

22 a 27 de abril de 1990

ANAIS - PROCEEDINGS

APLICAÇÃO DE AMINOTIÓIS COMO RADIOPROTETORES EM CAMUNDONGOS

Anna Lúcia C.H. Villavicêncio
Nélida Lúcia Del Mastro

Departamento de Aplicações em Ciências Biológicas
Divisão de Radiobiologia
Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN/SP

SUMÁRIO

Aminoetiltiouréia (AET) e mercaptoetilamina ou cisteamina (MEA), compostos que contêm grupamentos -SH e -NH₂, solúveis em água, foram testados na sua capacidade de incrementar a sobrevivência de camundongos irradiados com 9 Gy de ⁶⁰Co (4,55 Gy/min). Apesar de o AET apresentar o grupamento tiol bloqueado pela uréia, sua efetividade depende do pH fisiológico para formar o composto com tiol livre, a mercaptoetilguanidina. Os animais foram injetados intraperitonealmente com AET (300 mg/kg) ou MEA (125 mg/kg) em solução de NaCl 0,85% 30 minutos antes da irradiação, e as curvas de peso e sobrevivência registradas durante 30 dias. Contagens de células peritoneais foram realizadas, 2 horas, 3 e 6 dias após irradiação. Ambos compostos mostram ação radioprotetora confirmando dados da literatura. Dentre os possíveis mecanismos de ação dos aminotióis como radioprotetores é sugerido: a ação de "scavenger" de radicais livres formados pela radiólise da água; proteção através da remoção de O₂; alteração nos tióis proteicos celulares; aumento do reparo do dano da radiação ou alterações na atividade de enzimas envolvidas na redução do dano oxidativo, tais como GSH - peroxidase ou transferase.

ABSTRACT

Aminoethylurea (AET) and mercaptoethylamine or cysteamine (MEA) compounds containing -SH and -NH₂ groups were tested in their capacity of increasing the survival of 9 Gy ⁶⁰Co irradiated mice (4.55 Gy/min). In spite of AET has the thiol radical covered by an urea molecule its effectiveness depends on the physiological pH in order to liberate a free thiol, forming the mercaptoethylguanidine. The animals were injected intraperitoneally with 300 mg / kg AET or 125 mg/kg MEA dissolved in 0.85% NaCl, 30 minutes before irradiation being the survival and weight curves registered during 30 days. Peritoneal cell counts were made 2 hours, 3 and 6 days after irradiation. Both compounds showed a radioprotective action confirming data from the literature. Among possible mechanisms about the action of aminothiols as radioprotectors, it is suggested: free radicals scavengers of radical formed by water radiolysis; protection through O₂ remotion; alterations in cellular proteic thiols; increase of the radiation damage or alterations in the activity of the enzymes involved in the reduction of oxidative damage like GSH-peroxidase or transferase.

INTRODUÇÃO

Numerosos estudos sobre a capacidade radioprotetora de compostos químicos vêm sendo feitas desde a descoberta da proteção de mamíferos com cisteína em 1949 por Patt et al. O grupo conhecido como radioprotetores é constituído por compostos sulfidrílicos, sendo entre eles, a cisteína o mais simples, que é um aminoácido natural. A cisteína é capaz de proteger pequenos roedores dos efeitos da exposição à radiação de corpo inteiro quando a droga é injetada ou ingerida antes da irradiação (Hall, 1978).

Muitos compostos similares têm sido testados e mostraram ser efetivos radioprotetores; aminoetiltiouréia (AET) e mercaptoetilamina (MEA) estão incluídos nessa classe de agentes. Certos aminotióis em particular, têm sido testados e demonstraram sua eficiência tendo estrutura comum o grupamento SH livre (ou grupo SH potencial) e uma função básica, tal como uma amina ou guanidina, separadas por dois ou três átomos de carbono (Hall, 1978). Os mecanismos de proteção propostos para a ação destes compostos é a de aprisionamento de radicais livres ("free radical scavengers"), a hipótese de disulfetos mistos, a indução de hipoxia ou a teoria de choque bioquímico. Entretanto, nenhum deles é satisfatório para explicar totalmente a radioproteção obtida em animais e em células (Hikita et al., 1975). Esses e outros aminotióis têm sido usados em pesquisas como agentes radioprotetores, anticarcinogênicos (Hall et al., 1978) e para proteger contra a citotoxicidade do misonidazole (Jocelyn, 1972). A toxicidade do MEA tem sido atribuída à produção de peróxidos via reação espontânea com o oxigênio, catalizada por íons metálicos (Takagi et al., 1974). Os metabólitos do oxigênio desempenham um importante papel durante a irradiação gama. Essas mesmas espécies ativas de oxigênio (EAO) estão envolvidas na geração de tumores (Schwalb, 1988), no envelhecimento e nos processos inflamatórios. Nestes, os leucócitos fagocitários presentes na corrente sanguínea, ao entrarem em contato com microorganismos invasores (bactérias, por exemplo), são induzidos a produzir a nível de suas membranas, espécies tóxicas de oxigênio que contribuem para o processo de destruição dos invasores (Meneghini, 1985). Por essa razão os próprios fagócitos são potenciais carcinogênicos, já que eles geram oxidantes reativos estáveis e instáveis.

A função radioprotetora dos aminotióis está limitada por seu potencial redox (Ghose, 1982). Os fagócitos mononucleares são relativamente riorresistentes quando sua capacidade funcional é medida imediatamente após a irradiação. Entretanto, alguns autores descrevem mudanças na função e no crescimento de macrófagos dependendo do tempo após irradiação (Gallin et al., 1984).

O objetivo do presente trabalho é investigar a radioproteção conferida a camundongos irradiados na dose próxima da DL50/30 na presença de AET e MEA separadamente e analisar as mudanças nos níveis de populações celulares peritoneais, fagócitos mononucleares e polimorfonucleares, sob a ação da radiação e como resposta de tais células aos efeitos destas drogas.

MATERIAIS E MÉTODOS

- Material biológico

Utilizaram-se camundongos albinos do biotério do IPEN, machos com idade aproximada de 9 semanas em dieta usual de laboratório e água filtrada ad libitum.

- Irradiações

As irradiações foram feitas em uma fonte gama de ^{60}Co , Gamma cell 220. A taxa de dose média foi de 4,55 Gy/min, variando entre 4,4 a 4,7 Gy/min. Irradiaram-se 3 animais por vez, com uma dose de 9,0 Gy.

- Curvas de Sobrevida e Peso

Os animais foram alojados em gaiolas metálicas para camundongos, em grupos de 5 a 10 animais por gaiola; foram pesados individualmente, identificados por grupos e protocolados de acordo com cada tratamento. Em cada experimento para curvas de sobrevida e peso, 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.

- Obtenção de Células Peritoneais

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

- macrófagos típicos;
- fagócitos mononucleares (macrófagos jovens, linfócitos e monócitos);
- polimorfonucleares;
- mastócitos.

Para cada ponto foi computado o resultado da contagem de células provenientes de 5 animais e foram colhidas amostras de exudato peritoneal nos tempos:

- t = 0: no dia da irradiação (2 horas após)
- t = 3: três dias após a irradiação;
- t = 6: seis dias após a irradiação.

A colheita do exudato peritoneal foi realizada posteriormente a injeção intra peritoneal de 3 ml de solução fisiológica heparinizada em animais anestesiados, sacrificados e exangüinados. Após leve massagem no abdômem durante alguns minutos, foi

colhido 0,9 ml do exudato 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 geladeiras até o momento da contagem e identificação das células.

- Quantificação e Qualificação das Células

A contagem das células totais foi realizada em câmara de Neubauer. O total das células encontradas foi multiplicado pelo fator de câmara $\times 10^4$, o que determina a quantidade de células por 1 ml.

A análise diferencial foi realizada colocando-se alíquotas do material sobre lâminas recobrimo-as com lamínulas. Foram contadas 200 células, utilizando-se o método de varredura em zigue-zague, e registradas as correspondentes percentuais de cada população celular. O valor absoluto de cada tipo celular foi obtido mediante a relação com o número de células totais multiplicados pela porcentagem encontrada de cada tipo e dividido por cem, obtendo-se desta forma o total de células percentuais de cada tipo.

- Tratamentos

Os aminotióis utilizados foram os seguintes:

a) Aminotiltiouréia - AET - (SIGMA), na dose de 300 mg/kg ou 10,5 mg/0,2 ml injetada ip. A concentração escolhida foi limitada pela citotoxicidade da substância. Foi preparada em solução fisiológica e injetada 30 minutos antes da irradiação.

b) Mercaptoetilamina - MEA - (SIGMA), na dose de 125 mg/kg ou 3,75 mg/0,2 ml ip. A substância também é conhecida por sua citotoxicidade. Foi preparada em solução fisiológica e in injetada 20 minutos antes da irradiação.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em relação à curva de sobrevivida mostram que, para os animais machos tratados com AET o aumento da sobrevivida é significativo pelo número de animais sobreviventes à irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . Na figura 1A podemos observar uma sobrevivida de 95% aos 30 dias nos animais tratados frente a 45% nos animais somente irradiados.

Os resultados em relação à sobrevivida após a irradiação dos animais machos tratados com MEA mostram que há uma proteção efetiva, 100% de sobreviventes enquanto que os sô irradiados, a sobrevivida foi de 55% como nos mostra a figura 1B.

As variações observadas no comportamento da taxa de sobrevivida nos camundongos utilizados mostram uma semelhança com os resultados descritos no trabalho de Giambarresi e Jacobs, 1987, que mostra que a capacidade radioprotetora estaria próxima da dose tóxica (LD₅₀). Nesse trabalho, as doses letais para 50% dos animais para MEA e AET foram respectivamente de 200 e 480 mg/kg, sendo as doses radioprotetoras destas de 150 e 400 mg/kg respectivamente. Em nosso trabalho foram utilizadas 125

e 300 mg/kg respectivamente para MEA e AET, já que doses maiores foram letais para os camundongos utilizados. Os resultados obtidos mostram que a sensibilidade frente às drogas em nossos animais é similar à descrita no trabalho desses autores sendo necessário levar em consideração possíveis diferenças de espécie, condições nutricionais e de estímulo imunológico. Ainda o mesmo autor cita que um grande número de compostos vêm sendo testados e examinados por serem aptos a funcionar como os radioprotetores, sendo que o programa militar norte americano, já testou e desenvolveu 4.000 compostos na década de 70. Destes, a maior parte eram aminotióis, corroborando ser a mais eficiente classe de radioprotetores.

Nosso trabalho permite concluir que a sobrevivência de camundongos albinos do IPEN, irradiados com dose de 9,0 Gy ^{60}Co pode ser aumentada pela injeção prévia de AET e MEA em doses subtóxicas destes compostos. Em relação aos resultados obtidos com os diferentes tipos celulares do exudato peritoneal pudemos observar, conforme nos mostra a figura 2A que em relação aos macrófagos, há um aumento destas células, quando da irradiação do animal, porém os macrófagos dos animais irradiados e submetidos previamente ao tratamento tanto com MEA, como com AET, esse aumento não é tão pronunciado no 6º dia após.

Isto sugere que estas substâncias não seriam imunostimuladoras, pois até o 3º dia não há manifestação de resposta diferencial.

Ghose, 1987, relata em seu trabalho que 5 a 15 dias após a irradiação é notada uma diferença marcante na celularidade da medula entre controles irradiados e grupos tratados com AET, indicando uma repopulação acelerada nos animais protegidos. Observando os outros tipos celulares, nota-se um comportamento semelhante para os mononucleares como mostra a figura 2B.

Para os Polimorfonucleares e mastócitos entretanto, no espaço de tempo em que foram observadas as células, não se notam variações como consequência dos tratamentos mas só o efeito da radiação. Assim, 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.

Segundo o trabalho de Villarrubia et al, 1988, há correlação entre o número de células mononucleares periféricas e a recuperação da medula óssea após radioquimioterapia provavelmente relacionado à capacidade das células mononucleares de produzir fatores estimuladores endógenos. 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 semelhantes 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 evidên

cias que mostrama semelhança de espécies oxidadas de oxigênio envolvidas em processos tais como inflamação e interação da radiação ionizante nos tecidos vivos e a própria respiração aeróbica.

Tokita e Raju (1984), citam em seu trabalho sobre a resposta de células peritoneais em relação à radiação que ocorre uma rápida perda de linfócitos peritoneais e um aumento no volume dos macrófagos. Estes dados também são confirmados em nosso trabalho.

Swartz e Saluk (1981), citam que, embora os precursores dos macrófagos sejam radiosensíveis, os macrófagos seriam radorresistentes e sua atividade fagocítica não seria afetada pela radiação. Dessa maneira, a irradiação de corpo inteiro, resultaria em um aumento da atividade dos macrófagos pela ativação destes diretamente ou mediado pelo estímulo da fagocitose de produtos formados como consequência do dano da radiação nos tecidos.

Para concluir, as alterações nas populações celulares peritoneais por si próprias não são específicas do efeito da radiação. Contudo, as alterações nos macrófagos e mononucleares mostram indícios de acompanhar os efeitos radioprotetores verificados nas curvas de sobrevivência. São necessários maiores dados entretanto, para poder determinar os diversos aspectos da patologia da radiação e o papel desempenhado pelos radioprotetores no sistema.

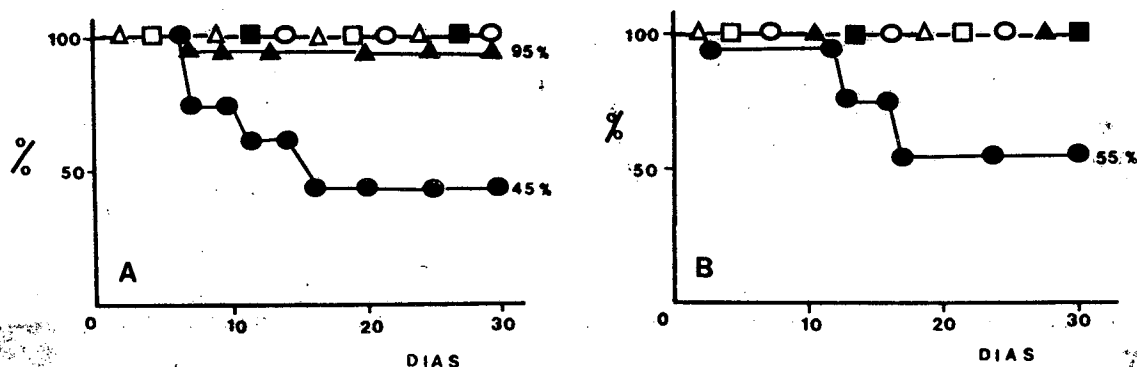


FIG. 1 - Percentual de sobrevivência de camundongos irradiados com 9 Gy de ^{60}Co , em função do tempo após irradiação. A: controles normais (—○—), irradiados (—●—), tratados com AET (△—△) e tratados + irradiados (▲—▲); B: Controles normais (—○—), irradiados (—●—), tratados com MEA (□—□) e tratados + irradiados (■—■).

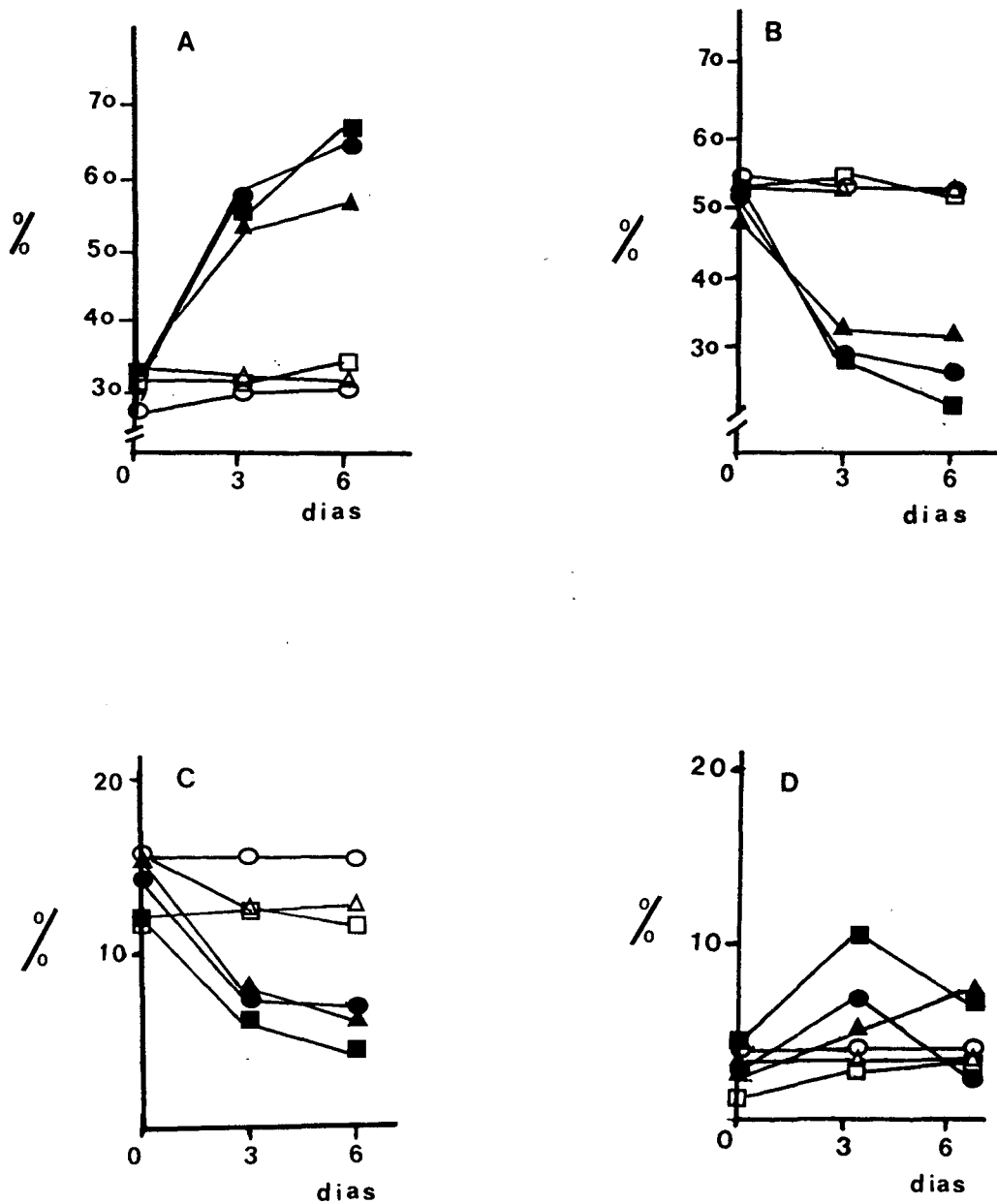


FIG. 2 - Percentual de células peritoneais em função do tempo após irradiação com 9 Gy de ^{60}Co . Controles normais (—○—), irradiados (—●—), tratados com AET (—△—), tratados com MEA (—□—), tratados com AET+irradiados (—▲—) e tratados com MEA+irradiados (—■—), **A**: Macrófagos; **B**: Mononucleares; **C**: Polimorfonucleares; **D**: Mastócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - GALLIN, E.K., GREEN, S.W. and DARDEN, J. Defective Fc mediated phagocytosis in irradiated mouse peritoneal macrophages. Int. J. Radiat. Biol., 5(45): 459-67, 1984.
- 2 - GHOSE, A., GANGULY, S.K. and KAUR, J. Protection with combination of hydroxytryptophan and some thiol compounds against whole-body gamma irradiations. In: Proceedings of TWC Nuclear Medicine and Biology, Paris, 29 August-2 September, volume IV, edited by C. Raynand (Pergamon Press.), pp.2681, 1982.
- 3 - GHOSE, A., GANGULY, S.U., KAUR, J. and MATHUR, M. Radioprotection to mice combination of hidroxytryptophan with AET or MPG: bone marrow histology study. Radiobiol. Radiother., 28(4):477-82, 1987.
- 4 - GIAMBARRESI, L. and JACOBS, A.J. - Radioprotectants. J.J.-CONKLIN and R.I. WALKER, Millitary Radiobiology, Academic Press, Inc. London, pp.265-96, 1987.
- 5 - HALL, E.J. Chemical and Pharmacological modifiers. HALL, E. J. Radiobiol. for the Radiol. 2ª ed.. 1ª ed., ed. 1978. p. 172.84, 1978.
- 6 - HIKITA, M., HORIKAWA, M. and MORI, T. Analysis of Radioprotective action and cytotoxicity of various sulfydryl compounds in cultured Mouse L cells. J. Radiat. Res., 16:162-72, 1975.
- 7 - JOCELYN, P.C. Biochemistry of the SH group. Academic Press. London, pp. 404, 1972.
- 8 - MENEHINI, R. - A toxicidade do oxigênio. Ciência Hoje, 5(28):57-62, 1987.
- 9 - PATT, H.M. TYREE, E.B., STRAUB R.L. and SMITH, D.E. - Cysteine protection against x irradiation. Science 110: 213-14, 1949.
- 10 - SHAWALB; G. BEYERS, A.D., ANDERSON, R. and NEL, A.E. Promotion of DNA strand breaks in cocultured Mononuclear leukocytes by protein kinase c - dependent prooxidative interactions of Benoxapofen, Human polymorphonuclear leukocytes, and ultraviolet radiation. Cancer Res., 48:3094-99, 1988.
- 11 - SWARTZ, R. and SALUK, P.H. Functional Modifications of Macrophage activity after sublethal - body irradiation. Proc. Soc. Biol. Med., 167:20-4, 1981.

- 12 - TAKACHI, Y., SHIKITA, M., TERASIMA, T. and AKABOSHI, S. Specificity of radioprotective and cytotoxic effects of cysteamine in HeLa S₃ Cells: Generation of peroxide as the mechanism of paradoxical toxicity. Radiat. Res., 60:292-301, 1974.
- 13 - TOKITA, N. and RAJU, M.R. Flow cytometric quantification of radiation responses of murine peritoneal cells. W.G. EISERT and M.L. MENDELSON, Biological Dosimetry, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.265-72, 1984.
- 14 - VILLARRUBIA, V.G., SADA, G., MARQUEZ, P., DOSORETS, B., ROSSETTI, J., and LEVY, D.E. Spontaneous and AM₃ - induced bone marrow recovery after radio-chemotherapy arrest seem to depend on levels of peripheral blood mononuclear cells. Int. J. Immunotherapy, IV (3):177-85, 1988.