

# RESULTADOS PRELIMINARES DA VARIAÇÃO DE PARÂMETROS EM EXPERIMENTOS IN VITRO DO EFEITO *BYSTANDER* INDUZIDO POR RADIAÇÃO GAMA EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS

Pedro Henrique Leroy Viana e Suely Epsztein Grynberg  
Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN

## INTRODUÇÃO

A radiação ionizante é capaz de destruir células. Os modelos até agora aceitos estudam a interação da radiação ionizante com células ou tecidos vivos e consideram o DNA como o centro de controle das células, sugerindo ser este o alvo principal da radiação. Essa teoria é conhecida como teoria alvo. No entanto, o relatório de 2006 do UNSCEAR, chamou atenção para os chamados efeitos fora do alvo e efeitos atrasados. Esses fenômenos incluem: instabilidade genômica, efeitos *bystander*, efeitos abscopais e efeitos clastogênicos em plasma.

## OBJETIVO

Verificar a existência do efeito *bystander* induzido por radiação gama nas linhagens celulares MACL-1, MDA-MB-231, MGSO-3 e HEK-293 em diversas condições experimentais, tais como dose, taxa de dose, tempos pós-irradiação (T1), tempo de resgate (T2) e densidade de células por poço, a fim de, procurar responder algumas questões que ainda encontram-se pendentes.

## METODOLOGIA

Foram utilizadas culturas celulares das linhagens MACL-1 e MGSO-3, estabelecidas por [1], além das linhagens comerciais MDA-MB-231 e HEK-293. As células foram mantidas em garrafas de cultura celular em estufa úmida 5% de CO<sub>2</sub>, a 37 °C. A cada 2 ou 3 dias, os meios de culturas eram trocados e repiques semanais eram feitos. Para a realização dos

experimentos, as células eram tripsinizadas, contadas, plaqueadas e encaminhadas para irradiação que foi realizada com o aparelho de telecobaltoterapia do Hospital Luxemburgo. Após 1h, o meio dos poços irradiados era transferido para poços com células não irradiadas (T1) e após T2, tempos de resgate, análises foram feitas através de ensaios de MTT (dimetiltiazol) para análise da viabilidade celular [2] e de apoptose por marcação do DNA nuclear com Iodeto de Propídeo [3].

## RESULTADOS

As doses, taxas de dose, quantidade de meio de cultura por poço plaqueado e os tempos precisaram ser variados um a um, mantendo-se os demais fixos até que o efeito fosse identificado.

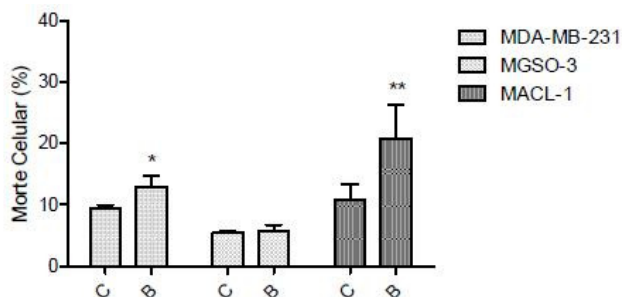
### ENSAIOS DE APOPTOSE

Densidade Celular – Experimentos com alta densidade mostraram um maior efeito *bystander*. Trabalhou-se com  $1 \times 10^5$  células/poço para T2=48h. A dose foi fixada em 10 Gy (Figura 1)

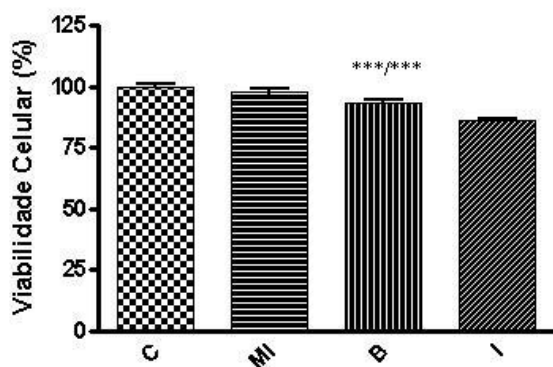
### ENSAIOS DE MTT

Ensaio com MTT (dimetiltiazol) foram realizados. Adicionamos aos experimentos um novo grupo a fim de confirmar a ocorrência do efeito *bystander*. O novo grupo foi chamado de Meio Irradiado (MI) e consiste na irradiação do meio sem qualquer célula e na transferência desse meio para culturas celulares após 1h da exposição. Foram utilizadas células da linhagem MACL-1, com dose de 8 Gy,

densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço, T1=1h e T2= 48h. Os resultados estão na Figura 2.



**Figura 1:** Morte Celular com diferença significativa (\*) e muito significativa (\*\*) indicando possivelmente o efeito *bystander*. C=controle. B=*bystander* [4].



**Figura 2:** Viabilidade Celular com diferença estatística extremamente significativa (\*\*\*) entre os grupos Controle e *Bystander* e Meio Irradiado e *Bystander* indicando possivelmente o efeito. C = controle. MI = meio irradiado. B = *bystander*. I = irradiada.

## CONCLUSÕES

O trabalho em desenvolvimento visa à verificação de um efeito que é ainda pouco conhecido e, por isso, apresenta inúmeras dúvidas que certamente serão respondidas no futuro. De uma maneira geral, tudo aquilo que pode ser feito para se aproximar o máximo possível da tecnologia utilizada por outros pesquisadores, é feito, mas ainda assim, possuímos limitações para a

execução dos experimentos. Se hoje não temos certeza absoluta do que foi realmente visto e mostrado através dos gráficos no presente trabalho, principalmente no que diz respeito a apenas o meio irradiado sem células, continuaremos nos esforçando para afunilar as possibilidades de erro e colher resultados mais consistentes futuramente. Para isso, trabalharemos agora com uma linhagem que, em estudos anteriores, foi possível observar o efeito *bystander*. Trata-se da linhagem CHO-K1, proveniente de células de ovário de hamsters chineses, estudada experimentalmente em [5]. Reproduziremos os experimentos e avaliaremos, sob nossas condições, a existência do efeito *bystander*. Ensaio com iodeto de propídeo, MTT e clonogenicidade serão eventualmente utilizados para a aquisição de dados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]Correa, C. R.; Bertollo, C. M.; Goes, A., *Oncology Research*, v. 17, p. 1-100, 2009.
- [2]Mosmann, T. *Journal Immunology Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- [3]Nicolleti, I.; Migliorati, G.; Pagliacci, M. C.; Grignani, F.; Riccardi, C. *Journal of Immunology Methods*, v. 139, p.271-279, 1991.
- [4]Silva, R. G. da; *Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais/ CDTN*, 2011.
- [5]Nugent, S.; Mothersill, C.; Seymour, C.; McClean, B.; Lyng, F.; Murphy, J. *Radiation Research*, v. 168, p. 134-142, 2007.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

CNPq e CNEN