

AVALIAÇÃO DO DANO RADIOINDUZIDO NO DNA E REPARO EM LINFÓCITOS HUMANOS PELO MÉTODO DO COMETA ("SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS")

Patricia A. do Nascimento*, Miriam F. Suzuki* e Kayo Okazaki*

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05422-970, São Paulo, Brasil
panascim@net.ipen.br

RESUMO

O método do Cometa ("Single cell gel electrophoresis") é uma técnica bioquímica que sob condições alcalinas permite detectar lesões no DNA como quebras nas fitas simples e sítios alcali-lábeis induzidos por agentes genotóxicos em nível de células individuais. O presente trabalho visa o estudo do dano e reparo do DNA, utilizando o método do cometa em linfócitos humanos, irradiados com várias doses de radiação gama. As amostras sanguíneas de 3 doadores sadios (40-50 anos), ambos os sexos, foram coletadas, fracionadas, irradiadas numa fonte de ^{60}Co com doses de 0,17; 0,25; 0,57; 1,10; 2,12 e 4,22 Gy (0,591 Gy/min.) e processadas 1 e 24 horas após a irradiação. Os resultados obtidos de linfócitos processados 1 hora após a irradiação mostraram que houve um aumento do comprimento total do cometa em função da dose de radiação. A lesão no DNA de linfócitos irradiados com 4,22 Gy (valor médio de 101,4 μm) foi cerca de 3,4 vezes maior em relação ao controle não-irradiado (valor médio de 30 μm), enquanto que aquela obtida 24 horas após a exposição foi cerca de 1,5 vezes maior (valor médio de 46,3 μm). Esta redução na migração do DNA observada após 24 horas, sugere um possível reparo do dano ocorrido no DNA. Foi possível também observar subpopulações de linfócitos com diferentes sensibilidades e capacidades de reparo à ação da radiação ionizante.

I. INTRODUÇÃO

O alvo mais importante da radiação ionizante é o DNA, dado o papel desempenhado por ele no controle de diversas funções celulares.

A exposição de células à radiação ionizante induz uma variedade de lesões no DNA, como quebras nas fitas simples e duplas, ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteínas e danos de bases púricas e pirimidínicas [1]. Muitas dessas lesões primárias são prontamente reparadas. Contudo, aquelas não reparadas ou reparadas erroneamente podem acarretar consequências de grande significado biológico como a letalidade celular, envelhecimento precoce e a indução de câncer.

Esta capacidade de reparo pode ser expressa em diferentes graus, desde ineficiente a altamente eficiente, e pode estar amplamente distribuída entre os indivíduos da população [2].

Assim sendo, uma variedade de métodos foram desenvolvidos para detectar lesões induzidas no DNA em células de mamíferos.

Neste contexto, o teste do cometa também chamado eletroforese de microgel desenvolvido por Östling e Johanson [3] é um método que possibilita a visualização direta do dano no DNA e reparo em nível de célula individual.

Nesta técnica, as células são embebidas em agarose, o material citoplasmático é lisado e os núcleos celulares remanescentes são expostos a um campo elétrico.

Dependendo da quantidade de dano no DNA, "cometas" são observados após eletroforese, corados com um agente fluorescente. A proporção de DNA na cauda do cometa, comparada com a quantidade de DNA presente na cabeça é uma medida do dano no DNA. O reparo pode ser avaliado mantendo-se as células a 37°C, durante um intervalo de tempo, e comparando com às mantidas a 0°C.

O sangue periférico humano tem sido amplamente usado em investigações toxicológicas como um sistema-teste no estudo do efeito de vários xenobióticos em células humanas. Vários investigadores tem comparado a sensibilidade de linfócitos aos vários mutagênicos, físicos ou químicos, em termos de sobrevivência celular, índice proliferativo, indução de trocas entre cromátides-irmãs, aberrações cromossômicas e micronúcleos.

No presente trabalho, foram analisados linfócitos sanguíneos de 3 doadores sadios, processados 1 e 24 horas após a irradiação *in vitro* com ^{60}Co , por meio da técnica do cometa, visando averiguar se as células irradiadas de indivíduos diferentes apresentam quantidades similares de dano e se todas elas reparam o dano no DNA com a mesma proficiência.

II. MATERIAIS E MÉTODO

Foram utilizadas amostras sanguíneas de 3 doadores sadios, um do sexo masculino e dois do sexo feminino, com idades variando de 40 a 50 anos, não-fumantes, sem quaisquer sintomas de doença e que não estavam ingerindo qualquer tipo de medicamento na ocasião da coleta.

De cada doador, cerca de 3 ml de sangue foram coletados por punção venosa, fracionados e irradiados numa fonte de ^{60}Co , GAMMACELL 220, nas doses de 0,17; 0,25; 0,57; 1,10; 2,12 e 4,22 Gy (0,591 Gy/min.), na presença de oxigênio e à temperatura ambiente, sendo que uma das amostras foi mantida como controle (não-irradiado).

As células foram processadas para o teste do cometa (teste de eletroforese de microgel) conforme descrito por Singh e colaboradores [4], 1 e 24 horas (amostras mantidas a 37°C) para o estudo do reparo após as irradiações.

As amostras sanguíneas (5 μl) foram embebidas entre duas camadas de gel de agarose (300 μl de agarose "normal melting" 0,7% e 90 μl de agarose "low melting" 0,5% em tampão PBS), montadas em lâminas histológicas foscas.

Após a solidificação dos géis, as células foram tratadas com uma solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM de Tris, 1% de sarcosinato de Na pH 10, 1% de triton X-100, 10% DMSO) por 2 horas a 4°C, para remoção de todas as proteínas.

A seguir, as células embebidas em gel de agarose foram imersas em tampão alcalino de eletroforese (1 mM de EDTA pH10, 300 mM de NaOH) por 20 minutos, para expressão das quebras nas fitas simples e de sítios alcalilábeis do DNA e submetidas a uma corrida eletroforética (25 V; 300 mA) por 20 minutos.

Após a eletroforese, as células foram neutralizadas com 0,4 M de Tris, pH 7,5, coradas com 50 μl de brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e os "cometas" resultantes foram analisados e fotografados ao microscópio de fluorescência (CARL ZEISS, objetiva de 20x), equipado com filtro de

excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm.

A análise foi feita no próprio negativo (filme T-MAX 400 da Kodak), projetando-se as imagens dos cometas por meio de um projetor de slides.

Para cada doador foram analisados cerca de 50 cometas escolhidos ao acaso para cada dose de radiação. O dano no DNA foi quantificado para cada célula individualmente, medindo-se o comprimento total do cometa (cabeça + cauda) em μm .

Foi calculada a proficiência de reparo (PR) de acordo com a fórmula descrita por Malcolmson et al. [5]: $PR = (\text{dano} - \text{reparo}) / (\text{dano} - \text{controle})$, onde o dano e o reparo foram expressos pelas médias dos comprimentos totais dos cometas obtidas, 1 e 24 horas após as irradiações, respectivamente, para cada doador estudado.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a relação dose-resposta para a migração de DNA em linfócitos sanguíneos de 3 doadores (A, B, C), 1 (a) e 24 horas (b) após as irradiações.

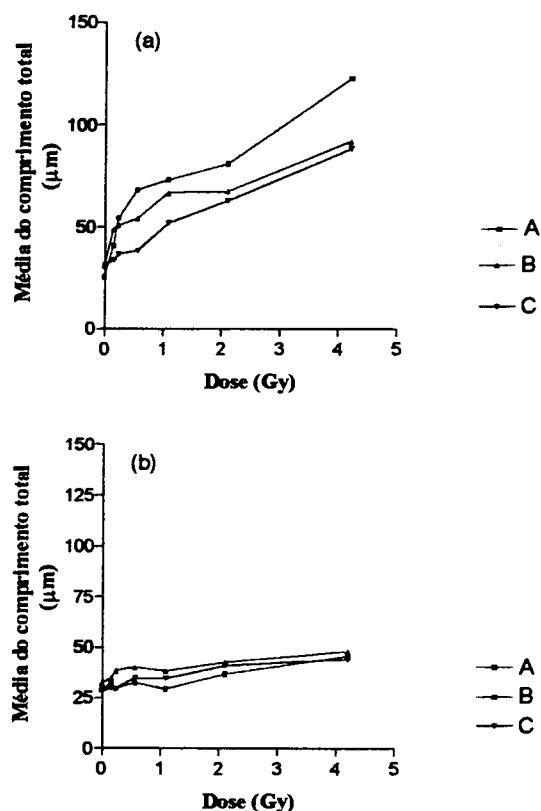


Figura 1. Curvas dose-respostas para migração de DNA em linfócitos periféricos processados 1 (a) e 24 horas (b) após as irradiações.

Em ambos os casos, há um aumento na quantidade de DNA nas caudas em função da dose de radiação. Isto porque com o aumento da dose de radiação, há um incremento no número de lesões no DNA e os filamentos danificados migram de maneira pronunciada em sentido ao ânodo numa corrida eletroforética, dando origem à cauda do cometa. A quantidade de DNA que migra da "cabeça" à cauda do cometa está diretamente relacionada com a magnitude do dano ocorrido.

A Figura 1b mostra ainda que há uma redução considerável do comprimento total do cometa em todas as doses, quando as amostras são processadas 24 horas após a exposição. Estas observações sugerem que muitas dessas radiolesões induzidas são eficientemente reparadas, onde a quantidade de dano residual após 24 horas é próxima dos valores controle para as doses baixas.

A média do comprimento total do cometa obtida 1 hora após a irradiação com 4,22 Gy é cerca de 3,4 vezes maior (101,4 μm) em relação ao controle não irradiado (30 μm).

É possível observar também que, embora os 3 doadores apresentem comportamentos análogos à ação da radiação ionizante, o indivíduo A responde com mais intensidade quando analisado 1 hora após a exposição, apresentando maior quantidade de dano no DNA em todas as doses, ocorrendo o processo inverso 24 horas após a irradiação. Estes dados sugerem um reparo mais eficiente no indivíduo A em relação aos outros doadores.

Similarmente, o indivíduo B que mostra uma resposta intermediária 1 hora após o tratamento, é o que apresenta maior quantidade de dano quando analisado 24 horas após a exposição.

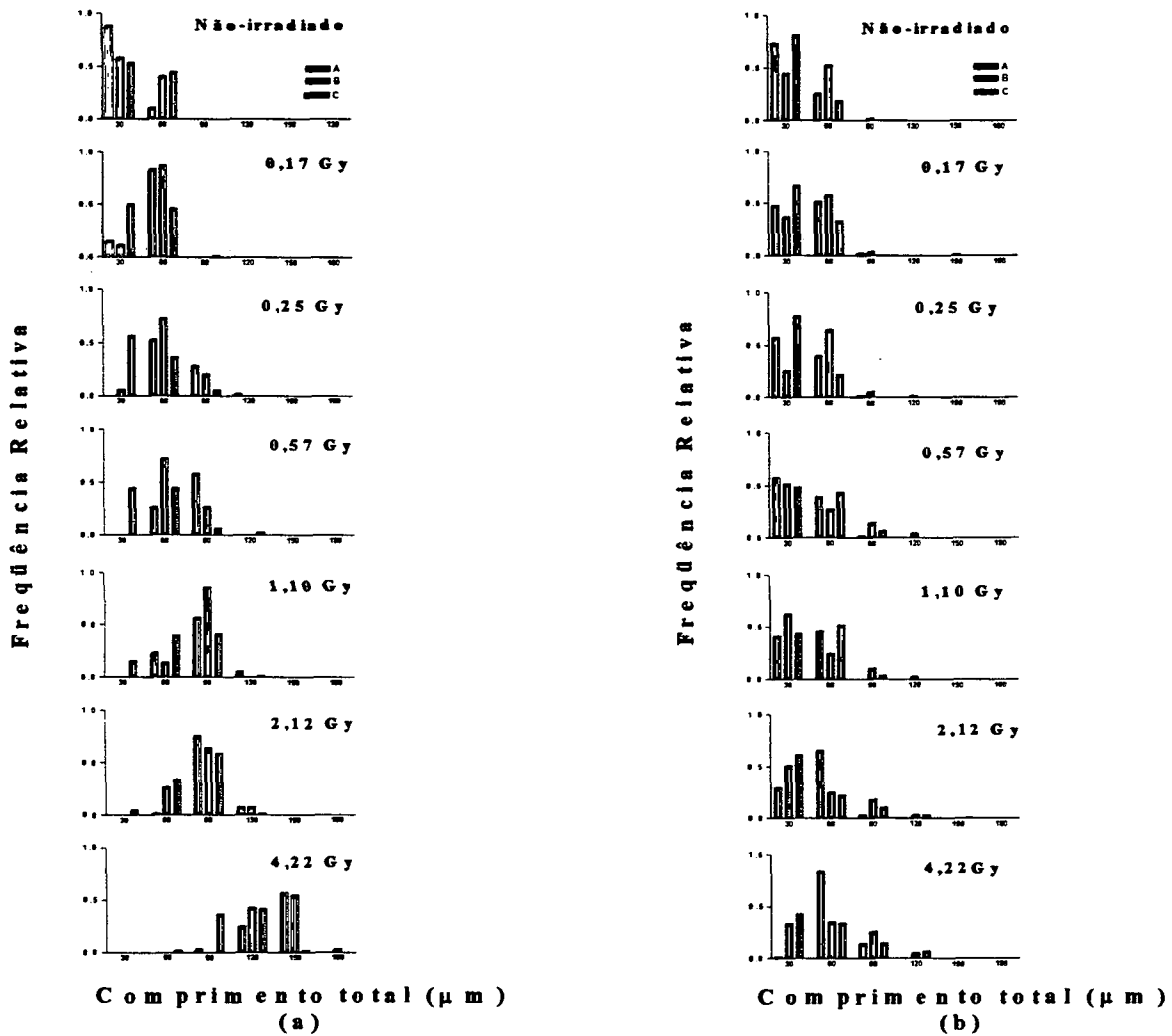


Figura 2. Histograma de distribuição de cometas em função da dose de radiação em amostras processadas 1 (a) e 24 horas (b) após as exposições nos 3 doadores.

A radiosensibilidade celular representa um papel relevante não somente na determinação do risco genético mas também na terapia de tumores [6]. O teste do cometa revela que, pelo menos neste caso, a radiosensibilidade celular depende, dentre outros fatores, da quantidade de dano inicial e da capacidade de reparo das células.

A Figura 2 mostra os histogramas da distribuição de cometas com diferentes graus de dano no DNA, 1 e 24 horas após as exposições.

As amostras não irradiadas são caracterizadas pela presença de 2 subpopulações distintas, compostas de cometas com 30 e 60 μm de comprimento, sendo esta última resultante, provavelmente, da ação de genotóxicos endógenos provenientes do próprio metabolismo celular.

Em amostras de 1 hora (Figura 2a) há uma tendência ao deslocamento de cometas para a direita da abscissa com o aumento da dose, além do aparecimento de subpopulações de linfócitos com respostas diferentes, isto é, células resistentes e sensíveis à radiação ionizante.

Em amostras de 24 horas (Figura 2b), ocorre uma redução do comprimento do cometa em todas as doses analisadas, com predominância de cometas medindo 30 e 60 μm . A persistência de subpopulações celulares mais danificadas sugere um mecanismo de reparo mais lento, pouco eficiente ou mesmo inoperante [7].

O teste do cometa permite avaliar, além do dano e reparo no DNA em nível de célula individual, identificar subpopulações de células resistentes ou sensíveis ao tratamento, não possibilitando, porém, a detecção do tipo de reparo envolvido no DNA [6].

Os tipos de danos analisados pelo teste do cometa não tem sido inteiramente elucidados. Porém sabe-se que o valor do pH da solução de lise representa um dos fatores fundamentais: sob condições neutras, as quebras nas fitas duplas desempenham um papel predominante. Em condições alcalinas, situação adotada no presente trabalho, as quebras nas fitas simples e os sítios álcali lábeis provavelmente contribuem como principais lesões no DNA [8].

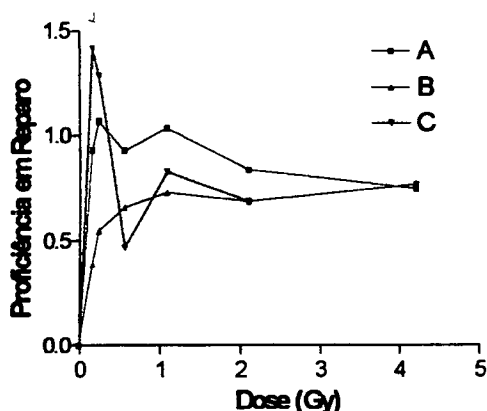


Figura 3. Perfis de proficiências em reparo celular obtidos de linfócitos periféricos irradiados *in vitro* de 3 doadores.

A Figura 3 apresenta o perfil da proficiência de reparo celular obtido dos 3 doadores estudados e mostra que eles diferem entre si: o doador A apresenta um reparo mais eficiente em todas as doses em relação ao doador B e o doador C um mecanismo mais eficiente nas doses baixas. Estas observações são compatíveis com os dados da Figura 1.

IV. CONCLUSÕES

A indução e o reparo de quebras nas fitas do DNA em linfócitos sanguíneos de 3 doadores sadios foram analisados e comparados após a exposição *in vitro* com várias doses de radiação gama de ^{60}Co .

Os doadores apresentaram comportamentos análogos ao tratamento com radiação ionizante, porém a quantidade de dano induzido bem como a capacidade de reparo variaram de indivíduo para indivíduo. Estas observações indicam que a radiosensibilidade depende não somente da quantidade de dano inicial, mas também da capacidade de reparo das células.

O teste do cometa empregado mostrou ser uma ferramenta extremamente valiosa que permite quantificar as radiolesões induzidas no DNA e o reparo em nível de células individuais. Possibilita também identificar as subpopulações de células mais resistentes ou mais sensíveis aos agentes genotóxicos.

REFERÊNCIAS

- [1] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, **Biological Dosimetry : chromosomal aberration analysis for dose assessment**, IAEA, Vienna, 1986.
- [2] HSU, T. C., JOHNSTON, D. A., CHERRY, L.M., RAMKISSOON, D., SCHANTZ, S. P., JESSUP, J. M., WINN, R. J., SHIRLEY, L., AND FURLONG, C., **Sensitivity to genotoxic effects of bleomycin in humans : possible relationship to environmental carcinogenesis**, *Int. J. Cancer*, vol. 43, p 403-409, 1989.
- [3] ÖSTLING, O. AND JOHANSON, K. J., **Microelectrophoresis study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 123, p 291-298, 1984.
- [4] SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. AND SCHNEIDER, E. L., **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**, *Exp. Cell Res.*, vol. 175, p 184-191, 1988.
- [5] MALCOLMSON, A. M., DAVIES, G., HANSON, J. A., DEELEY, J. O. T., GAFFNEY, C. C., MCGREGAOR, A. D. AND KERBY, I. J., **Determination of radiation-induced damage in lymphocytes using the micronucleus**

and microgel electrophoresis "Comet" assay, *Eur. J. Cancer*, vol. 31A, p 2320-2323, 1995.

[6] MÜLLER, W. -U., BAUCH, T., STREFFER, C., NIEDEREICHHOLZ, F. AND BÖCKER, W., **Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines**, *Int. J. Radiat. Res.*, vol. 65, p 315-319, 1994.

[7] OLIVE, P. L., BANÁTH, J. P. AND DURAND, R. E., **Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay**, *Radiat. Res.*, vol 122, p 86-94, 1990.

[8] FAIRBAIRN, D., OLIVE, P. L. AND O'NEILL, K. L., **The comet assay: a comprehensive review**, *Mutat. Res.*, vol. 339, p 37-59, 1995.

ABSTRACT

The comet assay, also called single cell gel electrophoresis technique, permits to evaluate quantitatively DNA breakage induced by chemical and physical agents at the level of the single cell. The present paper refers to the construction of dose-response curves to DNA damage and repair studies in human peripheral lymphocytes, utilizing the comet assay for the radiosensitivity analysis. So, the blood samples were obtained from healthy donors (40-50 year old), irradiated in a ^{60}Co source (GAMMACEL 220) with doses of 0.17, 0.25, 0.57, 1.10, 2.12 and 4.22 Gy (0.591 Gy/min.) and processed 1 and 24 hours after the exposition. Results obtained showed a increase in the total length of comet (DNA migration) as a function of radiation dose in samples processed 1 and 24 hours after the treatment. The DNA lesion in irradiated lymphocytes with 4.22 Gy (means value of 101.4 μm) were 3.4 times higher than in the untreated lymphocytes (mean value of 30 μm) instead of 24 hours after the irradiation were 1.5 times higher (mean value of 46.3 μm). This reduction on DNA migration observed suggest a possible DNA repair occurred in these cells. It was also possible visualized the presence of subpopulations of the cells with different sensitivity and repair capacity to ionizing radiation in these donors.