

Verificação experimental para confirmação de técnica *in vitro* do efeito *bystander* induzido por radiação gama na linhagem celular CHO-K1

P. H. L. Viana^{1,2}; A. M. Góes¹; D. A. Gomes¹; S. E. Grynberg²

¹ Departamento Bioquímica e Imunologia/Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brasil

² Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 30161-970, Belo Horizonte-MG, Brasil

pedroleybio@hotmail.com;seg@cdtn.br

(Recebido em 29 de março de 2013; aceito em 15 de julho de 2013)

O efeito *bystander* diz respeito a respostas biológicas detectadas em células não diretamente irradiadas, mas que são influenciadas, de alguma forma, por sinais transmitidos por células irradiadas vizinhas. Essas respostas biológicas incluem trocas entre cromátides irmãs, mutações, formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas, carcinogêneses, além de morte por apoptose e necrose. Apesar de sua existência ser indiscutível, os mecanismos envolvidos no desencadeamento do efeito *bystander* ainda não foram completamente esclarecidos. Estudos anteriores comprovam que este efeito é dependente de uma grande variedade de parâmetros incluindo a dose, a taxa de dose, o tipo de radiação e tipo de célula ou tecido. O presente trabalho visa confirmar a técnica anteriormente utilizada na literatura em linhagens celulares humanas para a verificação do efeito *bystander*. Os resultados sugerem que as condições de trabalho adotadas pelo grupo apresentam eficiência técnica e possibilitam a verificação da ocorrência do efeito *bystander*.

Palavras-chave: Efeito *bystander*, radiações ionizantes, radiobiologia.

Experimental verification for *in vitro* technique confirmation of bystander effect induced by gamma radiation in CHO-K1 cell line.

The bystander effect refers to biological responses detected in cells not directly irradiated but influenced, somehow, by signals transmitted from neighboring irradiated cells. These biological responses include sister chromatid exchange, mutations, micronucleus formation, chromosomal aberrations, carcinogenesis, apoptosis and necrosis. Although its existence is unquestionable, the mechanisms involved on triggering the bystander effect are not yet completely elucidated. Previous studies have shown that the bystander effect depends on a large variety of parameters including the radiation dose, the dose rate, the type of radiation and type of cells or tissue. This study aims to confirm the technique previously used in the literature in human cell lines for the bystander effect verification. The results suggest that the working conditions adopted by the group show technical efficiency and enables the reproduction of the bystander effect.

Keywords: *Bystander* effects, ionizing radiation, radiobiology.

1. INTRODUÇÃO

Em 1992, Nagasawa e Little sugeriram após experimentos em células de ovário de hamsters irradiados com partículas alfa que danos genéticos podem ser induzidos por baixas doses de radiação (entre 1 cGy e 5 Gy) sobre núcleos de células que não foram atravessadas por essas partículas. Esses achados sugerem a produção de um fator por parte das células irradiadas¹. Este fator provocou aumento dos níveis de morte celular por apoptose e necrose, além de reduzir a eficiência de clonagem e a indução de proteínas envolvidas no controle de morte celular que nunca estiveram expostas à radiação². Estas respostas biológicas foram então chamadas de “efeitos *bystander*” e ainda incluem trocas entre cromátides irmãs, mutações, formação de micronúcleos, instabilidade e aberrações cromossômicas e carcinogênese^{1, 3, 4, 5, 6}.

Mothersill e Seymour definiram o efeito *bystander* como uma resposta detectada em células não diretamente irradiadas, mas influenciadas, de alguma forma, pela mensagem transmitida por

células irradiadas ⁷. Esse mecanismo pode-se apresentar de duas formas: a primeira, conhecida como ICCM (do inglês *Irradiated Cells Conditioned Medium*), diz respeito à transferência de meio proveniente de culturas celulares que foram irradiadas para outras culturas que não foram expostas à radiação. Após a irradiação, as células e o meio ficam em contato por um tempo T1 (conhecido como tempo de pós-irradiação) e após esse período, é realizada a transferência de meio irradiado para uma cultura não irradiada. Após um tempo T2 conhecido como tempo de resgate, a cultura não irradiada é então analisada. Esse tipo de experimento utiliza radiações de baixo LET (do inglês *Linear Energy Transfer*), obtidos a partir de raios X ou gama; a segunda forma refere-se ao uso de micro feixes de partículas alfa (alto LET) que permitem a irradiação precisa da célula em questão. 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 não irradiadas ⁸.

Em experimentos *in vitro*, a transmissão do sinal *bystander* pode ocorrer por duas vias distintas nas quais se considera a possibilidade de dano tanto em células próximas quanto em células mais distantes. São elas: as junções gap, ou *gap junctions*, que ocorrem apenas com o contato célula-célula para a transmissão do fator, não sendo, porém um mecanismo essencial, mas auxiliar ²; e também por meio condicionado de células irradiadas (ICCM), em que moléculas sinalizadoras são secretadas no meio de cultura a partir de células expostas à radiação e posteriormente recebidas e identificadas por células *bystander* que não sofreram a irradiação ^{7, 9, 10}.

Experimentos *in vitro* demonstram que as células *bystander* não necessitam estar presentes no momento da exposição à radiação para serem afetadas e evidenciam a produção de um fator que não requer a transferência pelo contato célula-célula mediada por *gap-junctions* ⁹.

Apesar dos mecanismos responsáveis pelo desencadeamento do efeito *bystander* serem indiscutíveis ^{6, 11}, vários experimentos indicam a sua dependência de parâmetros tais como a dose, a taxa de dose, o tipo de radiação e tipo de célula ou tecido ¹².

Experimentos realizados recentemente com a técnica de citometria de fluxo em linhagens celulares de câncer de mama MACL-1 e MGSO-3 estabelecidas por Correa *et al.* ¹³ e que nunca haviam sido submetidas a experimentos variando-se as doses de radiação gama, a densidade celular e o tempo em que células não irradiadas ficaram em contato com o meio irradiado, apontaram para a possibilidade da ocorrência do efeito *bystander* ¹⁴. Como essas linhagens demonstraram ser radioresistentes ¹³, o que minimiza a ocorrência do efeito *bystander*, fez-se necessário a realização de novos experimentos em outras culturas que possibilitassem a comprovação da eficiência da técnica de citometria de fluxo para avaliação da morte celular nessas culturas.

O presente trabalho tem como objetivo principal realizar experimentos para verificar se o efeito *bystander* ocorre em outra linhagem celular utilizando-se a mesma técnica de citometria de fluxo. A linhagem celular escolhida foi a CHO-K1, de ovário de hamsters chineses, submetida à radiação gama nas condições experimentais descritas no item 2.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

As medidas foram realizadas no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM), do Departamento de Bioquímica e Imunologia, que se encontra localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As irradiações foram realizadas com o aparelho de irradiação de telecobaltoterapia do Hospital Luxemburgo, em Belo Horizonte e no LIG (Laboratório de Irradiação Gama) do CDTN/CNEN.

Os experimentos foram planejados de modo a tentar confirmar os resultados do trabalho anterior ¹⁴ que utilizava linhagens celulares tumorais para a visualização experimental do efeito *bystander*. Para isso, foi utilizado como bibliografia base, o artigo de Nugent *et al.* ¹⁵

Para aumentar a eficiência da irradiação, as placas de cultura, utilizadas anteriormente, foram trocadas por garrafas de cultura. Essa troca reduz os espaços existentes entre os poços das placas de 48 poços.

a) **CULTURA CELULAR** – Foi utilizada a linhagem celular CHO-K1 proveniente de ovário de hamsters chineses. As células foram mantidas em garrafas de cultura celular T-75 (SARSTEDT®) e T-25 (SARSTEDT®) que continham meio de cultura Nutrient Mixture F12 (HAM) (SIGMA®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (INVITROGEN®), 200 mM de L-Glutamina (SIGMA®), e 1 U/mL de antibióticos penicilina/estreptomicina (INVITROGEN®). As culturas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C. Foram feitos repiques semanais e o meio de cultura foi substituído a cada dois ou três dias. A cada novo experimento, realizava-se a contagem celular após a tripsinização para determinar o número de células que seriam plaqueadas em cada garrafa de cultura. Os estoques celulares foram mantidos sob congelamento em nitrogênio líquido.

b) **TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM RADIAÇÃO** – O tratamento das células com radiação gama teve variação de dose entre 0,5 Gy a 5 Gy e foi realizado com fontes de ⁶⁰Co, provenientes do Hospital Luxemburgo e do Laboratório de Irradiação Gama (LIG), que se encontra no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). Após tripsinização e contagem, 5x10⁵ células foram semeadas em garrafas de cultura T-25 (SARSTEDT®) contendo 5 ml de meio de cultura. As garrafas foram transportadas até os locais da irradiação em caixas de isopor e mantidas logo após o tratamento em estufa úmida, contendo 5% CO₂ e a 37 °C. Após 1h do tratamento (T1), foi feita a troca do meio irradiado para as garrafas de cultura com células que não foram irradiadas. O meio irradiado ficou em contato com as células não irradiadas por um intervalo de tempo T2, que no caso deste experimento foi de 24 e 48 horas.

c) **CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR** – As garrafas foram incubadas em estufa úmida, 5% de CO₂ e 37 °C, de modo que as células não irradiadas permanecessem em contato com o meio de cultura de células irradiadas por tempos T2 de 24 e 48h. Para análise da morte celular, foi seguido o protocolo de iodeto de propídeo de Nicoletti e Riccardi ¹⁶. Após os tempos T2, retirou-se o meio das garrafas de cultura e adicionou-se 1 ml de solução de iodeto de propídeo (20 µg/mL). O meio de cultura era transferido para tubos cônicos de 15 ml e posteriormente centrifugados por 10 minutos a 1800 rpm. Em seguida, descartava-se o sobrenadante e fazia-se a homogeneização do pellet formado em 1 ml de solução de iodeto de propídeo. As garrafas contendo as células e os tubos cônicos de 15 ml foram incubados em geladeira a 4 °C por um período de 1 hora. Os níveis de DNA que quantificam a morte celular foram determinados usando o aparelho de Citometria de Fluxo Guava easy-Cyte (Millipore®). Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 6.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstrados abaixo nas figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 fazem referência a experimentos independentes realizados em triplicatas sob mesmas condições experimentais, o que permitiu a elaboração de 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. Os dados foram reunidos em gráficos e posteriormente transformados em porcentagem, considerando o grupo “controle” como 100% de células mortas, o que reduz a variabilidade dos diferentes experimentos.

Para demonstrar que os valores foram estatisticamente diferentes, utilizou-se a nomenclatura a seguir para expressar a distinção entre os valores estatísticos dos experimentos:

- *e # e + = diferença significativa ($0,01 \geq p \leq 0,05$)
- ** e ## = diferença muito significativa ($0,001 \geq p \leq 0,01$)
- *** e ### = diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$)

a) **EXPERIMENTOS REALIZADOS NO APARELHO DE TELECOBALTOTERAPIA** – Os experimentos a seguir foram feitos com 5x10⁵ células, usando doses de 0,5 Gy, 2 Gy e 5 Gy para T1=1h e T2=24h e 48h.

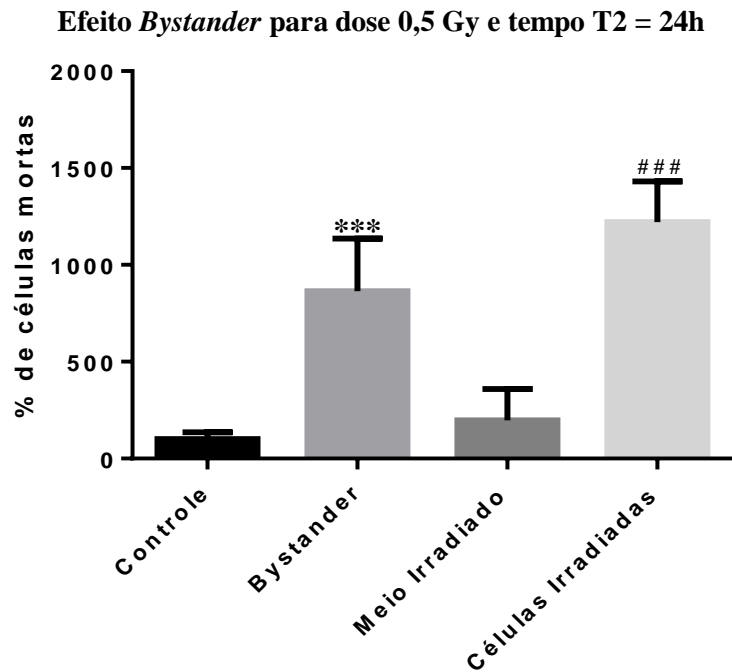


Figura 1: Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 0,5 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=24h. Os *** indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Bystander em relação ao grupo Controle. Os ### indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Células Irrradiadas em relação ao Controle e Meio Irradiado.

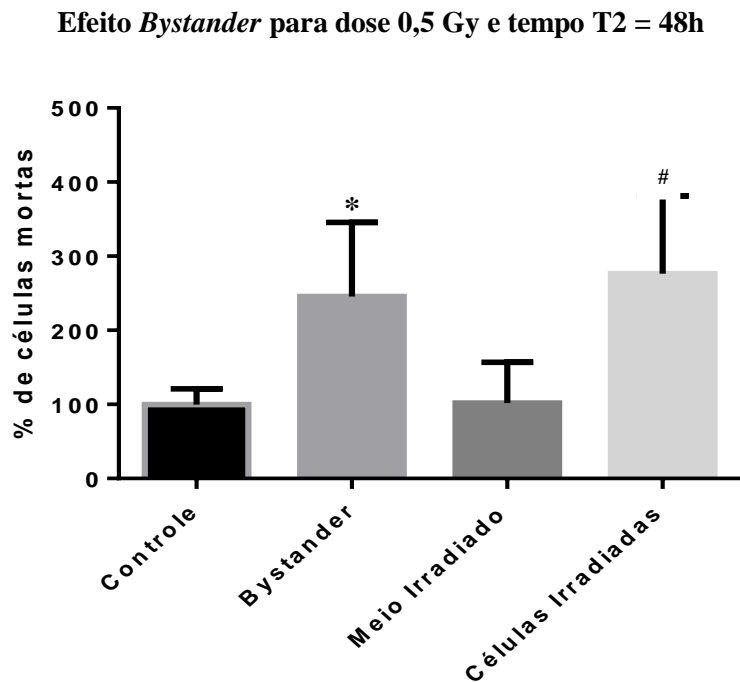


Figura 2: Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 0,5 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=48h. O * indica diferença significativa ($0,01 \geq p \geq 0,05$) do grupo Bystander em relação ao grupo Controle. O # indica diferença significativa ($0,01 \geq p \geq 0,05$) do grupo Células Irrradiadas em relação aos grupos Controle e Meio Irradiado.

Efeito *Bystander* para dose 2 Gy e tempo T2 = 24h

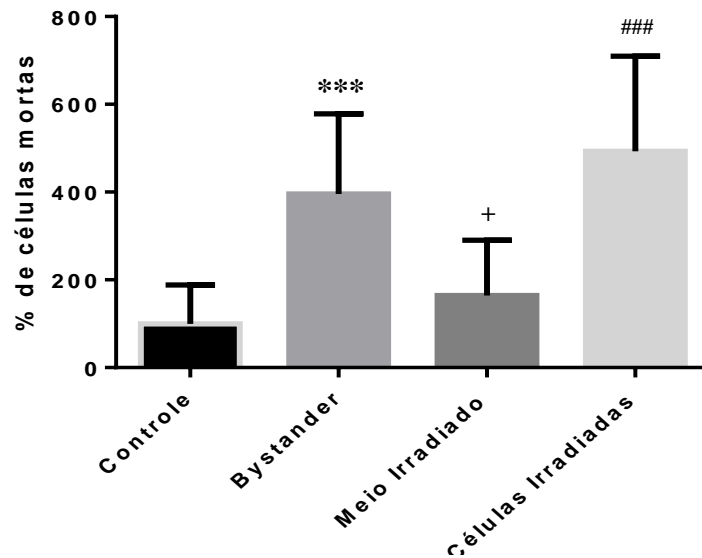


Figura 3. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 2 Gy, densidade 5×10^5 células. T1=1h e T2=24h. Os *** indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Bystander em relação ao grupo Controle. O + indica diferença significativa ($0,01 \geq p \leq 0,05$) do grupo Meio Irradiado em relação ao grupo Controle. Os ### indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Células Irrradiadas em relação aos grupos Controle e Meio irradiado.

Efeito *Bystander* para dose 2 Gy e tempo T2 = 48h

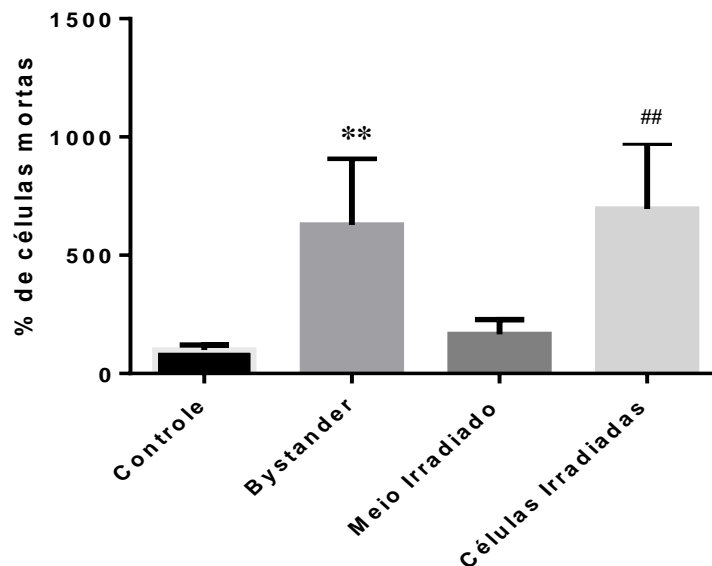


Figura 4. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 2 Gy, densidade 5×10^5 células. T1=1h e T2=48h. Os ** indicam diferença muito significativa ($0,001 \geq p \leq 0,01$) do grupo Bystander em relação ao grupo Controle. Os ## indicam diferença muito significativa ($0,001 \geq p \leq 0,01$) do grupo Células Irrradiadas em relação aos grupos Controle e Meio Irradiado.

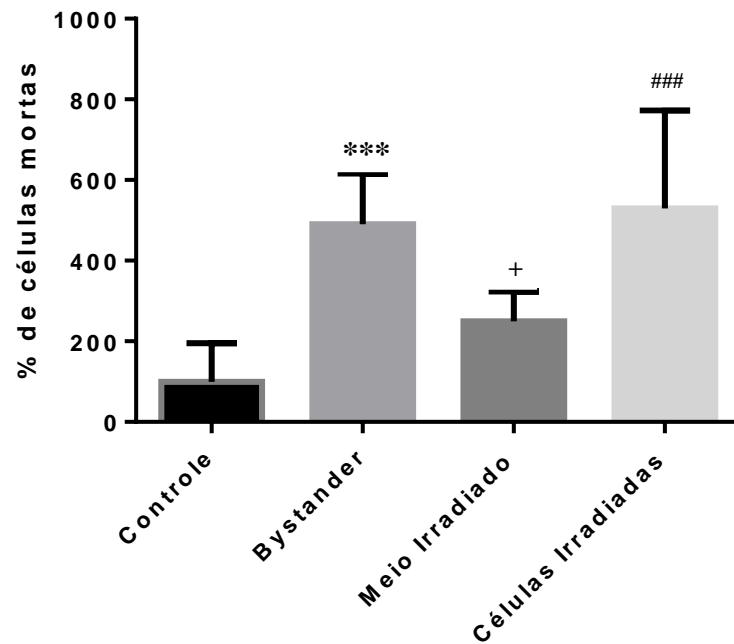
Efeito Bystander para dose 5 Gy e tempo T2 = 24h

Figura 5. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 5 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=24h. Os *** indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Bystander em relação ao grupo Controle. O + indica diferença significativa ($0,01 \geq p \geq 0,05$) do grupo Meio Irradiado em relação ao grupo Controle. Os ### indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Células Irrradiadas em relação aos grupos Controle e Meio irradiado.

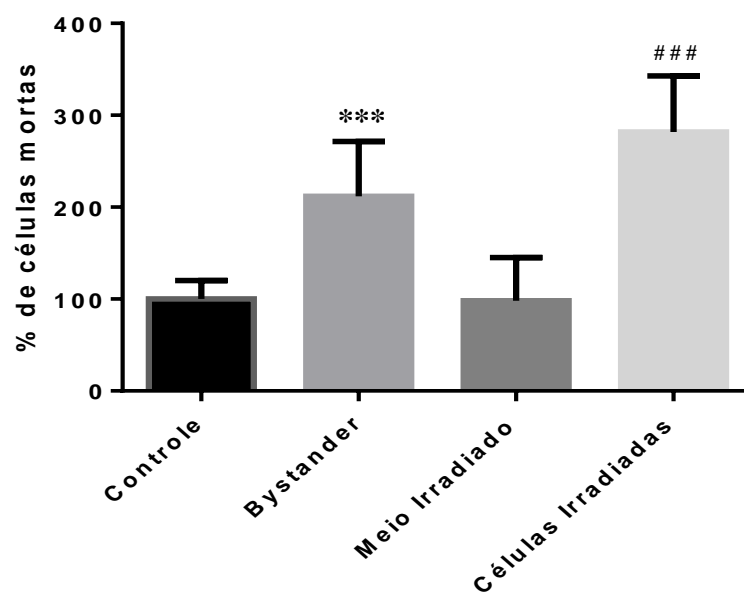
Efeito Bystander para dose 5 Gy e tempo T2 = 48h

Figura 6. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 5 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=48h. Os *** indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Bystander em relação ao grupo Controle. Os ### indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Células Irrradiadas em relação aos grupos Controle e Meio Irradiado.

Os resultados acima mostram a ocorrência do efeito *bystander* nas três doses de radiação utilizadas. Para doses mais baixas, de 0,5 Gy, o tempo T2 mais eficiente para a verificação do efeito foi de 24 horas. Isso sugere que ao se aumentar o tempo de contato entre as células não irradiadas com o meio irradiado para 48 horas, as células sobreviventes tiveram chance de se multiplicar (Figuras 1 e 2).

Observa-se que na Figura 4, mantendo-se T2 em 48 horas e aumentando-se a dose para 2 Gy, percebe-se um aumento significativo na magnitude do efeito *bystander*. Isto pode ser justificado pelo fato de que o aumento da dose implica no aumento do dano e consequentemente no aumento de sinais *bystander* no meio. O mesmo não pode ser dito sobre os resultados mostrados na Figura 6, onde era de se esperar um aumento significativo na morte pelo menos das células diretamente irradiadas dado o aumento da dose para 5 Gy. O fato das células CHO-K1 serem radioresistentes pode contribuir para o que foi observado [17]. Assim, doses baixas parecem afetar mais as células em um curto espaço de tempo.

Nas Figuras 3 e 5, apesar de ser possível observar diferenças extremamente significativas estatisticamente entre os grupos Controle e *Bystander*, houve também pequena diferença entre os grupos Controle e Meio Irradiado.

b) EXPERIMENTOS REALIZADOS NO LABORATÓRIO DE IRRADIAÇÃO GAMA (LIG) – Os experimentos a seguir foram feitos com 5×10^5 células, com a dose fixada em 2 Gy para T1=1h e T2=24 e 48h.

Efeito *Bystander* para dose 2 Gy e tempo T2 = 24h

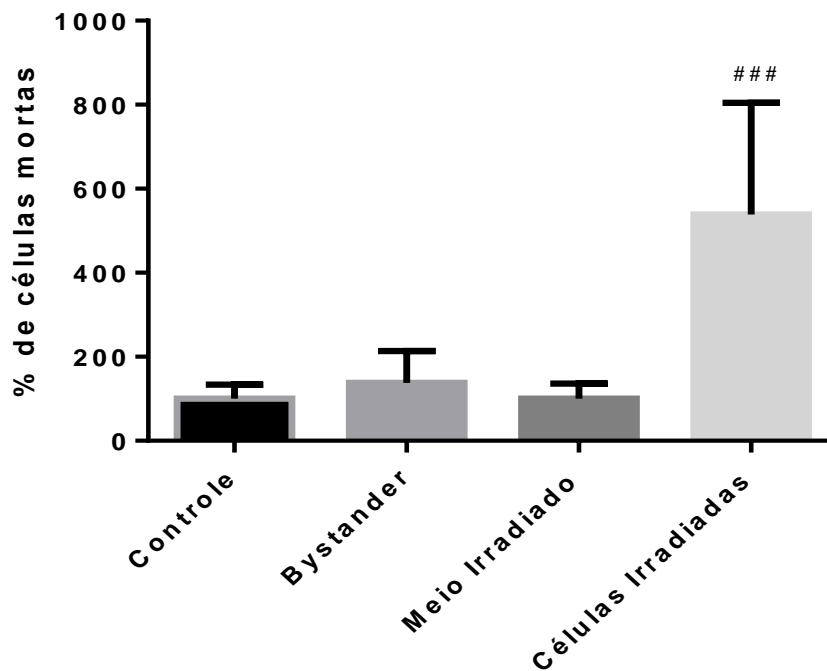


Figura 7. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 2 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=24h. Os ### indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Células Irradiadas em relação aos grupos Controle, Bystander e Meio Irradiado.

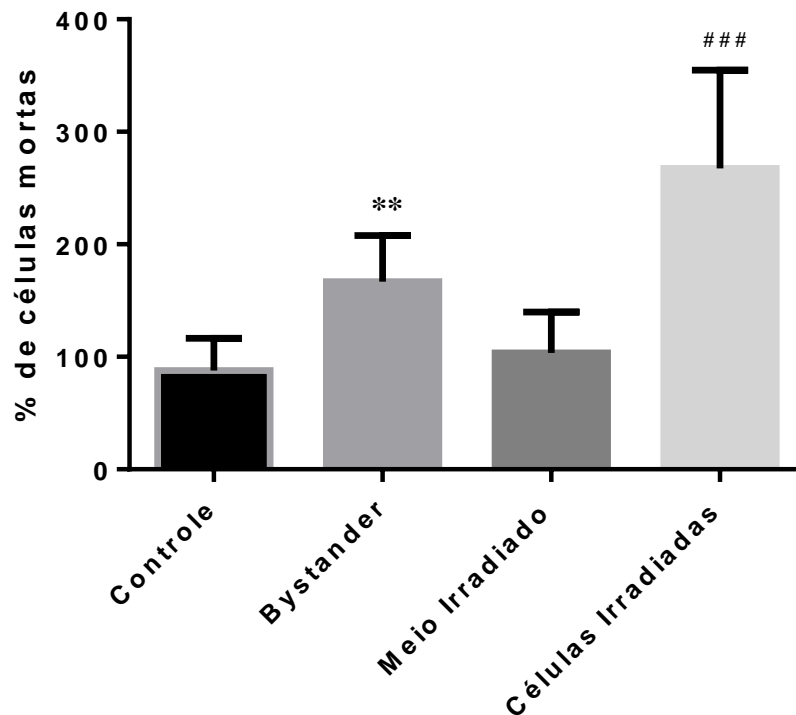
Efeito Bystander para dose 2 Gy e tempo T2 = 48h

Figura 8. Morte celular na linhagem CHO-K1, com doses de 2 Gy, densidade 5×10^5 células, T1=1h e T2=48h. Os ** indicam diferença muito significativa ($0,001 \geq p \leq 0,01$) entre o grupo Bystander e o grupo Controle. Os ### indicam diferença extremamente significativa ($p \leq 0,001$) do grupo Células Irrradiadas em relação aos grupos Controle e Meio Irradiado.

Os resultados das Figuras 7 e 8 são justificados da mesma forma que os resultados das Figuras 1 e 2. Vale destacar que as condições de irradiação no LIG não se mostraram ideais para este experimento devido à dificuldade de posicionamento das garrafas de culturas celulares no campo de radiação. Soma-se a isso a incerteza no valor da dose depositada devido aos altos valores de atividade da fonte de ^{60}Co deste laboratório.

No presente trabalho foram realizados experimentos para verificação da ocorrência do efeito *bystander* em outra linhagem celular, a CHO-K1, de ovário de hamsters chineses, utilizando-se a técnica de citometria de fluxo.

Os experimentos realizados com os parâmetros densidade celular de 5×10^5 células/garrafa, tempos de resgate T2=24h com dose de 0,5 Gy (Figura 1), T2=48h com dose de 2 Gy (Figura 4) e T2=48h com dose de 5 Gy (Figura 6) foram os que melhor apresentaram o efeito *bystander* para a linhagem utilizada.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a técnica utilizada é capaz de verificar o efeito *bystander*, segundo o artigo base adotado, o que pode confirmar e dar maior credibilidade para os resultados obtidos anteriormente com as linhagens celulares humanas de câncer de mama MACL-1 e MGSO-3.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro; ao físico-médico Humberto Galvão Dias e sua equipe do Hospital Luxemburgo; ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) e aos membros do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM).

1. NAGASAWA, H.; LITTLE, J. B. Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Research*, v. 52, p. 6394-6396, 1992.
2. MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. Radiation Induced Bystander Effects: Past History and Future Directions. *Radiation Research*, v. 155, p. 759-767, 2001.
3. AZZAM, E. I.; DE TOLEDO, S. M.; LITTLE, J. B. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.98, p. 473-478, 2001.
4. AZZAM, E. I.; DE TOLEDO, S. M.; SPITZ, D. R.; LITTLE, J. B. Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Research*, v. 62, p. 5436-5442, 2002.
5. BANERJEE, G.; GUPTA, N.; KAPOOR, A.; RAMAN, G. UV induced bystander signaling leading to apoptosis. *Cancer Research*, v. 223, p. 275-284, 2005.
6. MORGAN, W. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiation Research*, v. 159, p. 567-580, 2003.
7. MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. B. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *International Journal of Radiation Biology*, v. 71, p. 421-427, 1997.
8. HALL, E. J.; The Bystander Effect. *Health Physics*, v. 85, p. 31-35, 2003.
9. MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C. B. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiation Research*, v. 149, p. 256-262, 1998.
10. LYG, F. M.; SEYMOUR, C. B.; MOTHERSILL, C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. *British Journal of Cancer*, v. 83, p. 1223-1230, 2000.
11. D. J. Brenner, J. B. Little and R. K. Sachs, The bystander effect in radiation oncogenesis: II. A quantitative model. *Radiation Research*, v. 155, p. 402-408, 2001.
12. BLYTH, B. J.; SYKES, P. J. Radiation-Induced Bystander Effects: What Are They, and How Relevant Are They to Human Radiation Exposures? *Radiation Research*, v. 176, p. 139-157, 2011.
13. CORREA, C. R.; BERTOLLO, C. M.; GOES, A. M. Establishment and Characterization of MACL-1 and MGSO-3 cell lines derived from human primary breast cancer. *Oncology Research*, v. 17, p. 1-100, 2009.
14. SILVA da, R. G. Verificação do efeito bystander induzido por radiação gama em linhagens celulares humanas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais) – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear. Belo Horizonte, 2011.
15. NUGENT, S.; MOTHERSILL, C.; SEYMOUR, C.; MCCLEAN, B.; LYG, F.; MURPHY, J. Increased Mitochondrial Mass in Cells with Functionally Compromised Mitochondria after Exposure to both Direct Gamma Radiation and Bystander Factors. *Radiation Research*, v. 168, p. 134-142, 2007.
16. NICOLETTI, I.; RICCARDI, C. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, v. 1, n° 3, p. 1458-1461, 2006.
17. WADA, S.; KURAHAYASHI, H.; KOBAYASHI, Y.; FUNAYAMA, T.; YAMAMOTO, K.; NATSUHORI, M.; ITO, N. The relationship between cellular radiosensitivity and radiation-induced DNA damage measured by the comet assay. *J. Vet. Med. Sci.* v. 65, n° 4, p. 471-477, 2003.