 5 A e 6 A).

- **Efeito da PP + Radiação** - ambas as linhagens demonstraram um aumento significativo, porém não aditivo quando submetidas à ação conjunta, apresentando os C57BL/6 no 3º dia da injeção um aumento de 37% para 47% e 3 dias após irradiação (e 6 da injeção) subindo para 74% e mantendo-se nesse patamar 74%. Para os C57BL/10, no 3º dia após injeção, houve um aumento de 28% para 50% e aos de 6 dias da injeção (e 3 da irradiação) esse valor subiu para 57%, com leve declínio posterior 63% (Figs. 5 A e 6 A).

Mononucleares (MONO)

- **Efeito da PP** - para ambas as linhagens há uma queda no 3º dia após a injeção, de 50% para 41% nos C57BL/6 e de 65% para 38% nos C57BL/10. No 6º dia após a injeção há uma recuperação nos valores percentuais destas células, mantendo-se esta tendência para ambas as linhagens (Figs. 5 B e 6 B).

- **Efeito da Radiação** - no 3º dia após a irradiação, há uma queda brusca destas células para ambas as linhagens de

50% para 27% nos C57BL/6 e de 65% para 38% nos C57BL/10. No 6º dia da irradiação, ainda permanece esse declínio para ambas as linhagens (Figs. 5 B e 6 B).

- Efeito da PP + Radiação - para ambas as linhagens, há um decréscimo gradativo destas células até o 3º dia após a irradiação permanecendo quase constante posteriormente (Figs. 5 B e 6 B).

Polimorfonucleares (PMN)

- Efeito da PP - para ambas as linhagens há um pico de PMN bem acentuado no 3º dia da injeção, sendo mais expressivo na linhagem C57BL/10. No 6º dia da injeção os valores tendem a normalizar-se para ambas as linhagens (Figs. 5 C e 6 C).

- Efeito da Radiação - observou-se uma diferença entre as linhagens deste tipo celular em relação à radiação. Para os C57BL/6, 3 dias após há um decréscimo nos PMN, permanecendo constante até o 6º dia. Já para os C57BL/10, aos 3 dias após irradiação há um aumento aparente, tendendo após aos valores iniciais.

- Efeito PP + Radiação - para ambas as linhagens, no 3º dia após injeção há um aumento das células especialmente na C57BL/6, porém não tão acentuado como no caso do controle de PP (Figs. 5 C e 6 C).

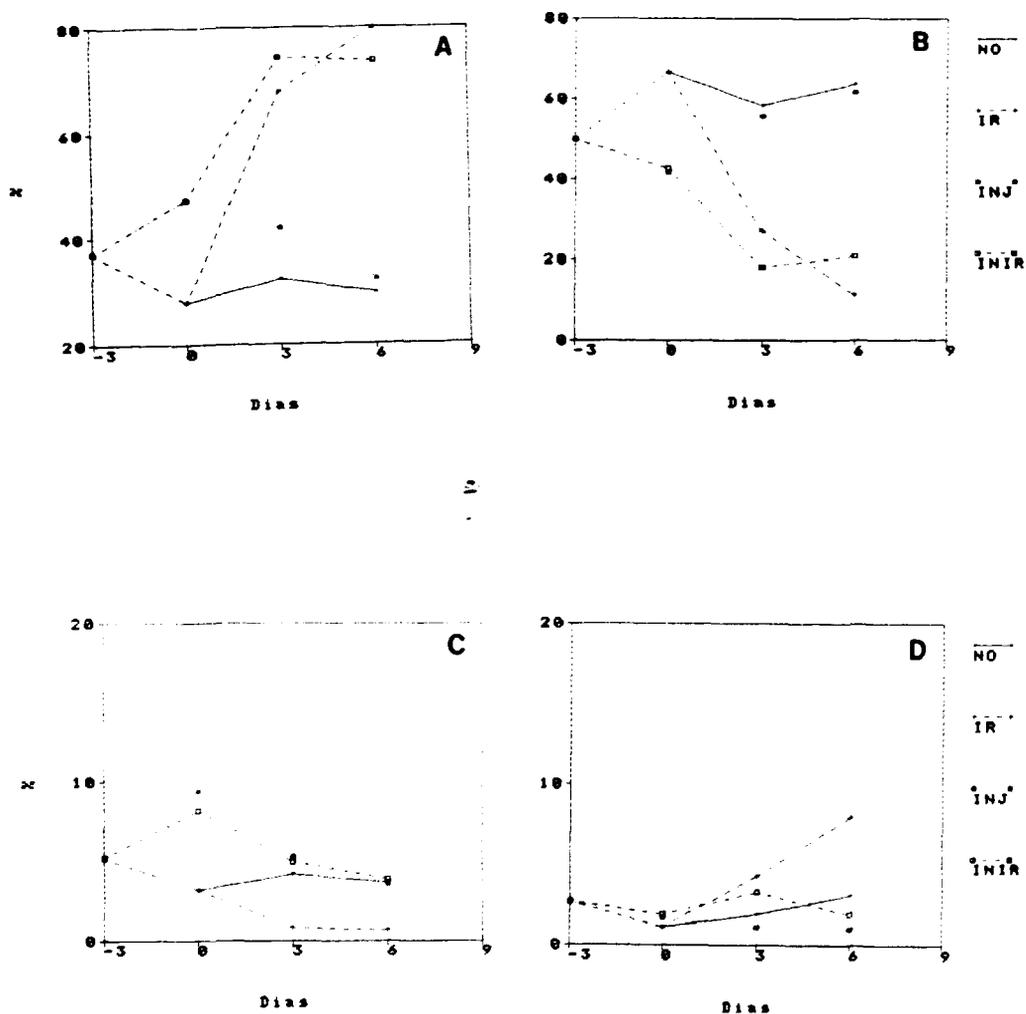


FIGURA 5. Percentual de células peritoneais em função do tempo após irradiação com 9,0 Gy de ^{60}Co . Animais da linhagem C57BL/6. Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com PP(INJ), tratados + irradiados(INIR). A - Macrófagos; B - Mononucleares; C - Polimorfonucleares; D - Mastócitos.

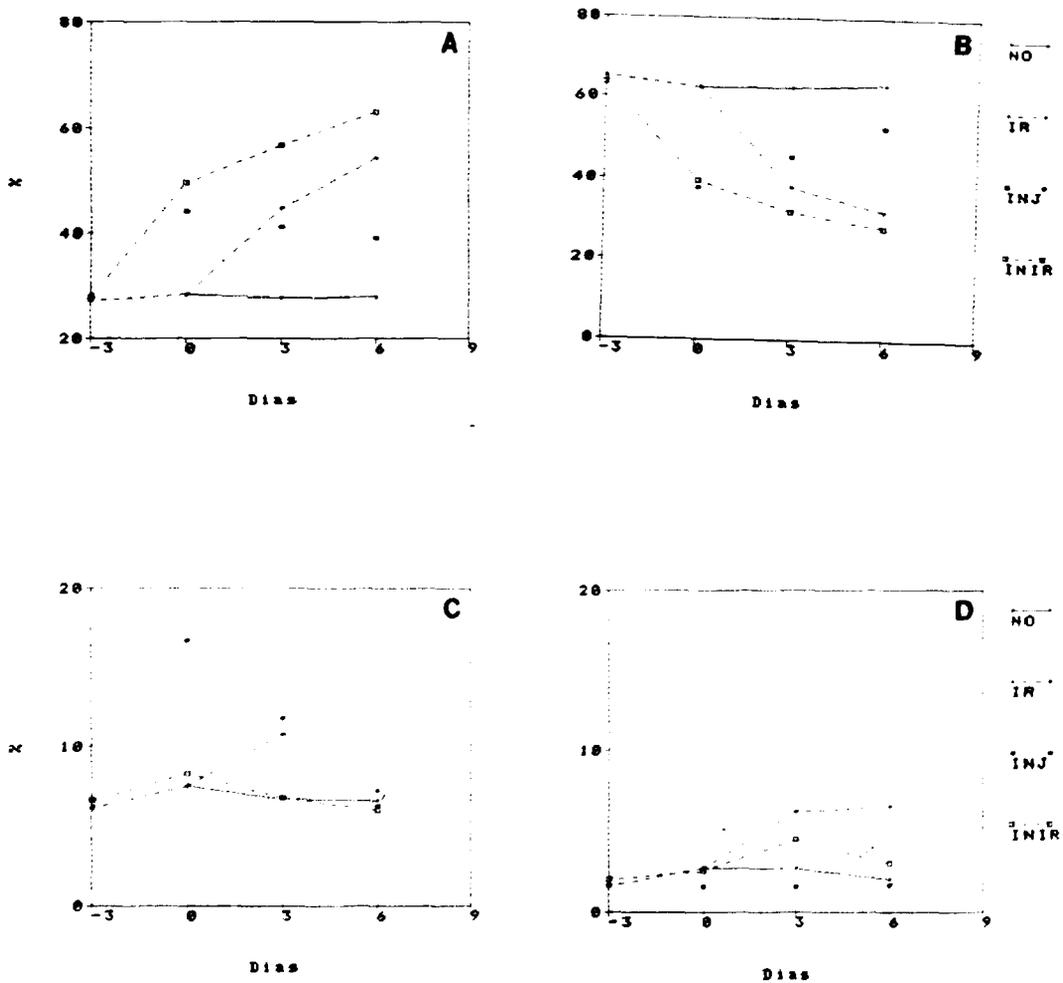


FIGURA 6. Percentual de células peritoneais em função do tempo após irradiação com 9,0 Gy de ^{60}Co . Animais da linhagem C57BL/10. Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com PP(INJ), tratados + irradiados(INIR). A - Macrófagos; B - Mononucleares; C - Polimorfonucleares; D - Mastócitos.

Mastócitos

- **Efeito da PP** - não ocorreram variações significativas para ambas as linhagens (Fig. 5 D).

- **Efeito da Radiação** - para ambas as linhagens observou-se um nítido aumento no percentual destas células a partir do 3º dia após a irradiação (Figs. 5 D e 6 D).

- **Efeito PP + Radiação** - no 3º dia após irradiação (e 6 da injeção), observou-se um aumento destas células para ambas as linhagens, não tão marcante quanto ao efeito da radiação isoladamente (Figs. 5 D e 6 D).

3.2. Influência de derivados de imidazole e irradiação sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e células do peritônio de camundongos de diferentes linhagens.

3.2.1. Linhagens resistentes à radiação. Camundongos albinos do IPEN submetidos a tratamento com Azomycin (AZO)

3.2.1.1. Taxa de sobrevivência

Os resultados em relação à sobrevivência após a irradiação dos animais machos, albinos, do IPEN, tratados com AZO, mostra que há uma proteção de 25% em relação aos só irradiados (65% e 40% respectivamente, Fig. 7 A). Para um segundo grupo de animais albinos também machos e do IPEN, veri

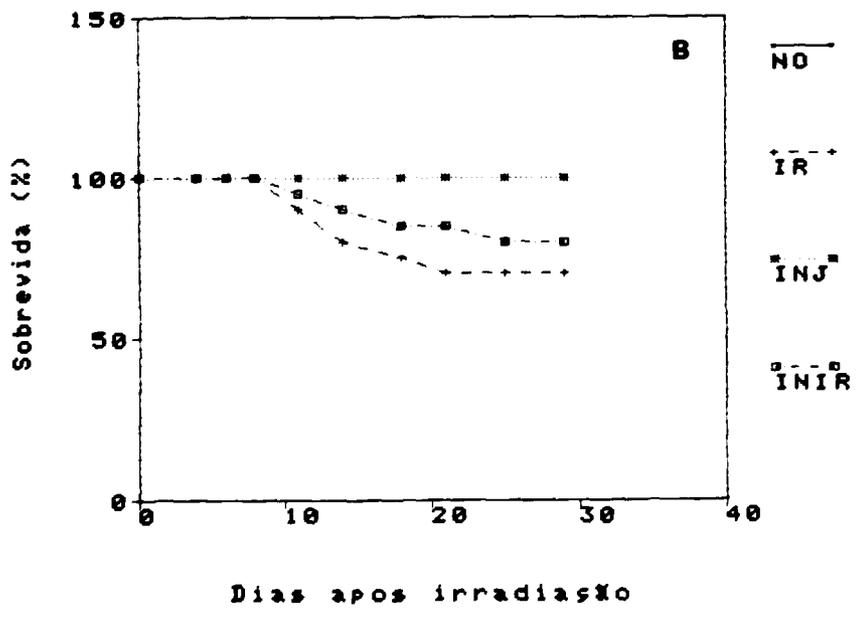
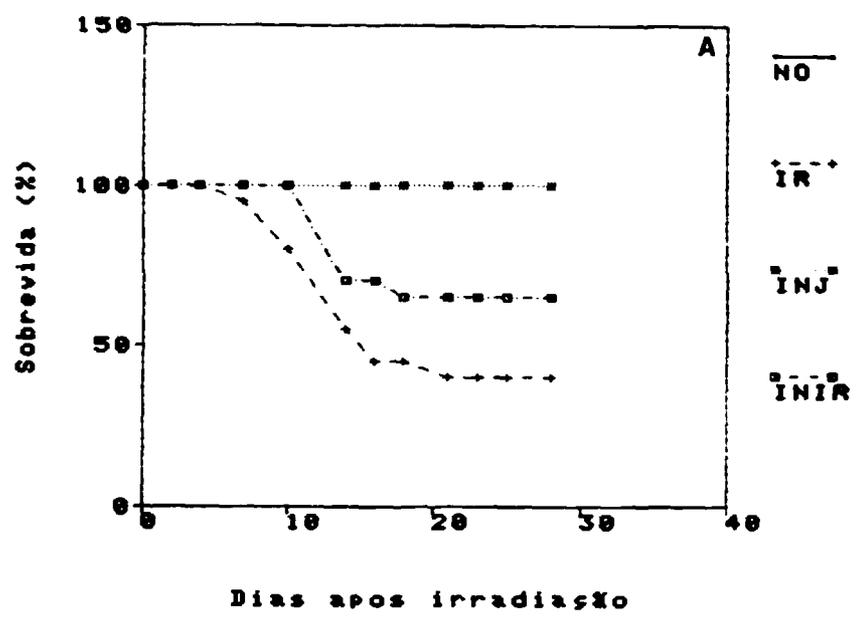


FIGURA 7. Sobrevida de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), Controles tratados com AZO(INJ) e tratados + irradiados(INIR). A - Animais machos do IPEN; B - Animais machos do IPEN.

ficou-se uma pequena proteção de 10% entre a sobrevivência dos tratados e os dos sô irradiados (Fig. 7 B)

Para ambos os experimentos de sobrevivência, os resultados da análise estatística demonstraram ser significativamente diferentes, os grupos dos irradiados tratados ou não.

3.2.1.2. Peso médio corporal

Apesar de ser observada na curva dos pesos médios uma queda maior nos controles injetados e irradiados do que nos sô irradiados, esta queda não influi na sobrevivência dos animais. Ambos os grupos apresentaram uma queda do peso por volta do 39 dia de irradiação, porém por volta do 149 dia houve uma recuperação do peso, semelhante ao que aconteceu aos animais tratados com PP (Fig. 8 A e B).

A análise estatística mostra uma diferença significativa entre os irradiados injetados ou não (Fig. 8 A), porém não deixam de ser significativamente diferentes dos controles injetados ou não. Para o grupo seguinte, (Fig. 8 B), não há diferença significativa entre os grupos irradiados tratados ou não, embora haja diferença dos controles respectivos.

3.2.1.3. Células do Peritônio

Macrófagos (MØ)

- Efeito de AZO - observou-se para este experi-

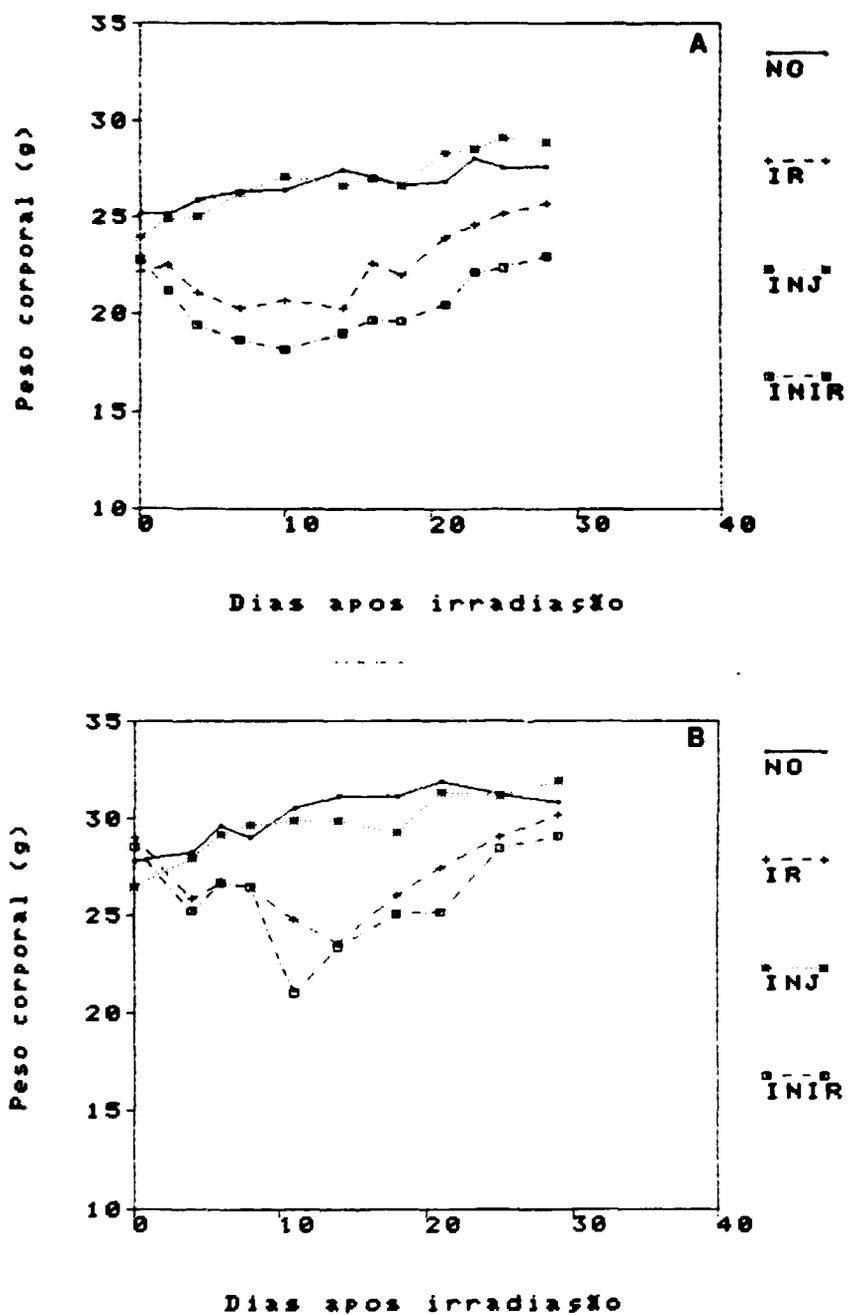


FIGURA 8. Pesos médios dos camundongos em função do tempo após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com AZO(INJ) e tratados + irradiados(INIR). A - e B - Animais machos do IPEN.

mento que nos animais tratados os MØ aumentam de 54% para 62% no 3º dia de injeção e decaem, tendendo à normalidade no 6º dia (Fig. 9 A).

- **Efeito da Radiação** - os animais deste grupo apresentaram no 3º dia da irradiação um número maior de macrófagos (75%) em relação ao início do experimento (54%), continuando, no 6º dia no mesmo nível (Fig. 9 A).

- **Efeito AZO + Radiação** - no 3º dia do experimento observou-se um aumento de 54% para 83% destas células no peritônio e no 6º dia, decaiu levemente (Fig. 9 A). Houve neste caso um estímulo maior que o produzido só pela irradiação.

Mononucleares (MONO)

- **Efeito do AZO** - observaram-se poucas modificações nos níveis destas células após a injeção (Fig. 9 B).

- **Efeito da Radiação** - os Mono no 3º dia da irradiação decaem de 32% para 11% mantendo-se nesses valores no 6º dia (Fig. 9 B).

- **Efeito AZO + Radiação** - novamente observou-se uma queda, de 29% para 10% dos Mono para este grupo de animais (Fig. 9 B). O efeito conjunto mostrou-se semelhante ao efeito da radiação isoladamente.

Polimorfonucleares (PMN)

- Efeito do AZO - 3 dias após a injeção, a contagem relativa dos PMN dos animais tratados cai de 15% para 2% e no 6º dia tende a normalizar-se (Fig. 9 C).

- Efeito da Radiação - observou-se uma queda aparente de 11% para 9% no 3º dia, porém no 6º dia já tendia a uma normalização (Fig. 9 C).

- Efeito AZO + Radiação - novamente observa-se uma queda no 3º dia, de 14% para 5% porém não tão acentuada como no grupo controle injetado, e no 6º dia há uma tendência a normalizar-se (Fig. 9 C).

Mastócitos

- Efeito do AZO - observou-se no 3º dia do experimento, um leve aumento destas células e no 6º dia uma tendência à normalização (Fig. 9 D).

- Efeito da Radiação - no 3º dia após a irradiação foi quando se observou um aumento destas células de 2,5% para 5,4%, tendendo no 6º dia à normalização (Fig. 9 D).

- Efeito do AZO + Radiação - Não se observa diferenças nestas células, no 3º dia ou posteriormente (Fig. 9 D).

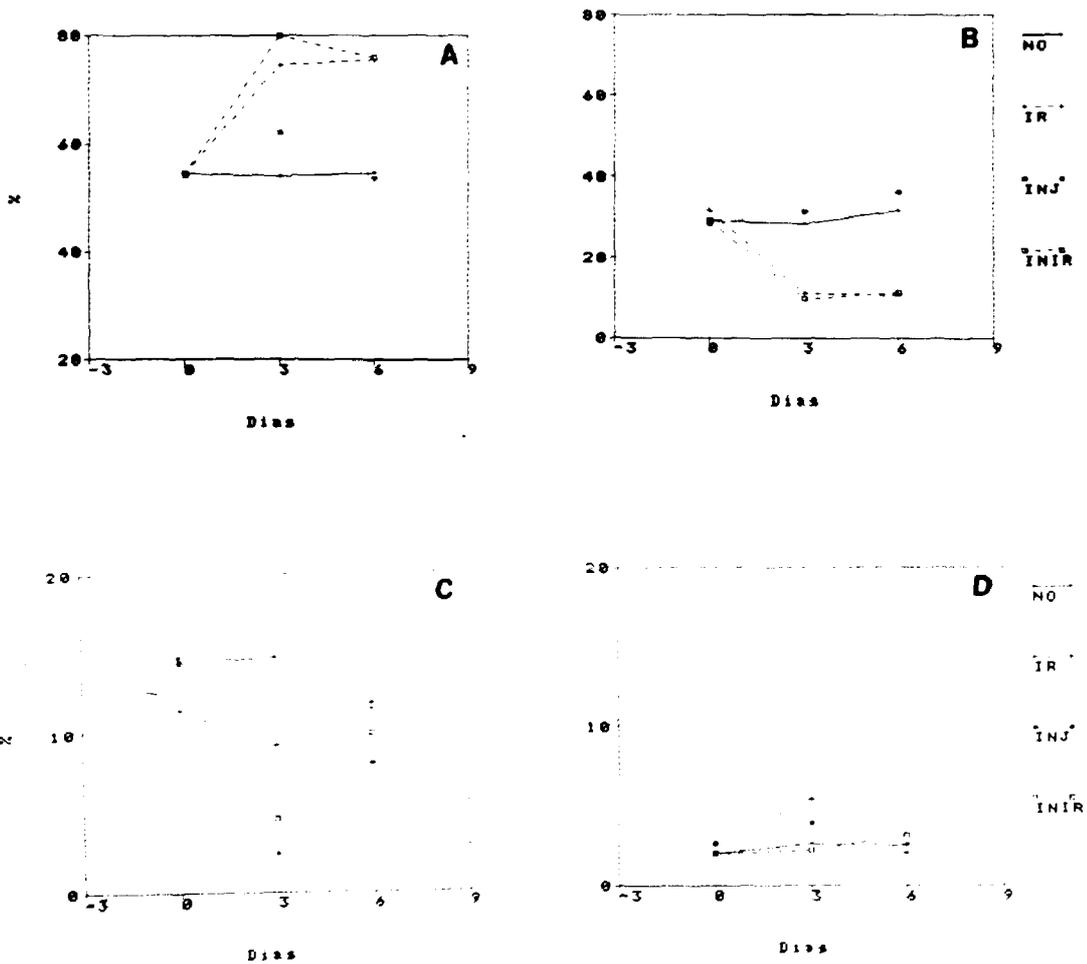


FIGURA 9. Percentual de células peritoneais em função do tempo após irradiação com 9,0 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com AZO(INJ) e tratados + irradiados(INIR). A - Macrófagos; B - Mononucleares; C - Polimorfonucleares; D - Mastócitos.

3.2.2. Linhagem sensível à radiação. Camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com Azomycin (AZO).

3.2.2.1. Taxa de sobrevivência

Também os machos C57BL/6, para a mesma dose de 9 Gy que receberam os animais resistentes, demonstraram ser mais sensíveis aos efeitos da radiação, não sobrevivendo após o 16º dia da irradiação (Fig. 10 A).

3.2.2.2. Peso médio corporal

Observou-se para esta linhagem, um decréscimo do peso dos animais irradiados tratados ou não, até o 16º dia do experimento (Fig. 10 B).

3.2.3. Linhagens resistentes à radiação. Camundongos albinos do IPEN submetidos a tratamento com Levamisole (Lev)

3.2.3.1. Taxa de sobrevivência

Neste experimento utilizamos camundongos fêmeas albinas, provenientes do biotério do IPEN. Os resultados obtidos em relação à sobrevivência dos animais albinos tratados mostram que há uma sensibilização destes frente à irradiação, evidenciada pelo percentual de sobrevivência de 30% e 50%, respectivamente, em relação aos só irradiados correspondentes que foram de 50% e 80% nestes casos (Fig. 11 A e B).

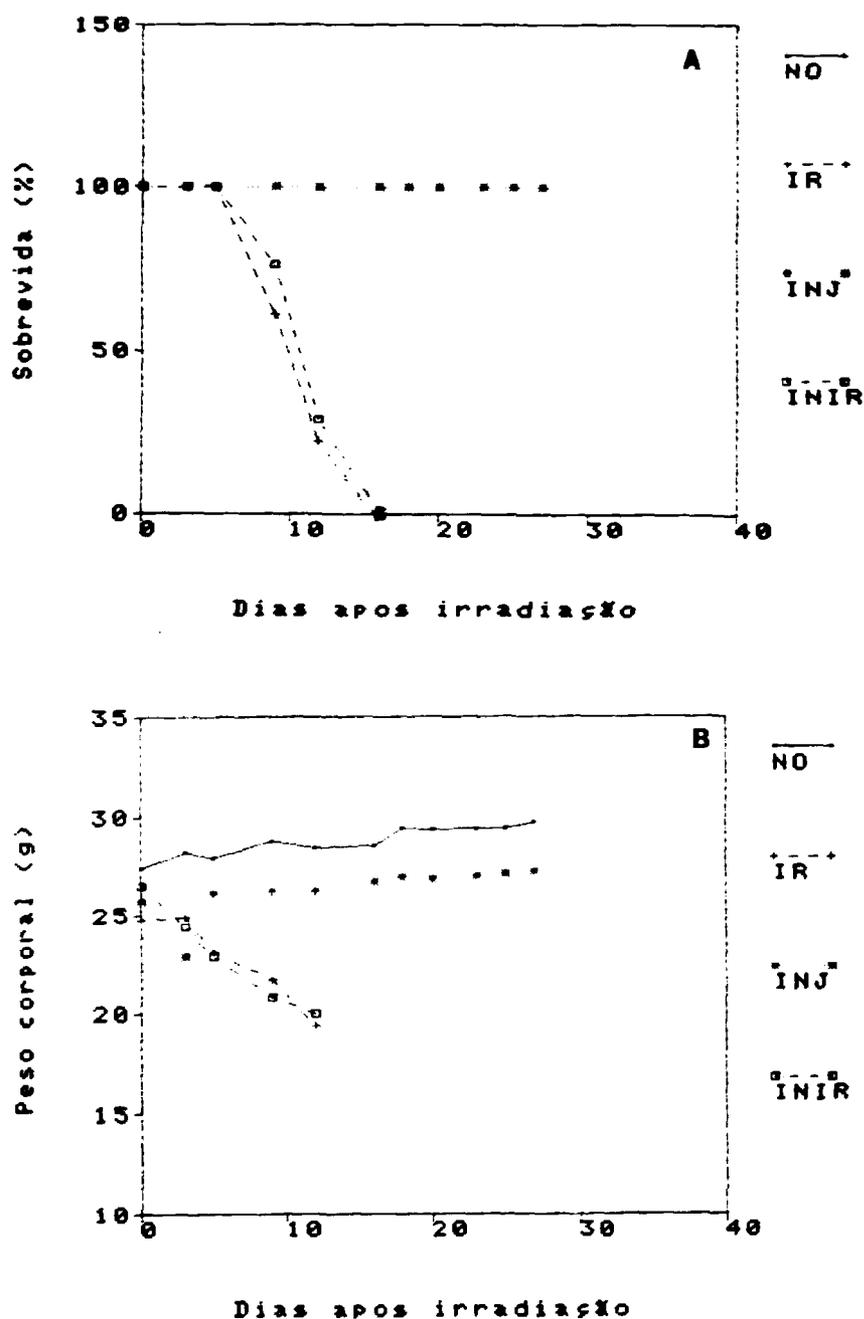


FIGURA 10. Representações gráficas da sobrevivência e variação de peso de camundongos machos da linhagem C57BL/6. Controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com AZO (INJ) e tratados e irradiados (INIR). **A** - Porcentagem de sobrevivência em função do tempo, após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co ; **B** - Peso médio em função do tempo após irradiação.

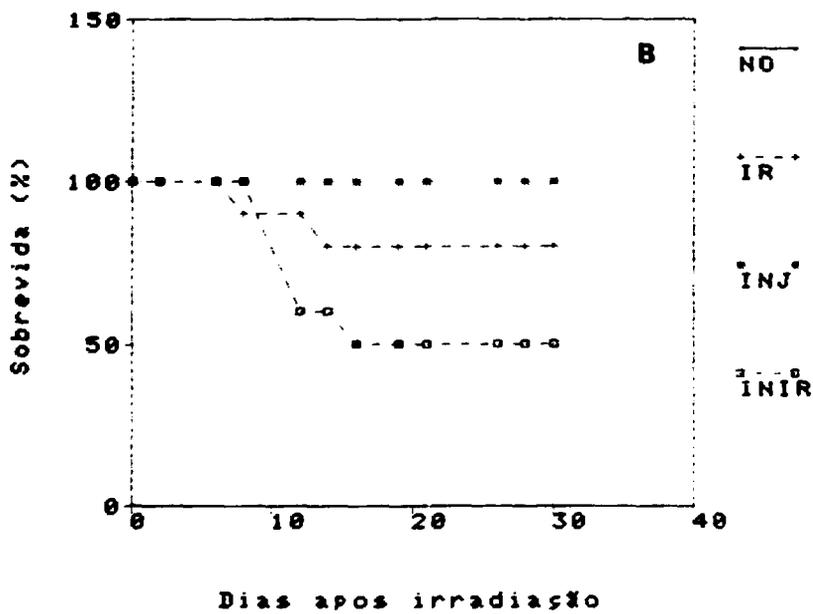
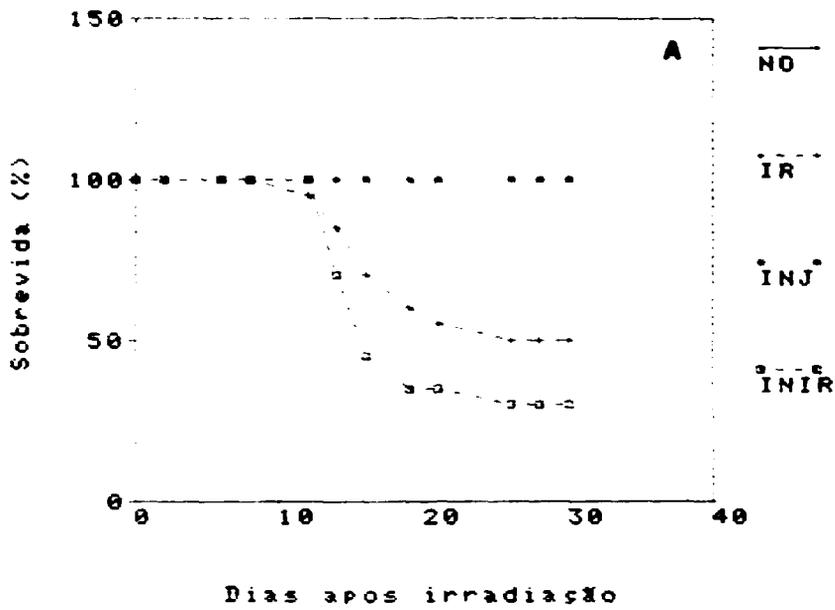


FIGURA 11. Sobrevida de camundongos irradiados com 8Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados (IR), tratados com LEV(INJ) e tratados e irradiados (INIR). A - e B - Fêmeas albinas.

3.2.3.2. Peso médio corporal

Analisando as curvas de peso, notamos grande variação no decorrer do experimento, porém, por volta do 16º dia inicia-se uma recuperação gradativa do peso dos animais (Fig. 12 A e B).

Os resultados estatísticos tanto para a taxa de sobrevivência como para o peso médio, mostram que há diferença significativa entre os grupos irradiados tratados ou não dos controles tratados ou não.

3.2.3.3. Células do Peritônio

Macrófagos

- **Efeito do Lev** - para os animais tratados observou-se no 3º dia um ligeiro aumento de 49% para 56% e que no 6º dia tendeu a se manter (Fig. 13 A).

- **Efeito da Radiação** - observou-se um aumento de 55% para 66% no 3º dia e no 6º dia se mantinha com 69% em relação ao dia inicial do experimento (Fig. 13 A).

- **Efeito Lev + Radiação** - observou-se neste grupo resultado semelhante aos irradiados. No 3º dia houve um aumento de MØ de 54% para 69% que se manteve no 6º dia (67%) (Fig. 13 A).

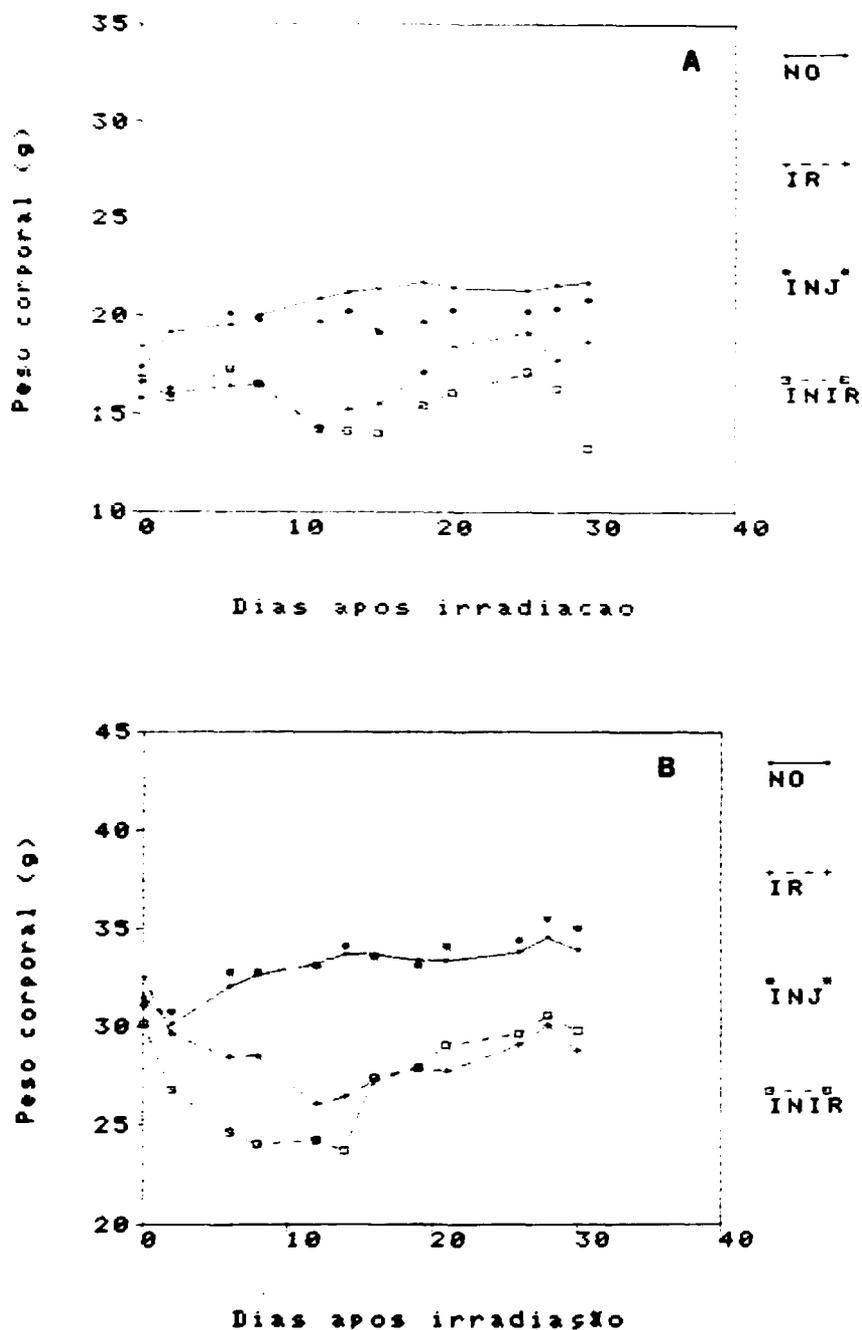


FIGURA 12. Pesos médios dos camundongos albinos em função do tempo após irradiação com 8 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com LEV(INJ) e tratados + irradiados(INIR). A - e B - Fêmeas albinas.

Mononucleares (MONO)

- **Efeito do Lev** - Não houve mudanças significativas na contagem. No 3º dia da injeção, observou-se uma leve queda destas células que permaneceram quase estáveis (Fig. 13 B).

- **Efeito da Radiação** - observou-se uma queda de 36% para 20% no 3º dia. No 6º dia da irradiação esta queda acentuou-se (Fig. 13 B).

- **Efeito do Lev + Radiação** - é semelhante ao resultado observado com os efeitos da radiação sobre estas células (Fig. 13 B).

Polimorfonucleares (POLI)

- **Efeito do Lev** - observou-se um leve aumento no 3º dia após a injeção e uma diminuição destas células no 6º dia após a injeção de Lev (Fig. 13 C).

- **Efeito da Radiação** - observou-se um aumento significativo destas células do 2º ao 6º dia após a irradiação (Fig. 13 C).

- **Efeito do Lev + Radiação** - observou-se uma semelhança no gráfico de comportamento destas células com o das somente irradiadas (Fig. 13 C).

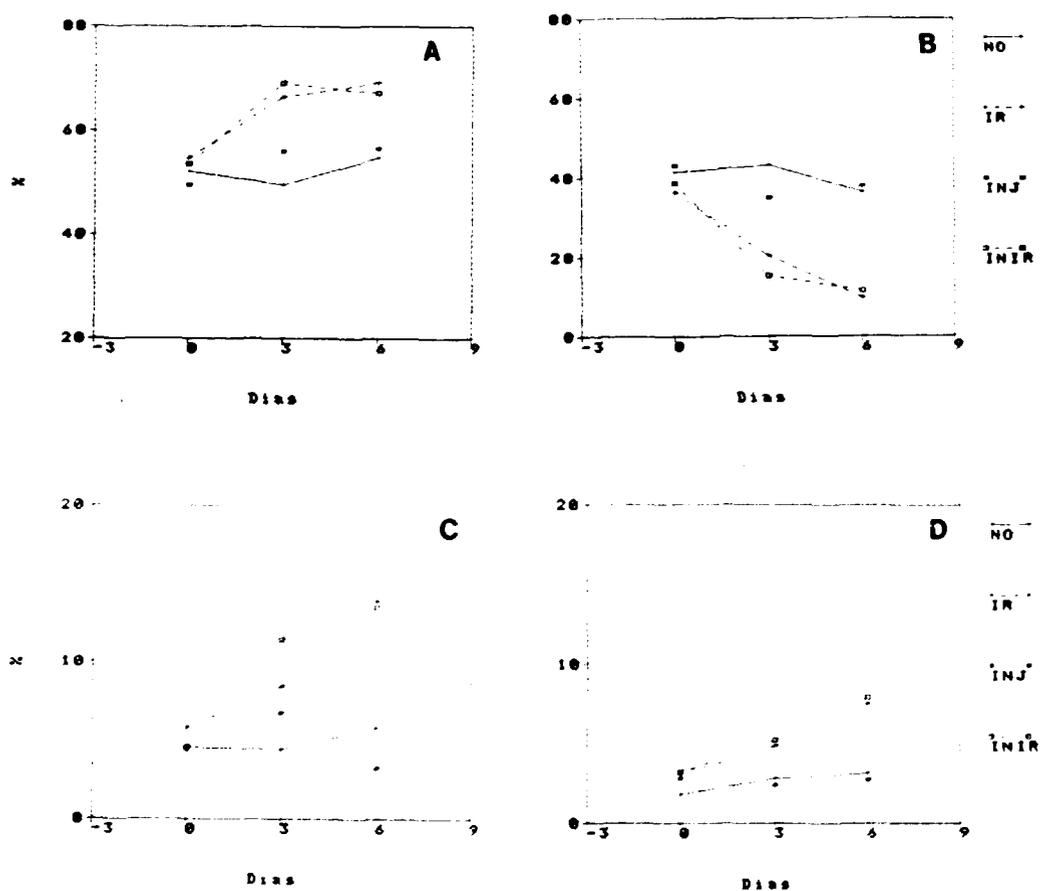


FIGURA 13. Percentual de células peritoneais em função do tempo após irradiação com 9,0 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com LEV (INJ) e tratados + irradiados (INIR). A - Macrófagos; B - Mononucleares; C - Polimorfonucleares; D - Mastócitos.

Mastócitos

- **Efeito do Lev** - não ocorreram variações marcantes destas células (Fig. 13 D).

- **Efeito da Radiação** - Houve um aumento destas células em função do tempo após a irradiação (Fig. 13 D).

- **Efeito do Lev + Radiação** - o resultado observado foi semelhante ao do grupo submetido somente à radiação (Fig. 13 D).

3.2.4. Linhagem sensível à radiação. Camundongos C57BL/6 submetidos a tratamento com Levamisole (Lev).

3.2.4.1. Taxa de sobrevivência

As fêmeas C57BL/6, da mesma maneira que os machos em experimentos anteriores, demonstraram ser mais sensíveis à radiação de 8 Gy onde não há sobreviventes após 18 e 21 dias para os tratados e não tratados, respectivamente (Fig. 14 A e B).

Estatisticamente, para o grupo de fêmeas C57BL/6, não há diferença significativa entre os controles tratados ou não e não há diferença entre os irradiados tratados ou não.

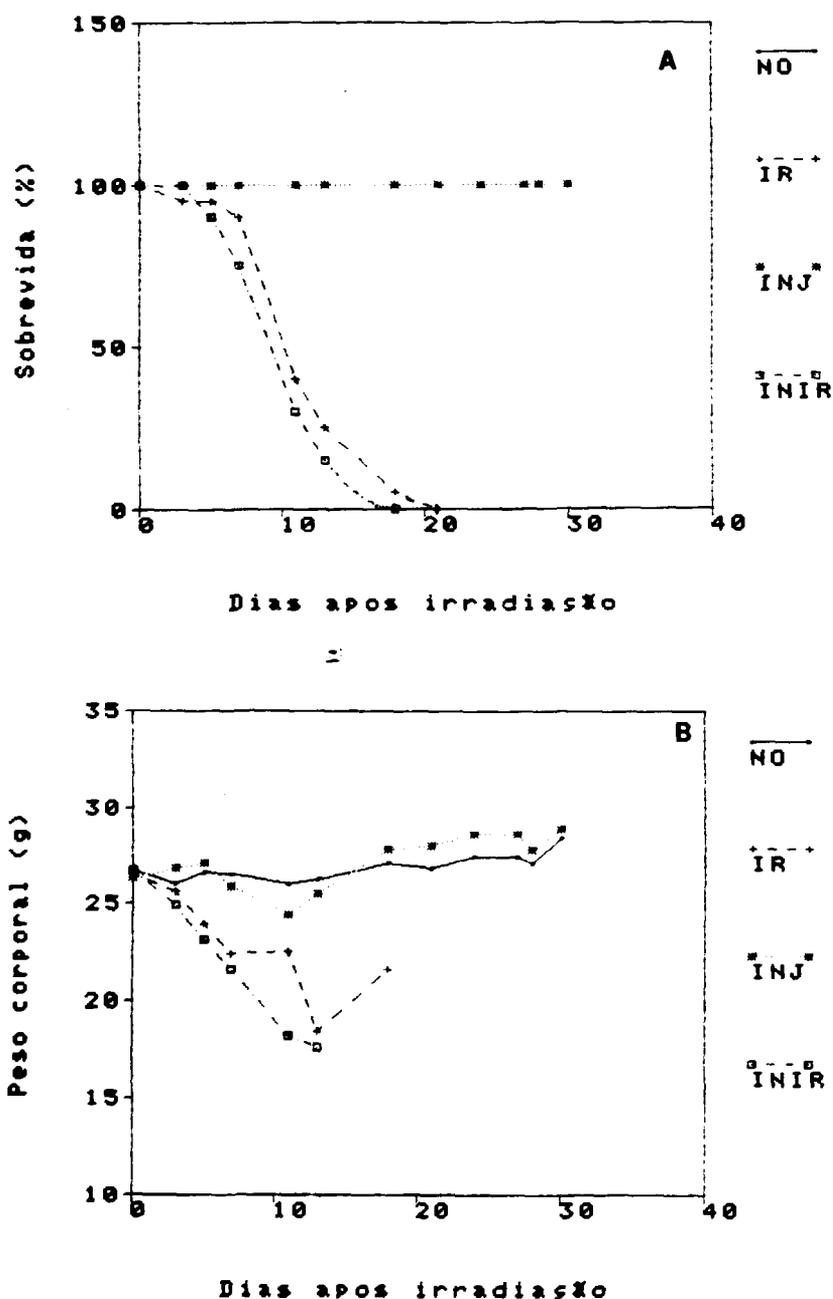


FIGURA 14. Representações gráficas da sobrevivência e variação de peso de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6. Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com LEV(INJ) e tratados + irradiados (INIR). A - Porcentagem de sobrevivência em função do tempo, após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co .; B- Pesos médios em função do tempo, após irradiação.

3.3. Influência do tratamento conjunto PP + AZO e irradiação sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e células do peritônio de camundongos de diferentes linhagens.

3.3.1. Linhagem resistente à radiação. Camundongos albinos submetidos a tratamentos com PP + AZO.

3.3.1.1. Taxa de sobrevivência

Os resultados obtidos, utilizando-se camundongos fêmeas e machos albinos, do IPEN e EPM, em nossas condições, mostrar uma proteção significativa pela combinação de PP e AZO. Os animais tratados e sob o efeito da radiação manifestaram um percentual de sobrevivência de 72% contra 40% nos somente irradiados (Fig. 15 A). Ocorreu também um incremento na sobrevivência para os experimentos com animais da EPM (Fig. 15 B) e novamente com animais do IPEN um percentual menor (17%), porém significativo (Fig. 15 C).

Estatisticamente, quanto à sobrevivência, os irradiados tratados ou não, são em média diferentes entre si e significativamente diferentes dos controles tratados ou não.

3.3.1.2. Peso médio corporal

Observando-se a curva de peso após a irradiação, há um decréscimo inicial nos tratados como nos só irradiados, porém, com recuperação posterior, tornando-se ambas as curvas seme-

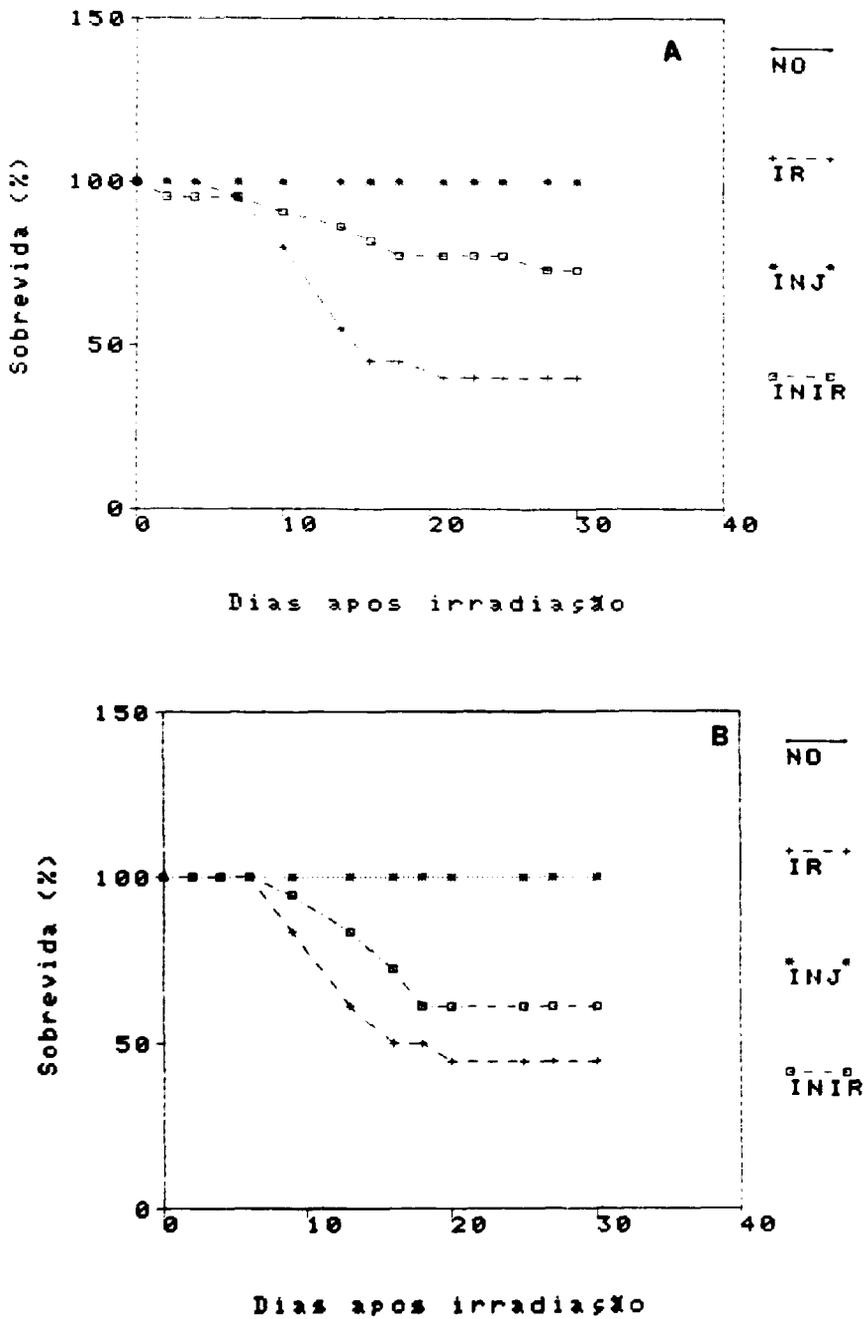


FIGURA 15. Sobrevida de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados (IR), tratados com PP + AZO(INJ) e tratados + irradiados(INIR). **A** - Animais machos do IPEN; **B** - Animais machos da EPM.

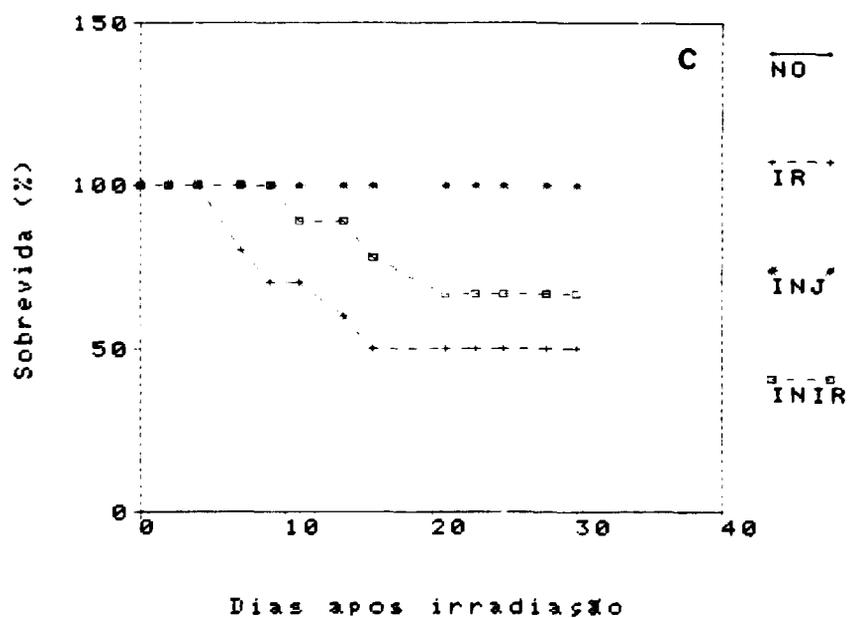


FIGURA 15. Sobrevida de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com PP + AZO(INJ) e tratados e irradiados(INIR). C - Animais machos do IPEN.

lhantes para os três experimentos considerados (Figs. 16 A, B e C).

Estatisticamente, para o peso médio, não há diferença significativa entre os irradiados tratados ou não, embora haja diferença significativa entre estes e os controles tratados ou não.

3.3.1.3. Células do peritônio

Macrófagos (MØ)

- Efeito da ação conjunta PP + AZO - 3 dias após o tratamento com PP, estas células aumentaram de 41% para 57%, o AZO foi aplicado neste dia e no 6º dia após o AZO (e 9 com PP) observou-se um aumento que atingiu 65% (Fig. 17 A).

- Efeito da Radiação - no 3º dia após a irradiação os MØ aumentam, neste caso atingiram de 41% para 80% e no 6º dia da irradiação decaíram para 74% (Fig. 17 A).

- Efeito PP + AZO + Radiação - observou-se que a ação conjunta dos efeitos nestas células resultou num aumento gradativo dos MØ até o 6º após irradiação de 41% para 79% (Fig. 17 A).

Mononucleares (MONO)

- Efeito do PP + AZO - observou-se um decréscimo

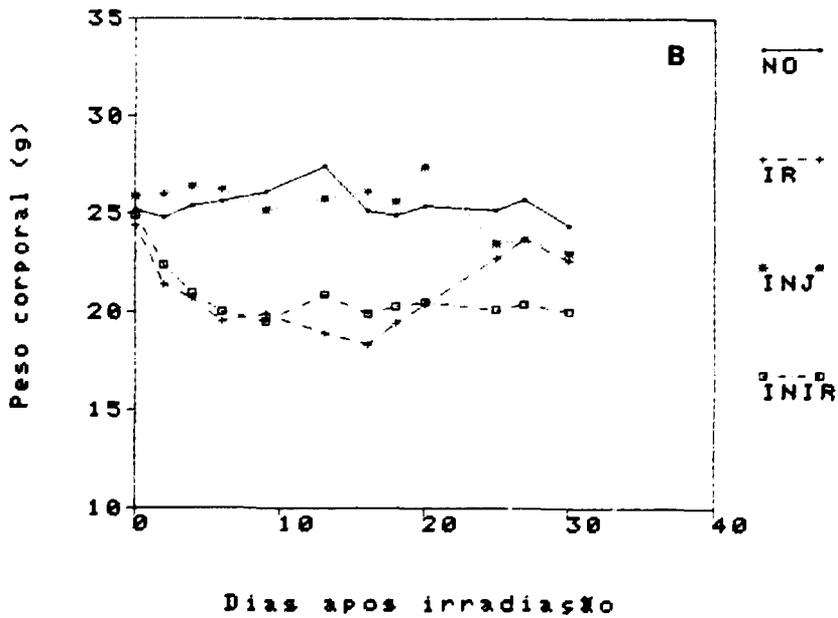
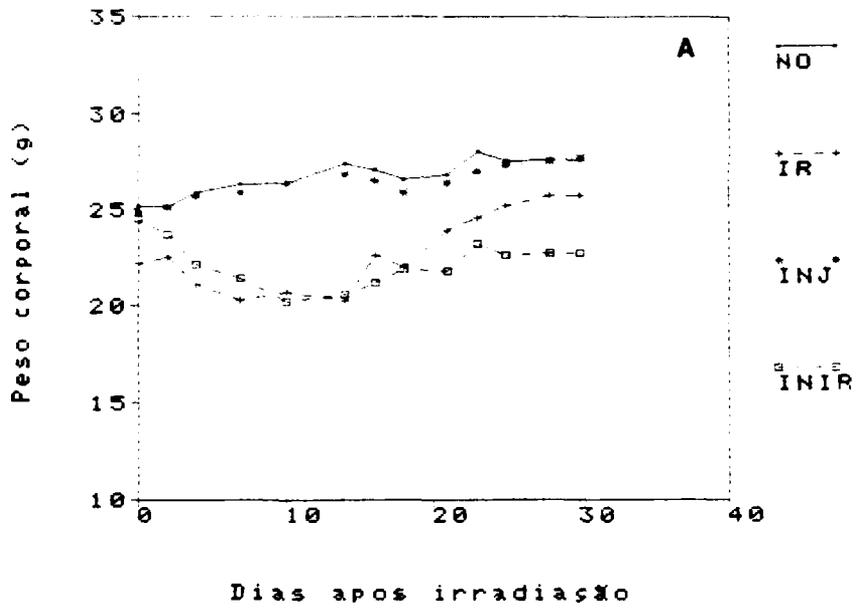


FIGURA 16. Pesos médios dos camundongos em função do tempo após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com PP + AZO (INJ) e tratados + irradiados (INIR). A - Animais machos do IPEN; B - Animais machos da EPM

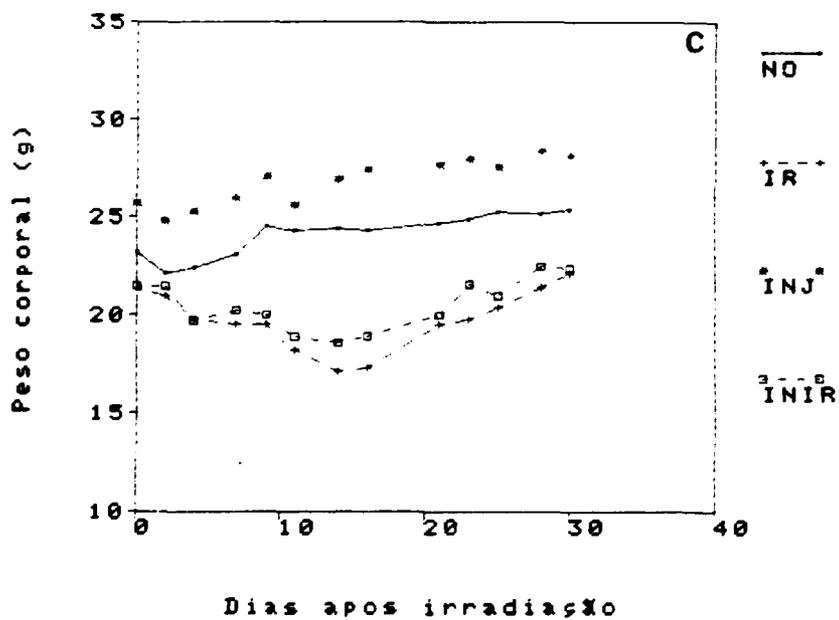


FIGURA 16. Pesos médios dos camundongos em função do tempo após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com PP + AZO(INJ) e tratados + irradiados(INIR). C - Animais machos do IPEN.

das células, chegando no 6º dia com a metade aproximadamente (23%) do número inicial, 49% (Fig. 17 B).

- **Efeito da Radiação** - observou-se no 3º dia após a irradiação uma queda de 47% para 12% e no 6º dia uma leve tendência à recuperação (Fig. 17 B).

- **Efeito PP + AZO + Radiação** - observou-se um de crêscimo quase linear destas células até o 6º dia após a irradiação (Fig. 17 B).

Polimorfonucleares (PMN)

- **Efeito da PP + AZO** - no 3º dia da injeção de PP e 4 horas após AZO, observou-se que há uma queda nestas células e em seguida, 3 e 6 dias após a irradiação, um aumento que atingiu 11% (Fig. 17 C).

- **Efeito da Radiação** - não se observaram variações marcantes neste grupo celular (Fig. 17 C).

- **Efeito da PP + AZO + Radiação** - no 3º dia da injeção de PP e 4 horas após o AZO e 3 horas da irradiação, observou-se um aumento das células que inicialmente eram de 7% para 13%. Aos 3 e 6 dias após a irradiação, estas células decaem, atingindo 5% do total (Fig. 17 C).

Mastócitos

- **Efeito da PP + AZO** - não se observaram mudanças destas células até o fim do experimento (Fig. 17 D).

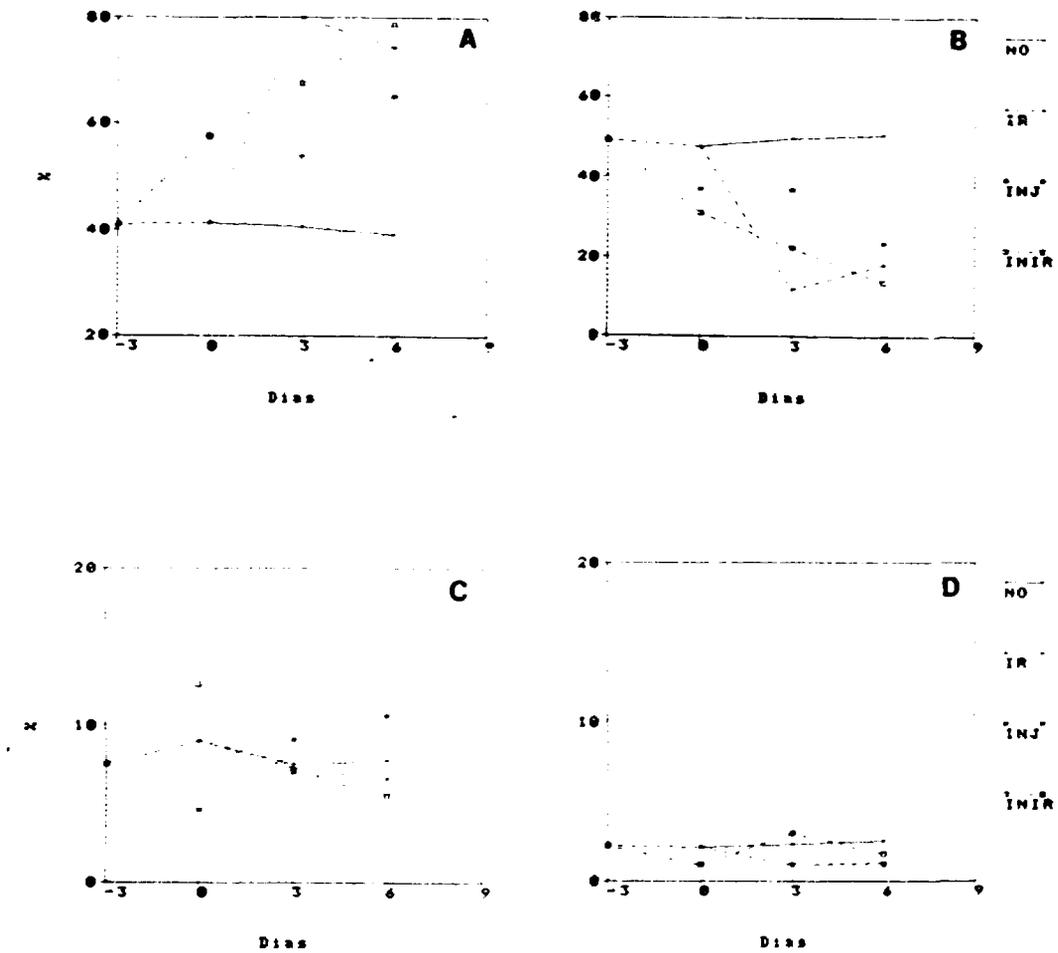


FIGURA 17. Percentual de células peritoneais em função do tempo após irradiação com 9,0 Gy de ^{60}Co . Controles normais(NO), irradiados(IR), tratados com PP + AZO(INJ) e tratados + irradiados(INIR) A - Macrófagos; B - Mononucleares; C - Polimorfonucleares; D - Mastócitos.

- Efeito da Radiação - é semelhante ao dos injetados durante os 6 dias do experimento (Fig. 17 D).

- Efeito da PP + AZO + Radiação - observou-se um aparente incremento no 3º dia após a irradiação, tendendo a voltar ao valor inicial no 6º dia após a irradiação (Fig. 17 D).

3.4. Influência de cisteína (CIS) e irradiação sobre as taxas de sobrevivência, curvas de peso e células do peritônio de camundongos.

3.4.1. Linhagem resistente à radiação

3.4.1.1. Taxa de sobrevivência

Foi experimentada na linhagem albina do IPEN, tanto machos como fêmeas, mediante injeção ip 30 minutos antes da irradiação e o resultado obtido da irradiação com 6 Gy de ^{60}Co , percentualmente mostra que não é significativa a diferença entre a sobrevivência dos animais somente irradiados (35% contra 40%) e a dos camundongos machos (Fig. 18 A).

Nos camundongos fêmeas, encontraram-se as taxas de sobrevivência de 55% para os irradiados e de 60% para os injetados e irradiados, não sendo significativa essa diferença (Fig. 18 B).

3.4.1.2. Peso médio corporal

Analisando as curvas dos pesos médios observou-

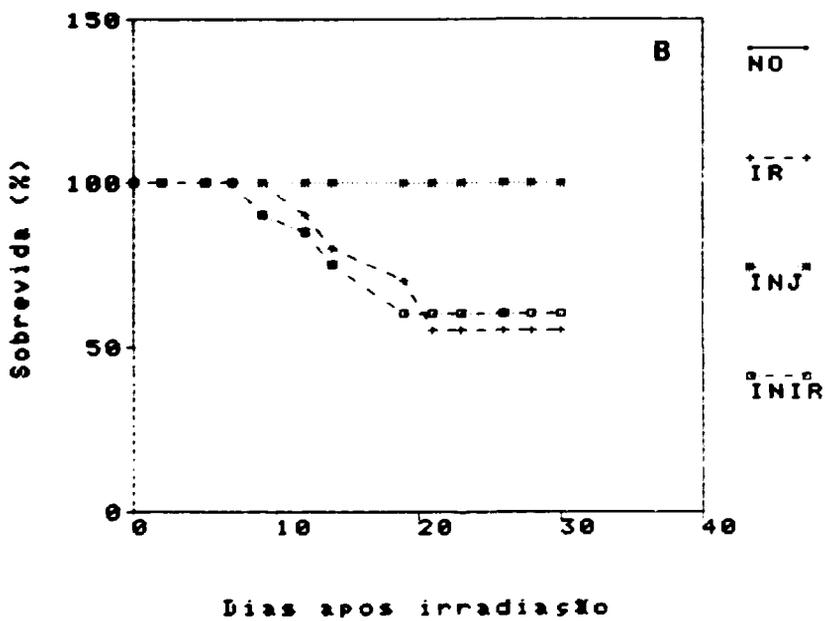
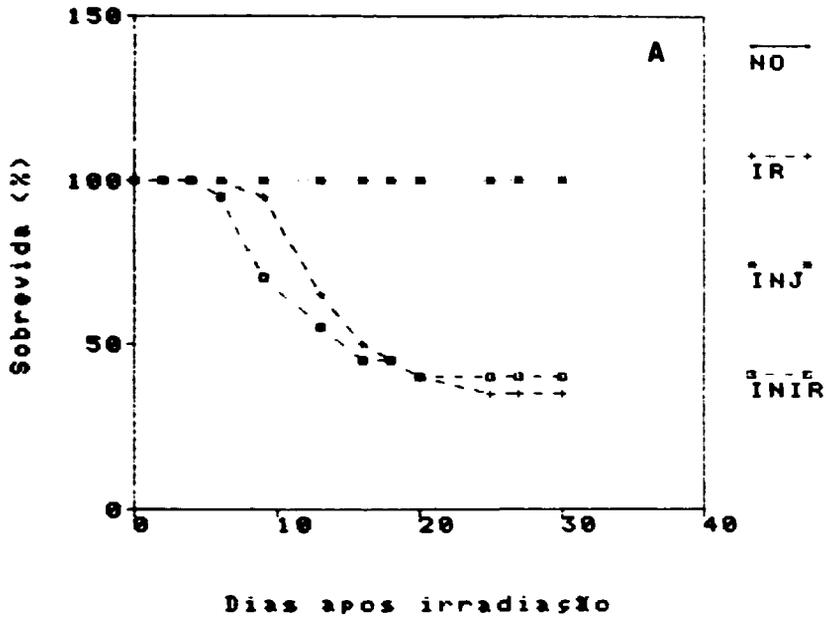


FIGURA 18. Sobrevivência de camundongos irradiados com 8 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com CIS (INJ) e tratados + irradiados (INIR). A - Animais machos e B - Animais fêmeas.

-se que são iguais aos encontrados em experimentos anteriores, há uma diferença significativa na variação do peso corporal somente entre os irradiados (tratados ou não), em relação aos controles (Figs. 19 A e B), tanto para os machos como para as fêmeas.

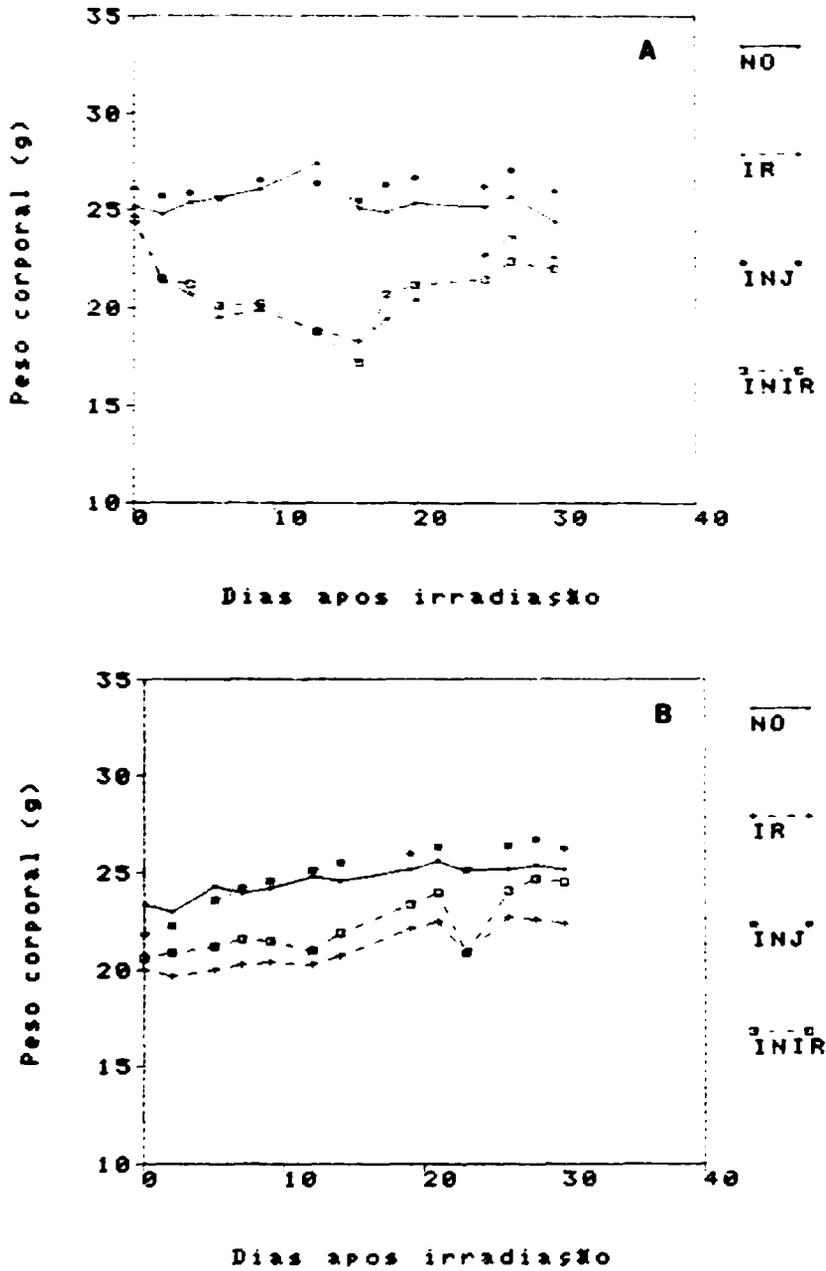


FIGURA 19. Pesos médios dos camundongos em função do tempo após irradiação com 8 Gy de ^{60}Co . Controles normais (NO), irradiados (IR), tratados com CIS (INJ) e tratados + irradiados (INIR). A - Animais machos e B - Animais fêmeas.

4. DISCUSSÃO

Procurou-se em nosso trabalho, estabelecer a capacidade modificadora de PP, AZO, LEV, PP + AZO e CIS com relação à resposta à radiação. Assim, foram analisados as taxas de sobrevivência, as curvas de peso corporal e as células do peritônio, de animais irradiados em relação aos correspondentes testemunhas.

A contagem de células peritoneais em animais de laboratório como o camundongo, apresenta relação com 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 o aspecto morfológico que traduz as alterações produzidas pelas consequências bioquímicas da irradiação. Neste caso, a irradiação estaria produzindo 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. Isso vai ao encontro das evidências que mostram a semelhança de espécies oxidadas de oxigênio envolvidas em

processos tais como inflamação, interação da radiação ionizante nos tecidos vivos e a própria respiração aeróbica.

Foram observadas variações do comportamento na taxa de sobrevivência de linhagens de camundongos, quando submetidos a tratamento prévio com PP. Os resultados obtidos mostram um aumento no número de animais sobreviventes à irradiação nos grupos previamente tratados com PP. De algum modo os mecanismos bioquímicos quando da produção do exsudato inflamatório devem estar envolvidos na resposta do organismo à radiação; o efeito imunoestimulador indiferenciado poderia ser responsável pelo aumento na sobrevivência observado. Utilizamos PP como agente inflamatório, que desencadeou a ativação dos macrófagos, conforme Schmidtke e col. (1972)⁴⁵, que injeta PP 3 dias antes da coleta para estimular os macrófagos.

Dos resultados das contagens de células peritoneais para os animais do grupo tratado com PP, observou-se que em relação aos controles, os macrófagos aumentam significativamente no 39 dia após o tratamento, enquanto que os monócitos mostram uma queda indicando possivelmente que os monócitos evoluíram para macrófagos, observação esta para os irradiados tratados ou não, o que sugere que o efeito da radiação sobre as células peritoneais se sobrepõe ao efeito de qualquer estímulo nos dias imediatos à radiação. Isto também foi observado nas curvas de peso.

É conhecido que diversos estímulos induzem a ativação de macrófagos, tais como as infecções bacterianas, infestações por protozoários, infecções virais e inoculações intraperitoneais (Doe & Hensen, 1978); além disso **Tannock** (1988)^{17,49} nos relata em seu trabalho que a microflora normal que habita diferentes espécies de animais não é idêntica, sendo que alguns microorganismos exibem especificidade por certas espécies particulares. É sabido que certos membros da microflora normal são capazes de ativar macrófagos de modo não específico ao menos em camundongos. Em nossos resultados o emprego de diversas linhagens de animais também constituíram uma forma de abordar os resultados do efeito da radiação, os quais nos mostraram nítidas diferenças de comportamento quanto à radioresistência.

No "Guide for the care and use of laboratory animals"²⁵ numa pesquisa sobre animais de diferentes linhagens viu-se que diversas espécies respondem diferentemente quando submetidos a um mesmo estímulo pois algumas espécies podem ter infecções latentes ou subclínicas que modificariam a resposta global.

Apesar de se acreditar que a morte de um animal se dá como consequência de várias mudanças bioquímicas complexas, existe um padrão coerente na relação entre o tempo de sobrevivência e dose de radiação. Com base nos trabalhos de **Quas**tlar (1945, 1956)^{34, 35}, atualmente pode-se considerar que a morte de camundongos entre 2 e 4 semanas após a irradiação, seria provocada pela chamada síndrome hematopoiética; as cé-

lulas proliferativas dos tecidos formadores de sangue teriam perdido sua habilidade de dar origem a células funcionais das quais dependem a vida. A morte de camundongos entre 4 e 5 dias após a irradiação seria resultado, entretanto, da chamada síndrome intestinal, que seria a consequência da destruição da capacidade proliferativa de células precursoras, as quais dão origem ao revestimento de células epiteliais do intestino.

No sistema utilizado, quando comparamos as diferentes linhagens de camundongos, mostrou-se que estamos sujeitos a vários tipos de respostas pois os animais estão sujeitos a uma série de estímulos, os quais tentamos manter dentro dos mesmos padrões.

Hasan e col (1988)²⁴, nos mostra um estudo sobre o efeito radioprotetor da dieta protéica em camundongos.

Frente à ação da radiação os camundongos das linhagens albinas tratados com PP mostraram uma diminuição na média de peso corporal embora recuperando-se no decorrer do experimento e na taxa de sobrevivência demonstraram ser mais radio resistentes. Comparados aos camundongos albinos, nos C57BL/6 e /10, pudemos observar que mesmo que injetados com PP, os animais desta linhagem se mostraram mais sensíveis à mesma dose de radiação que para a linhagem resistente em nosso experimento. Este resultado confirma os trabalhos de Mastro Garcia Agudo (1983)²¹, onde nos mostra uma sensibilização maior da linhagem C57BL/10 frente à radiação de ⁶⁰Co, quando compara-

da a camundongos BALB/c. Também Urbaschek (1977)⁵³, nos mostra que para a linhagem de camundongos C3H/HeJ foi observado maior índice de sensibilização à radiação X quando tratados com endotoxina em relação com a linhagem C3HeB/HeJ, o que nos sugere que entre linhagens próximas também pode haver diferença de comportamento.

Existe uma diferença nas diversas curvas de sobrevivência nas diferentes experiências. Assim, cada resultado só pode ser avaliado em relação a seu próprio controle interno, isto é, animais testemunhas submetidos a idênticas condições provenientes da mesma ninhada ou de ninhadas simultâneas, crescidas em idênticas condições sazonais, prováveis contaminações saprófitas, alimentação, temperatura, regime de luz etc.

Pelo conhecimento de como a radiação exerce seus efeitos nos organismos, é possível aprender como utilizá-la mais efetivamente no tratamento de doenças e como prever proteção efetiva contra seus efeitos nocivos. Na área de combinações de modalidades para tratamento de câncer, é de interesse a investigação de combinações da radiação com novas drogas ou combinação de drogas e até mesmo com extratos vegetais.

Muitos agentes quimioterápicos estão sendo estudados em combinação com radioterapia e muitos esforços vêm sendo dispendidos em atenção a este campo de pesquisa inclusive a combinação de radiosensibilizadores com radioprotetores, na administração de drogas que resultem numa ampla sensibilização do tumor e uma ampla proteção dos tecidos ao redor deste, quando usados em conjunto com radioterapia.

Chen (1970)¹⁵, nos relata que durante a década de 60 muito interesse foi concentrado nos efeitos inibitórios da radiação e drogas sobre o processo imunológico, particularmente em atenção às células do sistema imune e suas respostas a injeções com antígenos e na época, a atenção era mais dirigida aos macrófagos por causa de seu envolvimento com o processo de produção de anticorpos e imunidade celular então não muito claros. Seus resultados quanto a proliferação de macrófagos precursores e efeito da radiação mostrou que os precursores de fagócitos mononucleares do exsudato peritoneal inflamado, eram radiosensíveis.

Tokita (1984)⁵⁰, cita recentemente em seu trabalho sobre resposta de células peritoneais à radiação que ocorre uma rápida perda de linfócitos peritoneais e um aumento no volume dos macrófagos. Os linfócitos são considerados por vários critérios sensíveis à radiação ionizante, Lowental (1985)^E demonstra em seu trabalho, que com diferentes doses de radiação, acima de 0,2 Gy, os linfócitos morrem rapidamente.

Swartz (1981)⁴⁷ cita em seu trabalho que embora os precursores dos macrófagos sejam radiosensíveis, os macrófagos são radioresistentes e sua atividade fagocítica não é afetada pela radiação. Cita também este autor que alguns trabalhos demonstraram que para a irradiação de corpo inteiro, resulta um aumento na atividade dos macrófagos.

As informações fornecidas por Clark (1980)¹⁶, indicam que imunização e radiação causam estimulação da atividade enzimática lisossomal nos macrófagos. Ainda na década de 80, um dos assuntos tratados por MacLennan (1980)³⁰, em seu trabalho, nos mostra que macrófagos alveolares isolados foram expostos "in vitro" a várias doses de radiação X. Estas células foram as mais resistentes em relação a outras células eucarióticas.

Scher e col. (1982)⁴⁴, estudou a regulação da população de macrófagos após radiação e determinou que a indução imunológica de exsudatos ricos em macrófagos era um processo radiosensível.

Sablonnière e col. (1983)⁴¹, em seu trabalho com macrófagos alveolares de ratos irradiados com 7,5 Gy, nos mostra que a fagocitose é uma função importante no sistema reticulo-endotelial, no caso, os macrófagos, por causa da importância destes na radioressistência. A diminuição do número de células mononucleares após irradiação deriva da modificação destes provavelmente a macrófagos, como foi observado também em nossos resultados. Esse autor demonstrou que a capacidade fagocítica dos macrófagos aumenta após a irradiação com 8,5 Gy. Em nossos experimentos ao que tudo indica, pela morfologia que apresentavam estas células estariam com sua capacidade fagocitária aumentada.

Tokita (1984)⁵⁰, nos mostra um aumento da população de macrófagos com a dose de 8 Gy, assemelhando-se assim aos nossos resultados.

Segundo Gallin e col. (1984)²⁰, trabalhando com exsudato peritoneal de camundongos com doses de 7 a 20 Gy de ⁶⁰Co, a radiação produziu diminuição na porcentagem das células fagocitárias e reduziu a capacidade fagocitária dos macrófagos 6 a 10 dias após a irradiação. Entretanto estudos em diversos laboratórios tem mostrado que doses entre 0,5 a 8,0 Gy podem produzir trocas de tempo-dependência no crescimento e função dos macrófagos, como estabeleceu o mesmo autor²⁰. Em nosso caso, com doses utilizadas de 8,0 e 9,0 Gy de ⁶⁰Co, com taxas de doses da ordem de 375 Gy/h em média, observou-se que para todos os casos onde os animais foram irradiados injetados previamente ou não, houve um aumento destas células em número e tamanho.

Analisando os resultados com relação aos mononucleares (monócitos e linfócitos), houve um decréscimo destas células em todas as amostras colhidas de animais irradiados tratados ou não, coincidindo com dados da literatura que nos mostra que com doses de 5,0 ou mais Gy, os mononucleares, (monócitos e linfócitos) após 4 dias de irradiação são reduzidos significativamente²⁰.

Sbarra (1971)⁴³, em seu trabalho sobre fagocitose, relata que PMN após 100 R de radiação X mostrou uma queda na atividade fagocítica, bactericida e metabólica.

Em nossos experimentos foi usado essencialmente, o método da contagem de células peritoniais procurando-se esclarecer o comportamento do mecanismo de sobrevivência quanto à ação da radiação. Assim, após a irradiação a resposta celular indicou que para todos os casos os MØ aumentam, os mono diminuem, os poli diminuem e os mastócitos aumentam, indicando assim que a radiação interfere na cinética das células peritoniais como nos mostra o Quadro I.

Em relação à radiação

Quadro I

	L ₁	L ₂	L ₃	L ₁ + PP	L ₁ + AZO	L ₁ + PP + AZO	L ₁ + LEV
MØ	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
MONO	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
PMN	↓	↓	↓	↓	↓	↑ ↓	↑
MAS.	↑	↑	↑	↑	↑	↑ ↓	↑

L₁ - Albino IPEN

L₂ - C57BL/6

L₃ - C57BL/10

Certos radiossensibilizadores de células hipóxicas apresentam a capacidade de aumentar o efeito da radiação também em certos tecidos normais. Tal é o caso do misonidazole, que é capaz de sensibilizar pele e testículos de camundongos (Brown, 1975⁰⁸; Susuki e col. 1977⁴⁶; Yuhas e col. 1977)⁵⁹, e mucosa oral em humanos (Arcangeli e col. 1980)⁰⁴, apesar de não apresentar efeito significativo sobre a resposta à radiação da medula espinhal (Travis e col. 1982)⁵¹. Em nossos experimentos resultado diverso foi obtido com 2-nitroimidazol, o Azomycin, que mostrou ser um radioprotetor moderado. O misonidazole, ainda sobre células de medula óssea normal, mostrou ser também um radioprotetor moderado (Uma Devi et al, 1987)⁵².

Os resultados obtidos em relação à contagem de células nos mostra que o azomycin, por ser rapidamente absorvido pelo organismo, quando conjugado com radiação acompanhou o fenômeno observado nas curvas de peso onde o efeito da radiação confundiu-se ao da influência da administração da droga.

Os resultados em relação à sobrevivência dos animais tratados com AZO, nos mostra que há uma proteção frente aos irradiados. Apesar de ser observada na curva do peso uma queda maior nos injetados do que nos irradiados, esta queda não influi na sobrevivência dos animais. Este resultado obtido ao nível de irradiação de corpo inteiro é muito interessante, ve-

mos por este resultado que apesar de sua toxicidade, quando injetado sistematicamente, ele não apresenta efeito radiosensibilizador do corpo inteiro mas pelo contrário, até resulta numa leve radioproteção.

Mesmo não estando esclarecido seu modo de ação, azomycin exerceu efeito radioprotetor semelhante à PP, que é um agente conhecidamente inflamatório e como demonstrou-se em nossos experimentos tanto na taxa de sobrevivida como na contagem celular. Ainda nesta década **Workman**(1980)³⁸, fez uma revisão de trabalhos com comparação farmacocinética de alguns nitroimidazois e foi demonstrado que existe diferença entre essas drogas quanto à sua eficiência. Diz também que a sensibilização do tumor é dependente da concentração deste, na hora da radioterapia. Em nossos experimentos, o azomycin, um derivado de nitroimidazol, aplicado numa linhagem previamente testada observou-se uma resposta semelhante à apresentada pelos animais que foram estimulados com PP, tanto na taxa de sobrevivida como na diferenciação celular. Talvez possamos dizer que AZO agiu através de um efeito imuno estimulador, ou por meio de ação direta ou indireta sobre sistemas radioprotetores endógenos.

Em contra partida o levamisole, conhecidamente sensibilizador de organismos que vivem em meio hipóxico, e também um derivado de imidazol, agiu como sensibilizador para os nossos experimentos. Com base à observação dos resultados pudemos verificar que o efeito da radiação é incrementado quando conjugado com levamisole.

Os resultados obtidos em relação à sobrevivência dos animais tratados com levamisole nos mostra que há uma sensibilidade destes frente à irradiação, evidenciada pelo percentual de sobrevivência em relação aos sô irradiados. No que se refere as curvas de peso, há uma maior queda do peso corporal dos animais tratados e irradiados do que nos somente irradiados, nos sugerindo que realmente o composto tenha a ação de um radiosensibilizador.

Radiomodificadores químicos sensibilizadores e protetores são testados em radioterapia clínica de maneira incipiente. A competitiva interação das duas formas de drogas podem apresentar resultados satisfatórios. Rojas (1983)⁴⁰, nos mostra em seu trabalho um destes exemplos onde combina um protetor, WR-2721, com um sensibilizador da família dos nitroimidazois. Da observação de nossos resultados do tratamento conjunto PP + AZO também podemos dizer que há indícios de radioproteção neste nosso sistema.

Em seu trabalho, Basu e col. (1987)⁰⁵, nos mostra como a combinação de duas substâncias induzem uma radioproteção nas células sanguíneas periféricas com doses de 4 a 10 Gy. Em nosso caso, testamos azomycin conjugado com PP e obtivemos resultados satisfatórios com ação radioprotetora na taxa de sobrevivência. Para as diferentes células do peritônio, pode-se observar o comportamento conforme o Quadro I, e comparar os resultados obtidos com o dos animais radioprotetidos com cada substância em separado e concluir que a ação conjunta induz a uma radioproteção, também no nosso experimento.

Estudos foram feitos, tais como o de Begg (1983)⁰⁶, na modificação da radiosensibilidade de tecidos conjugando uma droga sensibilizadora de tecidos em hipóxia com WR-2721, conhecido radioprotetor.

Os resultados obtidos utilizando camundongos, em nossas condições, nos mostram que pela combinação de PP e AZO, ocorre uma proteção dos animais sob o efeito da radiação manifestada por um percentual de sobrevida contra uma mortalidade nos somente irradiados. Observando a curva de peso, há um decréscimo inicial como nos irradiados, posteriormente ocorre uma recuperação dos tratados, assim como nos irradiados e tratados tornam-se semelhantes.

Quanto aos resultados da contagem celular quando conjugamos os dois tratamentos ou seja PP e AZO, tanto para os injetados testemunhas como para os injetados e irradiados, houve uma resposta dos macrófagos ao estímulo inicial como conseqüente aumento destas e uma diminuição dos mononucleares, reafirmando a hipótese de que os monócitos quando estimulados e em determinadas circunstâncias, evoluem para macrófagos. Analisando-se o aumento dos polimorfonucleares há uma indicação de que não seja um resultado cumulativo, uma vez que em ambas substâncias já testadas em separado, há uma diminuição destas células. Para os animais irradiados tratados ou não verifica-se uma variação mais acentuada dos fagó-

citos, mononucleares e macrófagos, enquanto que os polimorfo nucleares e mastócitos permaneceram com seus níveis praticamente inalterados.

Em 1950, **Patt e col. (1949)³⁶**, apresentam um trabalho que diz sobre os efeitos radioprotetores da cisteína para ratos irradiados com doses letais de raio X.

Tanaka e col. (1980)⁴⁸, diz que a proteção química tem uma história de mais de 20 anos e que muitos protetores químicos, tais como a cisteína, cisteamina e AET, tem sido descritos que protegem os animais de doses letais de radiação.

Giambarresi e col. (1987)²², nos conta que desde que a capacidade de aumento de sobrevivência sobre irradiação letal de ratos, um grande número de compostos vem sendo testados e examinados por serem aptos a funcionar como radioprotetores; durante a década de 70, o programa militar norte americano, testou e desenvolveu sozinho 4.000 compostos. A maior parte dos compostos eram aminotióis, como um grupo, eles eram a mais eficiente classe de radioprotetores. A cisteína, protótipo aminotiol, é um composto sulfidrílico, contendo o amino ácido cisteína e a dose máxima tolerada foi 1200 mg/kg para camundongos. A proteção é proporcional à forma de administração da cisteína, iv é mais efetiva que quando injetada ip e é menos efetiva quando administrada oralmente. Em nossos resultados observou-se que para a injeção ip de cisteína 30 minutos antes de irradiar, não ocorreu efeito protetor nos ca-

mundongos tanto para o grupo de machos como para as fêmeas testadas. Provavelmente o tempo transcorrido entre a injeção e a irradiação foi muito longo em relação ao metabolismo do aminoácido.

5. CONCLUSÕES

- 1 - A sobrevivência de camundongos irradiados com dose de 9,0 Gy de ^{60}Co pode ser aumentada pela injeção prévia de PP.
- 2 - Existe diferenças de comportamento entre as várias linhagens de camundongos quando submetidas à mesma dose de radiação e estímulos.
- 3 - Quando conjugamos PP + AZO, ou quando ensaiamos só AZO, o resultado obtido foi de proteção contra o efeito da radiação.
- 4 - O levamisole induz radiosensibilidade em camundongos provenientes do biotério do IPEN.
- 5 - Não há correlação estrita entre a resposta celular de macrófagos peritoneais e os dados de sobrevivência.
- 6 - PP e AZO são capazes de produzir aumento de macrófagos peritoneais como consequência de inflamação inespecífica.
- 7 - Os macrófagos peritoneais apresentam radioresistência enquanto que os mononucleares demonstraram maior radiosensibilidade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - **ADAMS**, G.E. Chemical radiosensitization of hipoxia cells. Br. Med. Bull., 29:48-53, 1972.
- 02 - **ALTMAN**, K.; **GERBER**, G.B.; **OKADA**, S. Radiation effects on molecules. In: Radiation biochemistry. New York, Academic, 1970. v.1, p.189.
- 03 - **ANDREWS**, H.L. Radiation biophysics. Englewood Cliffis, N.J., Prentice Hall, 1974. c.14, p.220-31.
- 04 - **ARCANGELI**, G.M. & **MAURO**, F.C. Misonidasole also radiosensitizers some normal tissues. Br. J. Radiol. 53:44, 1980.
- 05 - **BASU**, S.K.; **CHANDRA**, K.; **CHUTTANI**, K. Radioprotection of peripheral Blood cells with a combination of hydroxytryptophan and a thiol compound in mice. Acta Oncol., 26(3):229-32, 1987.
- 06 - **BEGG**, A.C. & **TERRY**, N.H.A. Modification of Stromal radiosensitivity by misomidazole and WR-2721. Br. J. Radiol., 56:565-70, 1983.

- 07 - BELLER, D.I., et. al. Regulation of macrophage populations. I. Preferential Induction of Ia-Rich peritoneal exudates by immunologic stimuli. J. Immunol., 124:1426-32, 1980.
- 08 - BROWN, J.M. Selective radiosensitization of the hypoxic cells of mouse tumors with nitroimidazole, metronidazole and RO-07-0582. Radiat. Res. 64:633, 1975.
- 09 - BROWN, J.M. Management and significance of hypoxic cells. In: American Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 1987 Refresher course descriptions: 29th Annual meeting of the ASTRO, Massachusetts, October 18-23, 1987. Reston, Virginia, 1987.
- 10 - BUESCHER, E.S. & GALLIN, J. I. Radiation effects on cultured human monocytes and on monocyte-derived macrophages. Blood, 63(3):1402-7, 1984.
- 11 - 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):273-82, 1984.
- 12 - CAMERON, R. Inflamação e Reparação. In: Robbins, S.D. Patologia Clínica. 3^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969. p.31-73.
- 13 - CARNEIRO, H. & JUNQUEIRA, L.C. Histologia Básica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1971.
- 14 - CASARET, A.P. Radiation biology. Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall, 1968. c.4, p.57-89.

- 15 - CHEN, M.G. & SCHOOLEY, J.C. Effects of ionizing Radiation and Vinblastine on the proliferation of peritoneal Macrophage precursor in the Mouse. Radiat.Res., 41:623-36, 1970.
- 16 - CLARKE, C. & WILLS, E.D. Effect of irradiation on lysosomal enzyme activation in cultured macrophages. Int. J. Radiat. Biol., 38(1):21-30, 1980
- 17 - DOE, W.F. & HENSON, P.M. Macrophage Stimulation by bacterial lipopolysaccharides. J. Exp. Med., 148:544-56, 1978.
- 18 - ERVIN, T.J.; WEICHSELBAUM, R.R.; MILLER, D. Chemical Modulation of the hypoxic fraction in the treatment of head and neck cancer. Ann. Otol., Rhinol., Laryngol., 91:461-4, 1982.
- 19 - FOWLER, J.F. New horizons in radiation oncology. Br. J. Radiol., 52:523-35, 1979.
- 20 - GALLJN, E.K.; GREEN, S.W.; DARDEN, J. Defective Fc-mediated phagocytosis in - irradiated mouse peritoneal macrophages. Int. J. Radiat. Biol., 45(5) : 459 - 67, 1984.
- 21 - GARCIA AGUDO, N.L. del M. Biochemical aspects of the immunomodular action in irradiated survival mice with ⁶⁰Co gamma irradiation. Atomindex, 18:(23), 1987.

- 22 - GRAMBARRESI, L. & JACOBS, A.J. Radioprotectants. In: Conklin, J.J. & Walter, R.I. Military Radiobiology, Academic Press. Inc. Orlando, Florida, 1987.
- 23 - HALL, E.J. Chemical and Pharmacological modifiers. In: Hall, E. J. Radiobiol. for the Radiol. 2^a ed. 1978. p.172-84.
- 24 - HASAN, S.S. & CHATURVEDI, P.K. Whole body x - irradiation and impact of dietary factors on brain and testes of albino rats. Strahlenther. Onkol., 164(1):37-43, 1988.
- 25 - INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. Committee on care and use of laboratory animals. Guide for the care and use of laboratory animals. National Inst. of Health, Bethesda, Maryland, 1985.
- 26 - KAGIYA, T.; NISHIMOTO, S.; IDE, H.; WADA, T. Radiation -induction of nitroimidazole derivatives in aqueous solution. Int. J. Radiat. Biol., 44(5):505-17, 1983.
- 27 - KORNFIELD, L. & GREENMAN, V. Effects of Total-Body x-Irradiation on Peritoneal Cells of Mice. Radiat. Res., 29:433-44, 1966.
- 28 - LEGRAND, E.; DACULSI, R.; GALIAY, M.; ASTIER, T.; DUPLAN, J.F. Protective effect of Bone marrow and spleen suspensions on radiation-induced leukemagenesis in C57BL/6 mice. Radiat. Environ. Biophys., 23:203-12, 1974
- 29 - LOWENTHAL, J.W. & HARRIS, A.W. Activation of Mouse Lymphocytes INHIBITS induction of rapid cell Death By X-irradiation. J. Immunol., 135(2):1119-25, 1985.

- 30 - **MCLENNAN, G.; OBERLEY, L.W.;** Autor, A.P. The Role of oxygen-derived free Radicals in Radiation-induced damage and death of Nondividing Eucarictic cells. Radiat. Res., 84:122-32, 1980.
- 31 - **MACNALLY, N.J.; DENEKAMP, J.; SHELDON, P.W.** Hipoxic cell sensitization by misonidazole "in vivo" and "in vitro". Br. J. Radiol., 51:317-8, 1978.
- 32 - **MENEGHINI, R.** Cuidado com os Radicais livres. Ciênc. Hoje, 18(3):8-10, 1985.
- 33 - **MENEGHINI, R.** A toxicidade do oxigênio. Ciênc. Hoje, 28(5):57-62, 1987.
- 34 - **QUASTLER, H.** Studies of Roentgen death in mice. Am.J. Roentg., 54:449-56, 1945.
- 35 - **QUASTLER, H.** The nature of intestinal radiation death. Radiat. Res., 4:303-20, 1956.
- 36 - **PATT, H.M.; TYREE, E.B.; STRAUBE, R.L.; SMITH, D.E.** Cysteine protection agains x irradiation. Science, 110: 213, 1949.
- 37 - **REMSEN, J.F.** Effect of Misonidazole on Formation of Thy mine Damage by Gamma Rays. Radiat. Res., 101:306-11, 1985.
- 38 - **ROBBINS, S.L.** Lesões por Agentes Químicos e Físicos. In: Robbins, S.L. Patologia. 3^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969. p.450-75.

- 39 - ROBERFROID, M.G. Free Radicals and oxidate Phenomenain Biological systems. Belg. J. Food Chem. Biotechnol., 42(6):163-75, 1987.
- 40 - ROJAS, A. & DENEKAMP, J. Time dependence of interaction of misomidazole and WR-2721. Br. J. Radiol., 56:592-5, 1983.
- 41 - SABLONNIÈRE, B.; NICOLAS, J.; NEVEUX, Y.; DROUET, J. Effect of wole-body irradiation on phagocytic activity of rat alveolar macrophages. Int. J. Radiat. Biol., 44(6):575-84, 1983.
- 42 - SAS User's Guide: statistics, version 5. Cary, NC, SAS Institute, 1985.
- 43 - SBARRA, A.J. & et al. The Biochemical and antimicrobial activities of the phagocyte. Adv. Exp. Med. Biol., 209-222, 1971.
- 44 - SCHER, M.G.; UNANUE, E.R.; BELLER, D.I. Regulation of macrophage populations. J. Immunol. 128(1):447 - 50, 1982.
- 45 - SCHMIDTKE, J.R. & DIXON, F.J. The functional capacity of X-irradiated macrophages. J. Immunol., 108(6):1624-30, 1972.
- 46 - SUZUKI, N.; WETHERS, H.R.; & HUNTER, N. Radiosensitiza tion of mouse spermatogenic stem cells by Ro-07-0582. Radiat. Res., 69:598, 1977.

- 47 - SWARTZ, R. & SALUK, P.H. Functional Modifications of macrophage activity after Sublethal Whole-Body irradiation (41118). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 167:20-4,
- 48 - TANAKA, Y. & SUGAHARA, T. Clinical experiences of chemical radiation protection in tumors radiotherapy in Japan. In: Brady, L.W., Radiation sensitizers, Cancer management, vol. 5, 1980.
- 49 - TANNOCK, G.W. The normal microflora: new concepts in health promotion. Microbiological Sciences, 5:(1)1-8, 1988.
- 50 - TOKITA, N. & RAJU, M.R. Flow cytometric quantification of Radiation Responses of Murine Peritoneal cells. In: Eisert, W.G. & Mendelsohn, M.L. eds. Biological dosimetry. Berlin, Springer, 1984. p. 265-72.
- 51 - TRAVIS, E.L.; PARKINS, C.S.; HOLMES, S.J.; DOWN, J. D. Effect of misonidazole on radiation injury to mouse spinal cord. Brit. J. Cancer, 45:469-73, 1982.
- 52 - UMA DEVI, P. & BIGHT, K.S. Misonidazole does not sensitize normal bone marrow cells to radiation. Radiobiol. Radiother., 28(4):473-5, 1987.
- 53 - URBASCHEK, R. et al. Failure of endotoxin to protect C3H/HeJ mice against lethal X irradiation. Infect. Immun. 18:(3), 860-2, 1977.

- 54 - VALERIUS, N.H.; STAEHR, J.K.; SAXTRUP, N.P.; PLATZ, P.; ROSENKVIST, J.; SOBRENSEN, H. Effect of in vitro x-irradiation on lymphocyte and granulocyte function. Scand. J. Haematol., 27:9-18, 1981.
- 55 - 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. J. Invest. Dermatol. 85:398-402, 1985.
- 56 - VARNES, M.E.; BIAGLOW, J.E. Inhibition of Glycolysis of mammalian cells by Misonidazole and other Radiosensitizing Drugs. Biochem. Pharmacol., 31(14): 2345 - 51, 1982.
- 57 - WING, E.J. & REMINGTON, J.S. A hipersensibilidade retardada e as funções do macrófago. In: Imunologia Básica e Clínica. 1978. p.93-107.
- 58 - WORKMAN, P. Pharmacokinetics of hypoxic cell radiosensitizers. Cancer Clin. Trials., 3:237-51, 1980.
- 59 - YUHAS, J.M. et. al. Combined use of radioprotective and radiosensitizing drugs in experimental radiotherapy. Radiat. Res., 70:433, 1977.