

**RADIORRESISTÊNCIA DE CÉLULAS DE CAMUNDONGOS IMOBILIZADAS
POR ADESAO A LAMINULAS DE VIDRO**

Ivany Rodrigues de Moraes
Nélida Lucia del Mastro
Coordenadoria de Aplicações na Engenharia e Indústria
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IPEN/CNEN-SP

RESUMO

Foram implantadas laminulas de vidro no tecido subcutâneo de camundongos C57Bl/56, submetidos posteriormente a 4,0Gy de ⁶⁰Co. As laminulas foram retiradas 1,3,7 e 14 dias pós implante e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina. A contagem de macrófagos e células gigantes bem como a análise das modificações encontradas permitem concluir que houve diferenças significativas em função do tempo após implante, mas não como consequência da irradiação.

INTRODUÇÃO

Os biomateriais em desenvolvimento para implantes requerem uma avaliação do ponto de vista das características mecânicas, elasticidade, integração, toxicidade, recobrimento tissular, biodegradação, efeitos sistêmicos e inflamação. As células do sistema fagocítico mononuclear estão ativamente envolvidas nos mecanismos de defesa dos mamíferos, participando dos processos de inflamação, reparo tissular e imunidade. A resposta destas células, quando em contato com o material em estudo, determina as características em relação a biocompatibilidade e biodegradação.

A capacidade de um animal de responder imunologicamente a substâncias estranhas depende do desenvolvimento de uma série de funções discriminatórias que tornam possível a identificação, a fagocitose e o seu processamento pelas células do sistema linfocitário que são responsáveis pela produção de anticorpos e reações específicas mediadas por células (Morris & Simpson Morgan, 1985). As células do sistema fagocítico mononuclear estão ativamente envolvidas nos mecanismos de defesa do homem, sendo altamente especializadas nas funções de endocitose e digestão intracelular. Esse sistema está composto pelos promonócitos da medula óssea, os monócitos e neutrófilos sanguíneos e os macrófagos tissulares. Os monócitos sanguíneos, bem como os macrófagos tissulares, tem origem, morfologia básica e características funcionais semelhantes, razão pela qual são agrupados em um único sistema.

Os macrófagos participam nos processos de inflamação, reparo tissular e imunidade através das propriedades que os caracterizam. Os macrófagos liberam enzimas lisossomais como resultado da fagocitose de materiais tais como zymosan, partículas de latex, hemácias opsonizadas, complexos antígeno-anticorpo, bactérias e paredes celulares ou como resultado da interação com produtos liberados pelos linfócitos (Unanue, 1976).

Doses subletais de radiação gama em mamíferos são reconhecidamente imunodepressoras, fato este que pode ser de grande utilidade na prevenção de rejeição a transplantes, sendo também capazes de inibir a ação de estímulos imunológicos (Kovarova et al, 1987).

O presente trabalho foi realizado com o intuito de estabelecer a radiosensibilidade in vivo de células inflamatórias mononucleares ou multinucleares de camundongos radiosensíveis (del Mastro, 1986), quando aderidas a laminulas de vidro.

Uma quantidade razoável de dados existem sobre as mudanças quantitativas, funcionais e morfológicas em macrófagos colhidos em vários períodos após irradiação in vivo (Gallin et al, 1984). Entretanto, não existe informação em relação aos efeitos da radiação sobre células imobilizadas in vivo, onde a possibilidade de células radiosensíveis afetarem secundariamente outras células não possa ser controlada ou eliminada.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Camundongos da linhagem C57Bl/56, fêmeas, idade aproximada de 45 dias, peso médio de 14,71 gramas, procedentes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas III-USP. Foram separados em quatro grupos: testemunhas e quatro grupos irradiados, composto cada grupo por 4 ou 5 animais.

Métodos:

1. Implante de laminulas. Os macrófagos são células facilmente observáveis através da técnica de implante cirúrgico de laminulas no tecido subcutâneo de camundongos. Nesta técnica descrita por Ryan et Spector (1970), os macrófagos se aderem na superfície das laminulas inseridas nos flancos dos camundongos, duas por animal, e após a sua retirada segundo tempos determinados, estas laminulas são coradas pela técnica da Hematoxilina-eosina (H-E) e observadas ao microscópio óptico.

2. Condições de irradiação. Vinte camundongos foram irradiados numa fonte de Co-60 gammacell 220, Atomic Energy of Canada Ltd, recebendo uma dose subletal de 4,0Gy, de corpo inteiro (taxa de dose 4Gy/min), dentro de um recipiente cilíndrico de plástico de (10 x 18)cm, 1 dia após o implante.

3. Procedimentos Experimentais. Os animais após terem sido irradiados ficaram em caixas próprias de biotério, em grupo de 5 camundongos cada, recebendo água e ração usual "ad libitum". Não houve nenhuma

diferença de manejo entre os grupos testemunhas e irradiados. Os animais foram sacrificados com éter sulfúrico e submetidos à sangria, nos tempos 1º dia, 3º dia, 7º dia e 14º dia após implante. As laminulas foram retiradas com uma pinça de ponta parafinada, lavadas em PSB gelado e PSB-tripsina a 0,25% para retirada da fibrina e coradas pela técnica de H-E.

4. Estatística. Foram utilizadas análise de variância com dois critérios de classificação (Tratamento e Tempo), por método não paramétrico. Quando as interações foram significativas (caso dos macrófagos) realizou-se comparações múltiplas, segundo o Método de Dunn. Cada ponto representa a média da leitura de 8 a 10 laminulas.

RESULTADOS

Utilizando o método estatístico de comparações múltiplas de Dunn em relação aos macrófagos, não houve diferenças significativas para as testemunhas nos tempos 1º, 3º, 7º e 14º dia, mas houve diferença entre os grupos irradiados no 1º e 7º dia pós-implante (fig. 1).

Quanto às células gigantes, em todos os tempos, os grupos testemunhas foram iguais aos irradiados, porém, houve diferença entre os tempos 1º, 3º e 14º dia. O que significa que a dose de 4,0Gy usada neste trabalho, não causou alterações quantitativas das células estudadas (fig. 2).

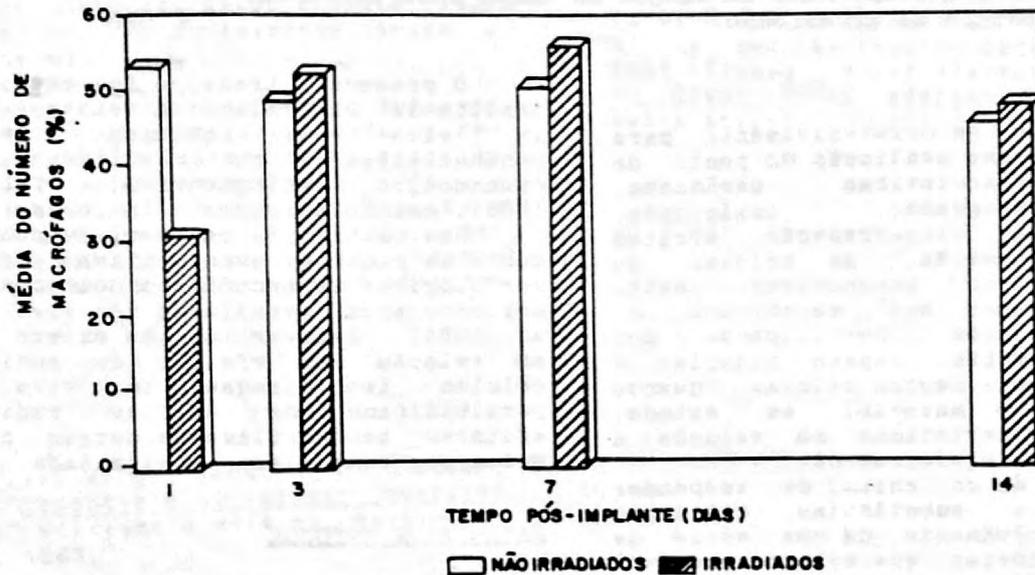


FIG. 1 — QUANTIDADE DE MACRÓFAGOS DOS GRUPOS TESTEMUNHAS E IRRADIADOS NOS TEMPOS 1º, 3º, 7º e 14º DIAS PÓS-IMPLANTE.

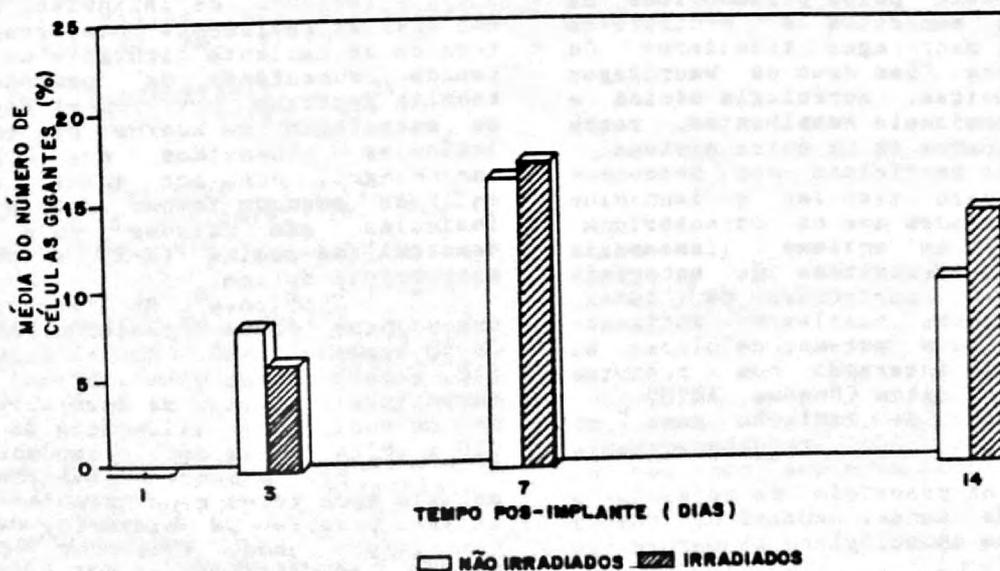


FIG. 2 — QUANTIDADE DE CÉLULAS GIGANTES DOS GRUPOS TESTEMUNHAS E IRRADIADOS NOS DIAS 1º, 3º, 7º e 14º

Ao microscópio óptico, foi feita uma análise das modificações morfológicas dos macrófagos e células gigantes. Observou-se para o 19 dia (figs. 3 e 4) nas testemunhas e irradiados, um aumento da população de macrófagos característicos, com núcleos arredondados, às vezes em forma de rim, cromatina frouxa, nucléolo bastante evidente, células polimorfonucleares, neutrófilos típicos e também células binucleadas. Raras células gigantes.

No 30 dia (figs. 5 e 6) nos não irradiados e irradiados, observou-se uma diminuição de neutrófilos e macrófagos com características descritas para o 19 dia; presença de células gigantes inflamatórias tipo Langhans e corpo estranho e considerável variação no tamanho do núcleo das células gigantes.

No 70 dia pós-implante (figs. 7 e 8), ambos os grupos eram constituídos fundamentalmente por macrófagos, alguns com células arredondadas, outros alongadas, núcleos característicos e grande número de células gigantes inflamatórias.

Por outro lado, no 142 dia pós-implante, em ambos os grupos havia grande quantidade de células tipo Langhans e corpo estranho, com quantidade de núcleos variável. Não houve polimorfonucleares e os macrófagos tinham as características descritas para os dias anteriores (figs. 9 e 10). Não foram encontradas diferenças nas alterações morfológicas pós-implante entre os grupos testemunhas e irradiados para a dose aplicada.

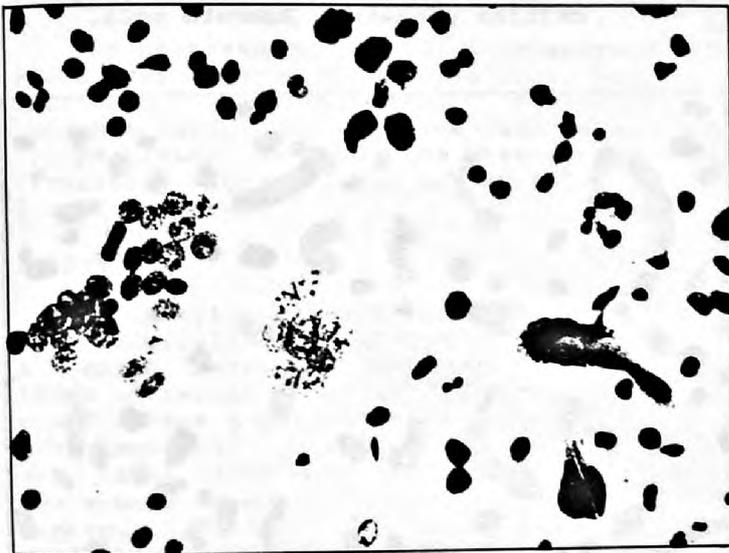


Fig. 3 - Grupo testemunha 19 dia. Macrófagos e raras células gigantes. Aumento 660X.



Fig. 4 - Grupo irradiado 19 dia. Macrófagos e raras células gigantes. Aumento 660X.

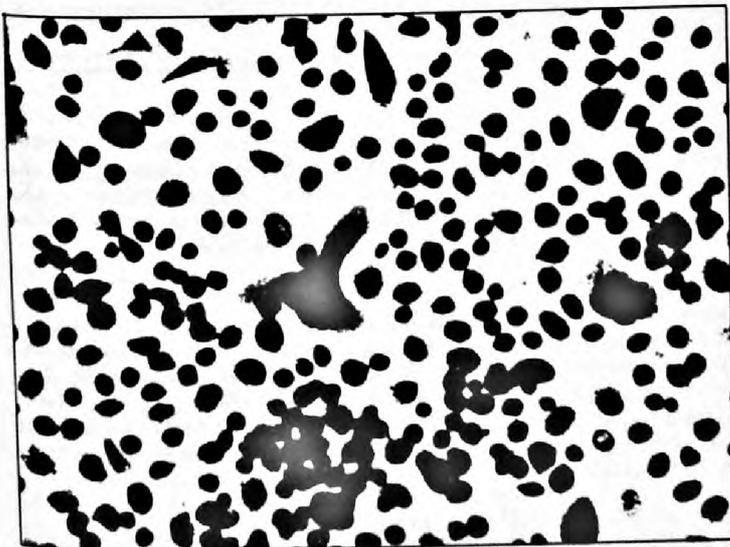


Fig. 5 - Grupo testemunha 30 dia. Macrófagos e células gigantes. Aumento 660X.

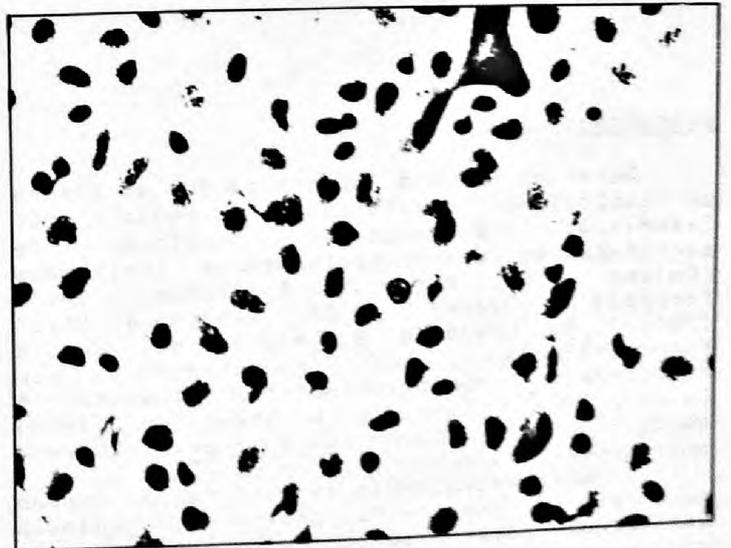


Fig. 6 - Grupo irradiado 30 dia. Macrófagos e células gigantes. Aumento 660X.

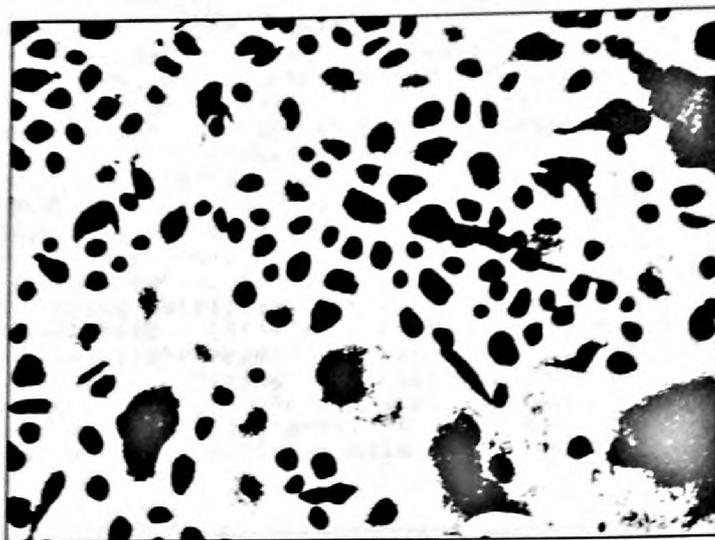


Fig. 7 - Grupo testemunha 70 dia. Macrófagos e células gigantes. Aumento 660X.

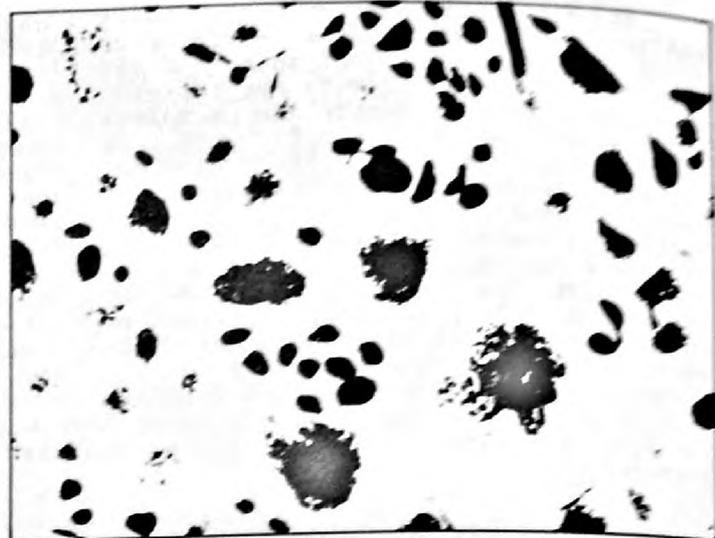


Fig. 8 - Grupo Irradiado 70 dia. Macrófagos e células gigantes. Aumento 660X.

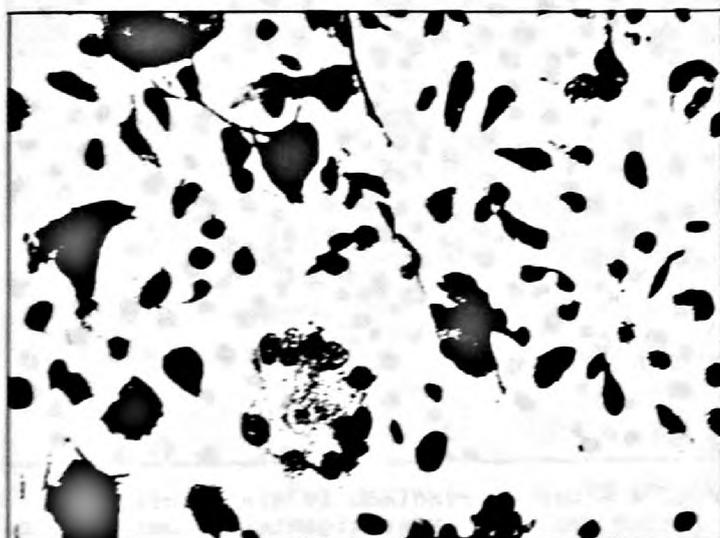


Fig. 9 - Grupo testemunha 140 dia. Macrófagos e células gigantes. Aumento 660X



Fig. 10 - Grupo Irradiado 140 dia. Macrófagos e células gigantes. Aumento 660X.

DISCUSSÃO

Diversos estudos mostraram que o número de linfócitos peritoneais se reduz após irradiação, enquanto a população de macrófagos se mantém praticamente inalterada (Baluer, 1983; Bercovici & Graham, 1964; Korufeld & Greeman, 1986; Tokita & Raju, 1984). Em relação à viabilidade e à funcionalidade, os macrófagos são considerados radiorresistentes (Swartz & Saluk, 1981; Kornfeld & Greemann, 1966) sendo, entretanto, seus precursores, radiosensíveis.

A radiorresistência de macrófagos também se reflete na habilidade de animais irradiados eliminarem bactérias, já que os níveis de enzimas lisossomais permanecem após irradiação (Gallin et al, 1984).

Segundo Gallin et al, 1984, a radiação de ^{60}Co em doses de 7,5 a 20Gy produziu decréscimo na porcentagem de células fagocitadas e reduziu o índice de fagocitose

por macrófagos de camundongo no 60 e 12 dia pós-irradiação in vitro. Somente um pequeno decréscimo no índice de fagocitose nas culturas irradiadas foi notado no 32 dia pós-irradiação (Gallin et al, 1984).

Por outro lado, macrófagos de diferentes espécies de mamíferos apresentam, aparentemente, sensibilidade diversa frente à radiação: os de cobaia seriam, por exemplo, mais sensíveis do que aqueles de rato ou camundongos (Krystev et al, 1986). Este fato lembra a necessidade de evitar extrapolações diretas a partir de um determinado sistema biológico.

As células gigantes são formadas in vivo pela fusão de populações de macrófagos velhos e novos, essa formação depende portanto da taxa de renovação dos macrófagos (Birnan & Mariano, 1985). Por outro lado, a taxa de migração à lamínula implantada vai depender da natureza da reação inflamatória produzida no tecido conectivo que rodeia a lamínula.

Os presentes resultados mostram que as células gigantes foram formadas no tempo previsível ou seja, presença marcante ao redor do 4º dia após o implante. Elas cresceram pela adição de macrófagos novos recém chegados e muito provavelmente, evoluíram de corpo estranho para tipo Langhans em 7 a 10 dias, conforme descrito anteriormente por outros autores (Mariano & Spector, 1974). Nas condições ensaiadas a radiação não afetou a taxa de reciclagem dessas células na cápsula conectiva ao redor do vidro, pois não houve modificação na cinética de formação de células gigantes na superfície do vidro.

As modificações estruturais encontradas permitem concluir que houve diferenças significativas nos macrófagos e células gigantes em função do tempo após implante, mas não como consequência da irradiação, evidenciando a extrema radiorresistência dessas células, mesmo provenientes de uma cepa radiosensível de camundongo.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem a colaboração dos Profs. Drs. Mario Mariano e Lucia Singer do Instituto de Ciências Biomédicas-USP; Benjamin Eurico Malucelli e José Luis Guerra da Faculdade de Medicina Veterinária USP, farmacêutica Srta. Tânia Aguiar e Técnico Sr. Divaldo de Souza.

SUMMARY

Phagocytic leukocytes are involved in biocompatibility and biodegradation processes at which materials utilized in different types of implants are submitted. In this work round shape glass coverslips were implanted subcutaneously in 45-day-old C57B1J 8 mice and later irradiated with a ⁶⁰Co sublethal whole-body dose of 4.0Gy. Coverslips were removed 1, 3, 7 and 14 days post-implant and dyed by the hematoxylin-eosin technique. Macrophage and giant cell estimations were done in a microscope by means of an integrator eyepiece. The modifications found permit to conclude that they to exist significant differences in macrophages as a function of time after implant but not as a consequence of irradiation.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Balner, H. Identification of peritoneal macrophages in mouse radiation chimera. Transplantation, 1:217-223, 1963.
2. Bercovici, B., Graham, RM. The immediate effects of local radiation on the cells in the peritoneal cavity of mice. Radiat. Res., 7:129-138, 1964
3. Birman, E.G. & Mariano, M. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. Brazilian J. Med. Biol. Res., 18:507-512, 1985.
4. del Mastro, N.L. Different radiomodifier capacity of an inflammatory agent in two mice strains. Laboratory Animal Science: Regional/International Meeting. Aguas de Lindoia, SP, novembro 1986.
5. Gallin, E.K.; Green S.W.; Darden, J. Defective Fc-mediated phagocytosis in gamma-irradiated mouse peritoneal macrophages. Int. J. Radiat. Biol., 45(5):459-467, 1984.
6. Kornfeld L. & Greenman, V. Effects of total-body X-irradiation on peritoneal cells of mice. Radiat. Res., 29:433-444, 1968.
7. Kovarova, H.; Macela, A.; Stulik, J.; Propper, P.; Ledvina, M. The role of

- phagocytes and specific antibodies in gamma irradiated mice infected by intracellular bacterial pathogen. Studia Biophysica 121(3):177-182, 1987.
8. Krystev, Kh.; Najdenski, Kh.M.; Velyanov, D.K.; Radoevska, S.A. Electron-microscopic studies of alveolar macrophages from gamma-ray irradiated guinea pigs. C.R.Acad.Bulg.Sci. 41(8):141-144, 1988.
 9. Mariano, M. & Spector, W.G. The formation and properties of macrophage polykarions (inflammatory giant cells). J. Pathol. 113:1-19, 1974.
 10. Morris, B. & Simpson-Morgan, M.W. The development of Immunological Reactivity in Fetal Lambs. Annals of the New York Academic of Sciences. 459:1-13, 1985.
 11. RYAN, G.B. & Spector, W.G. Macrophage turnover in inflamed connective tissues. Proceedings of the Royal Society of London (B). 175:269-292, 1970.
 12. Swartz, R.P. & Saluk, P.H. Functional Modifications of Macrophage Activity after Sublethal Whole-Body Irradiation (41118). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 167:20-24, 1981.
 13. Tokita, N. & Raju, M.R. Flow Cytometric Quantification of Radiation Responses of Murine Peritoneal Cells. In: W.G. Eisert & M.L. Mendelsohn. Biological Dosimetry Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1984.
 14. Unanue, E. R. Secretary Function of Mononuclear Phagocytes. Am. J. Pathology. 83:395-417, 1976.