

VERIFICAÇÃO EXPERIMENTAL PARA CONFIRMAÇÃO DE TÉCNICA *IN VITRO* DO EFEITO *BYSTANDER* INDUZIDO POR RADIAÇÃO GAMA NA LINHAGEM CELULAR CHO-K1

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

INTRODUÇÃO

Mothersill e Seymour definem o efeito *bystander* como uma resposta detectada em células não diretamente irradiadas, mas influenciadas, de alguma forma, pela mensagem transmitida por células irradiadas [1]. Os experimentos realizados com transferência de meio demonstram efeitos *bystander* para letalidade celular, aberrações cromossômicas e atraso do ciclo celular e sugerem que tal efeito se deve a uma molécula secretada pelas células irradiadas que é capaz de transferir danos às células distantes [2]. Os resultados biológicos finais em células *bystander* são dependentes de uma grande variedade de fatores incluindo a dose, taxa de dose, qualidade da irradiação e tipo de célula ou tecido [3].

OBJETIVO

Confirmar a técnica de verificação *in vitro* da existência do efeito *bystander* induzido por radiação gama anteriormente realizado em linhagens celulares humanas, na linhagem celular CHO-K1 em diversas condições experimentais e em concordância com o artigo de Nugent *et al.* [4], a fim de dar continuidade ao projeto.

METODOLOGIA

Foram utilizadas culturas celulares da linhagem CHO-K1. Essas culturas foram mantidas em garrafas de cultura celular em estufa úmida 5% de CO₂, 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 tanto no aparelho de telecobaltoterapia do Hospital Luxemburgo, quanto no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) do CDTN. Após 1h, o meio dos poços irradiados era transferido para poços com células não irradiadas (T1) e após T2, tempos de resgate, as análises foram feitas por quantificação da apoptose celular pela técnica de citometria de fluxo.

RESULTADOS

Os resultados abaixo mostrados fazem referência a conjuntos de experimentos semanais realizados independentemente, procurando atender as mesmas condições experimentais, e organizados em triplicatas, em que se torna possível elaborar um pool gênico para análise da apoptose na linhagem celular estudada. Para isso, as doses foram fixadas em 0,5 Gy, 2 Gy e 5 Gy.

APARELHO DE TELECOBALTOTERAPIA

Os experimentos a seguir foram feitos com a densidade de 5×10^5 células, usando doses de 0,5 Gy, 2 Gy e 5 Gy para T1=1h e T2=24 e 48h. Os *** indicam diferença significativa do grupo *Bystander* em relação ao grupo Controle (Figuras 1 e 2).

LABORATÓRIO DE IRRADIAÇÃO GAMA (LIG)

Os experimentos a seguir foram feitos com a densidade de 5×10^5 células, com a dose fixada em 2 Gy para T1=1h e T2=48h.

Os ** indicam diferença significativa do grupo *Bystander* em relação ao grupo Controle (Figura 3).

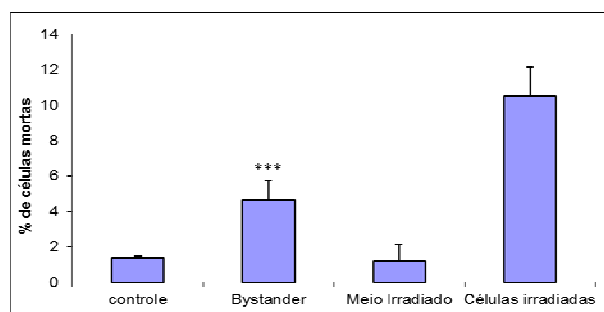


Figura 1. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 0,5 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=24h.

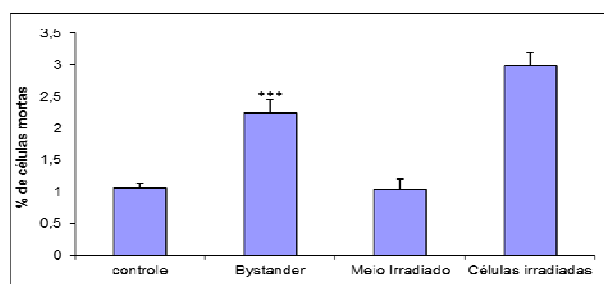


Figura 2. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 5 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=48h.

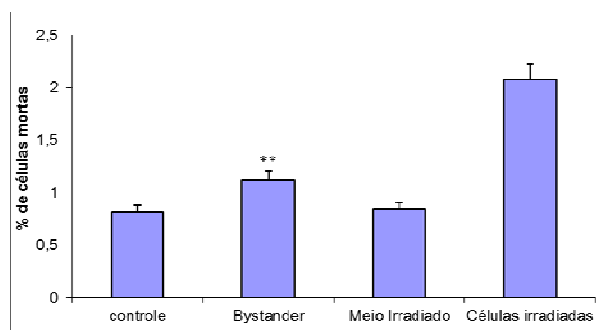


Figura 3. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 2 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=48h.

CONCLUSÕES

Os resultados acima sugerem que as condições de trabalho adotadas pelo grupo apresentam eficiência técnica e possibilitam a reprodução do efeito *bystander*. Além disso, não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e meio irradiado. Pode-se sugerir, portanto, que o fator causador do efeito não está presente no meio de cultura, sendo intrínseco às linhagens celulares. Concluímos ainda que o aparelho de telecobaltoterapia é o mais indicado para experimentos *bystander*, as baixas doses são imprescindíveis para a observação do efeito, a densidade celular fixada em 5×10^5 células e que o tempo de resgate T2=48h foi o que melhor apresentou o efeito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]Mothersill, C.; Seymour, C. B. International Journal of Radiation Biology. V. 71, p. 421-427, 1997.
- [2]Hall, E. J. Health Physics, v. 85, p. 31-35, 2003.
- [3]Blyth, B. J.; Sykes, P. J. Radiation Research, v. 176, p. 139-157, 2011.
- [4]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