

Identificação da proposta

Avaliação da concentração de íons metálicos em células tumorais humanas como medida de radio-sensibilidade

Programa 2 - APLICAÇÕES DAS RADIAÇÕES IONIZANTES

Atividade 230 - Fontes Radioativas e Aplicações das Radiações na Saúde

1. Qualificação do principal problema a ser abordado

O conteúdo celular é composto majoritariamente por moléculas orgânicas e água, mas contém também vários íons inorgânicos, sendo os principais os metálicos derivados dos elementos Ferro (Fe), Zinco (Zn), e Cobre (Cu). Estes íons metálicos são presentes nas células associados a metaloproteínas ou transportadores proteicos transmembrana. Nos organismos, suas quantidades possuem ordem de grandeza de miligramas, com exceção do ferro e do zinco, que podem ser encontrados em quantidades de até 5g (1).

Ferro e seus íons são essenciais nas células. Embora sua presença seja vital em processos de respiração e síntese de DNA (2,3), pode catalisar reações químicas formadoras de peróxidos, altamente lesivos aos ácidos nucleicos (4), além de desencadear toxicidade mediada por acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species, ROS*), por efeitos citocidas ou por quebras cromossômicas. Há um questionamento que se baseia no aumento da expressão do receptor de transferrina (TfR1) em células tumorais in vivo, denotando facilitação do transporte de transferrina ao meio intracelular e levando a aventar a hipótese de que células tumorais seriam mais ávidas por ferro e seus complexos proteicos (5). A quelação de íons de Ferro atua em moléculas vitais à proliferação (AKT, ERK, JNK, por exemplo), inibindo a divisão celular em tumores (6).

Zinco é o metal mais abundante nas células, com exceção ao ferro (2). Uma de suas principais funções é formar, junto ao cobre, o complexo superóxido-dismutase que reduz o estresse oxidativo que pode levar à toxicidade ou ao desenvolvimento carcinogênico. Também há uma série de proteínas associadas ao zinco com atividade de reparo de DNA (7), sendo, portanto, fisiologicamente complementares à atividade

do ferro em promover a síntese de DNA. Na fisiologia tumoral, a presença de zinco é importante como ativador de centros catalíticos das proteínas da superfamília metaloproteínas de matriz extracelular, o que pode levar à progressão metastática de e angiogênese em tumores (8). Seu transporte ao meio intracelular é mediado por transportadores da família ZIP, cuja expressão aumentada é encontrada em tumores de mama, fígado, cólon, próstata, pâncreas e carcinoma renal (9).

Assim como o ferro, o cobre possui atividade redox relevante, atuando como cofator metálico em enzimas vitais como a citocromo c-oxidase e a superóxido-dismutase (10). Sua presença foi descrita como aumentada em tumores, e relacionada à promoção da angiogênese, crescimento e metastatização (11). Apesar deste fato, não há relação entre os níveis de expressão da maioria dos transportadores de cobre (CTR2, ATP7A) e sobrevivência de pacientes, sendo a superexpressão de apenas um (CTR1) ligada a um aumento de sobrevivência de pacientes (12).

No interior de células vivas atingidas por radiações ionizantes, metais de transição bivalente, em especial o ferro, são capazes de, via reação de Fenton, produzir superóxidos e aumentar a radio sensibilidade (13). A exposição de unidades celulares e tecidos vivos à radiação ionizante pode provocar morte celular pelo desenvolvimento de mutações gênicas e aberrações cromossômicas, induzidas pelos danos diretos e indiretos da transferência de energia para as moléculas orgânicas. O efeito principal da radiação sobre as células é na molécula de DNA, que provoca a fragmentação das fitas duplas, gerando aberrações cromossômicas ou mutações gênicas, durante o processo de reparo enzimático ou durante a replicação de DNA (14).

Quando incidem em meio aquoso, as espécies de radiação ionizante induzem uma série de alterações estruturais nas moléculas de água, num processo denominado radiólise de água, quando ocorre a formação de radicais fortemente reativos capazes de transferir a energia adquirida para moléculas orgânicas (15). Neste panorama, a produção de dano radioinduzido deve-se prioritariamente à ação destas espécies reativas, e são considerados os principais responsáveis pelo dano celular, devido aos efeitos produzidos em lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (16). Experimentos usando análises usando espectrometria de massa em moléculas de água irradiadas revelam a presença de espécies químicas OH. (hidroxila), e- (aq) (elétron aquoso), e HO., além do peróxido de hidrogênio e superóxido de hidrogênio, moléculas com alto potencial oxidativo e de reconhecido efeito deletério em diversas biomoléculas, destacando-se o dano ao DNA celular (15).

Análise por Ativação Neutrônica em Coincidência

A Análise por Ativação Neutrônica (NAA) é uma técnica analítica multielementar que permite a quantificação de um grande número de elementos simultaneamente. Ela se baseia no fato de que, ao serem irradiados com nêutrons, núclídeos podem sofrer reações (n, γ) resultando em núclídeos radioativos; desse modo, ao medir-se a radiação emitida pela amostra pode-se quantificar os elementos presentes na amostra original. A NAA é considerada um método primário, por não exigir nenhum tipo de processamento químico prévio (17), e requer quantidades da ordem de dezenas de mg de amostra para análise.

Apesar de amplamente difundida, a NAA tem algumas limitações; uma das principais refere-se à dificuldade em analisar-se espectros gama quando há uma transição gama extremamente intensa (2 ou 3 ordens de grandeza acima das demais) em alta energia, uma vez que a interação Compton desses fótons com o detector resulta em um acréscimo muito significativo nas contagens de fundo para energias inferiores, mascarando eventuais picos gama nessa região.

Em materiais biológicos, a forte presença de Na prejudica fortemente a determinação de elementos menores via NAA, já que este decai quase exclusivamente por uma transição de 2754 keV que mascara a maior parte do espectro gama.

Uma possível solução nesse caso é a análise por NAA em coincidência gama-gama (18,19), onde só são registrados eventos em que se verifica a detecção simultânea de mais de uma transição gama. Essa técnica reduz drasticamente o background do espectro, virtualmente eliminando as interferências espectrais; por outro lado, há uma redução significativa na eficiência de detecção, exigindo tempos de contagem mais longos, e só podem ser analisados núclídeos que apresentem ao menos uma cascata $\gamma\gamma$ no seu decaimento.

No caso dos elementos de interesse, Cu, Zn e Fe apresentam cascatas $\gamma\gamma$ em seu decaimento, o que pode permitir sua análise.

2. Objetivos a serem alcançados

- Avaliar a quantidade de íons de Ferro, Zinco e Cobre em linhagens tumorais humanas e suas contrapartes não tumorais;

- Relacionar tais quantidades à capacidade biológica de manter a sobrevivência celular mediante exposições à radiação ionizante, bem como às frequências de genotoxicidade radio induzida e à expressão de moléculas transportadoras de metais ao meio intracelular.

3. Centros do IPEN participam da proposta InterCentros

CRPq – Guilherme Soares Zahn

CB – Daniel Perez Vieira

4. Metodologia a ser empregada

Cultivo celular

Células de tumores prostáticos humanos LnCap (ATCC CRL-1740) e de tumores epiteliais mamários humanos MCF7 (ATCC HTB-22) serão cultivadas em ambiente estéril, a 37°C com suprimento gasoso de O₂ e CO₂ (95%/5%), em garrafas plásticas de cultivo celular (25cm²) e em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de mistura comercial de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Células epiteliais prostáticas humanas (RWPE-1, ATCC CRL-11609) serão cultivadas da mesma forma com meio específico para crescimento de queratinócitos (Keratinocyte Serum Free Medium, K-SFM, 17005-042, Thermo Fisher) que contém extrato pituitário e fator de crescimento epidermal, necessários para sua duplicação. Células epiteliais mamárias humanas (MCF-10A, ATCC CRL-10317) serão cultivadas em meio MEGMTM - Mammary Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™ (CC-3150, Lonza), e 100 ng/mL de toxina colérica (C8052-1MG, Sigma-Aldrich). As culturas serão mantidas até confluência de 60-70%. O subcultivo ocorrerá após esgotamento do meio de cultura usado, lavagem do tapete de células com 5 mL de solução salina-tamponada fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) contendo 5mM de EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético, *Ethylenediaminetetraacetic acid*, Sigma-Aldrich, Brasil), seguida de incubação por 2 minutos em estufa incubadora com solução de tripsina (2,5g / L) e EDTA (0,1g / L) (Vitrocell – Embriolife, Campinas, Brasil). Após descolamento das garrafas, as células serão ressuspensas em meio RPMI 1640 preparado como descrito e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos em tubos cônicos de 15mL (Corning, Tewksbury, EUA). Apenas a fração viável, determinada pela não incorporação do corante vital azul de tripano a 0,4% (Life Technologies, Carlsbad, EUA) será utilizada para subcultivo ou para experimentação. Uma alíquota de 20µL da suspensão celular será adicionada ao mesmo volume de solução de azul de tripano e

incubada a 37°C por 1 minuto; 10µL desta mistura será utilizada para contagem manual em hematocitômetro, levando em conta apenas as células que não incorporarem o corante.

Irradiações

Células serão tripsinizadas e suspensas em solução PBS a 37°C. A suspensão será dividida em volumes iguais (2mL) por 6 tubos estéreis, e cada um será irradiado nas doses 0, 0,5, 1, 2, 4 ou 8Gy em fonte de isótopo 60 do Cobalto (⁶⁰Co) presente no Centro de Tecnologia das Radiações (GAMMACELL 220 - Irradiation Unit of Canadian Atomic Energy Commission, Ltd.) presente no IPEN/CNEN-SP. Imediatamente após as irradiações, as suspensões serão colocadas em gelo picado e mantidas por 10 minutos.

Ensaio de potencial clonogênico

Após irradiação, as células serão centrifugadas e as frações viáveis determinadas como descrito acima. Após contagem e ressuspensão já com a concentração celular adequada de 100 céls/mL, semeará-se 3mL/poço (300 células/poço) em triplicatas em placas de 6 poços (CORNING COSTAR CORP), mantidas a 37°C. Cerca de 6 dias após semeadura, o meio será removido e as células serão lavadas com 3mL de PBS, fixadas com 3mL de metanol e coradas com 2,5 mL de corante preparado segundo May Grünwald-Giemsa e diluído em 20 partes de 1/20 em tampão fosfato (0,02M Na₂HPO₄; 0,004M KH₂PO₄, água deionizada q.s.p. 1L), pH 6,8. Apenas colônias com número de células maior ou igual a 50 serão contabilizadas no contador de colônias CP 600 (Phoenix). Os resultados serão expressos em eficiência de plaqueamento (EP) e fração de sobrevida (FS), sendo:

$$EP = (\text{n}^\circ \text{ de colônias contadas}) / (\text{n}^\circ \text{ de células semeadas}) \times 100 \text{ (I)}$$

$$FS = \text{n}^\circ \text{ de colônias contadas em cultura tratada} / \text{n}^\circ \text{ de células semeadas} \times (\text{EP em cultura controle}) \text{ (II)}$$

Os valores de frações de sobrevida serão ajustados à equação de crescimento exponencial:

$$Y = e^{-(A-B \cdot X - C \cdot X^2)} \text{ (III)},$$

onde Y é correspondente aos valores obtidos de frações de sobrevida e X as doses de radiação utilizadas.

Análise por Ativação Neutrônica

Para as análises por NAA, as amostras são pesadas e embaladas em recipientes de polietileno, sendo posteriormente enviadas para irradiação no reator IEA-R1 juntamente com padrões dos elementos de interesse, para permitir a quantificação destes. De acordo com a meia-vida dos núclídeos produzidos, as irradiações podem ser feitas de duas formas: para núclídeos de meia-vida curta (até 1 dia – são os casos de Cu – 12h, e Zn – 3h), as amostras são irradiadas por alguns minutos (tipicamente 1-5) na estação pneumática do reator IEA-R1, sendo contadas imediatamente depois; para núclídeos de meia-vida mais longa (caso do Fe – 45d), as amostras são irradiadas junto ao núcleo do reator por períodos de horas (tipicamente 4-8), decaem por duas semanas (para redução da interferência de núclídeos de meia-vida mais curta) e só então são analisadas.

No caso de NAA em coincidência, as amostras são analisadas em um sistema composto por dois detectores tipo HPGe dispostos a 180 graus e acoplados a um sistema de aquisição multiparamétrica (20) que registra apenas os eventos em que ambos os detectores identificaram uma emissão gama dentro de um intervalo máximo de 1ms, gerando um arquivo com todos os eventos coincidentes registrados, a energia registrada em cada detector e a diferença de tempo entre os registros nos dois detectores. A partir destes dados, é construída uma matriz de coincidências e pode-se analisar apenas os eventos onde os detectores registraram duas transições coincidentes oriundas do mesmo núcleo. Uma vez analisados todos os espectros de coincidência, a massa (m_a) de um dado elemento na amostra pode ser determinada por:

$$m_a = m_p \cdot \frac{C_a}{C_p} \cdot e^{-\lambda \cdot dt}$$

onde m_p é a massa do elemento no padrão, C_a e C_p as taxas de contagem dos picos de coincidência na amostra e padrão, respectivamente, λ é a constante de decaimento do núclídeo formado e dt a diferença de tempo entre a contagem da amostra e do padrão.

5. Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta

- Base científica e tecnológica para exploração futura de modelos com maior complexidade, estudando interações das células com diversos fármacos e seu potencial de induzir (ou inibir) o acúmulo destes metais;

- Abrir possibilidades de interação com outros pesquisadores de outros centros e/ou instituições que tenham interesse em estudos da fisiologia tumoral sob a perspectiva da retenção de metais,

- No âmbito do CRPq, o projeto em questão permitiria a implementação concreta da técnica de NAA em coincidência, técnica que pode ser de grande utilidade em diversos projetos posteriores.

6. Orçamento detalhado

O sistema de aquisição multiparamétrica Pixie-Net (12bit, 250 MHz) destina-se à aquisição em coincidência de dados das amostras irradiadas.

Computador desktop: um deles destinado ao sistema de aquisição de dados da espectrometria gama na análise por ativação e o outro para redação de relatórios e cálculos, etc.

Cápsulas plásticas para irradiação dos tipos W, T e V e tampas para amostras de diferentes volumes.

Soluções padrão para INAA.

Reagentes químicos para preparação das amostras.

Material de referência certificado para INAA.

Linhagens celulares, meio de cultura K-SFM, meio de cultura MEGMTM e toxina colérica destinam-se obtenção das amostras por cultivo celular.

7. Cronograma físico

	1º	2º	3º	4º
<i>Estabelecimento de cultivos celulares</i>	X	X		
<i>Irradiações</i>	X	X	X	
<i>Ensaio de potencial clonogênico</i>		X	X	X
<i>Análise por absorção atômica</i>		X	X	X

8. Identificação dos demais participantes do projeto

Frederico Antônio Genezini – CRPq - Pesquisador

Paulo Sergio Cardoso da Silva – CRPq – Pesquisador

Regina Affonso – CB - Pesquisadora

9. Infraestrutura e apoio técnico para o desenvolvimento do projeto e anuência do responsável pela unidade do IPEN

Centro do Reator de Pesquisas – CRPq

O LAN – Laboratório de Análise por Ativação – conta com o apoio do Reator IEA-R1 para irradiação das amostras para determinações por análise por ativação, espectrômetros de raios gama das marcas CANBERRA e ORTEC para medidas por espectrometria gama das amostras irradiadas.

Centro de Biotecnologia - CB

O CB possui toda a infraestrutura necessária aos ensaios com culturas de células, contando com Laboratório de Cultura Celular equipado com equipamentos básicos (incubadoras, capelas de fluxo laminar, banhos-maria, centrífugas, microscópios, estrutura de esterilização de material). Consumíveis plásticos e reagentes básicos (sais para soluções-tampão, etanol, metanol, corante Giemsa) também estão disponíveis livremente no Laboratório.

10. Quantidade prevista de produção de C&T

Publicação de pelos menos dois artigos em periódicos internacionais de alto fator de impacto;

Apresentação de trabalhos em pelo menos dois congressos, sendo um nacional e um internacional.

11. Disponibilização dos resultados da pesquisa para o mercado/sociedade

Os resultados da pesquisa serão divulgados à sociedade na forma dos artigos publicados e comunicações em congressos.

REFERÊNCIAS

1. Maret W. The metals in the biological periodic system of the elements: Concepts and conjectures. *Int J Mol Sci.* 2016;17(1):1–8.
2. Fouani L, Menezes S V, Paulson M, Richardson DR, Kovacevic Z. Metals and metastasis : Exploiting the role of metals in cancer metastasis to develop novel anti-metastatic agents. *Pharmacol Res [Internet].* 2017;115:275–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.001>
3. Yu Y, Kovacevic Z, Richardson DR. Tuning cell cycle regulation with an iron key. *Cell Cycle.* 2007;6(16):1982–94.
4. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012;46(4):382–419.
5. Kwok JC. The iron metabolism of neoplastic cells: Alterations that facilitate proliferation? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;42(1):65–78.
6. Lui GYL, Kovacevic Z, Richardson V, Merlot AM, Kalinowski DS, Richardson DR. Targeting cancer by binding iron: Dissecting cellular signaling pathways. *Oncotarget [Internet].* 2015;6(22):18748–79. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/4349>
7. Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E. Zinc Deficiency Affects DNA Damage , Oxidative Stress , Antioxidant Defenses , and DNA Repair. *J Nutr.* 2009;139:1626–31.
8. Wieczorek E, Jablonska E, Wasowicz W, Reszka E. Matrix metalloproteinases and genetic mouse models in cancer research: a mini-review. *Tumor Biol.* 2014;36(1):163–75.
9. Ziliotto S, Ogle O, Taylor KM. Targeting Zinc (II) Signalling to Prevent Cancer. 2018;18(li):507–29.
10. Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer.” *Metallomics.* 2015;7(11):1459–76.
11. Gupte A, Mumper RJ. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev [Internet].* 2009;35(1):32–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.07.004>
12. Sun S, Cai J, Yang Q, Zhao S, Wang Z. The association between copper transporters and the prognosis of cancer patients undergoing chemotherapy: a

- meta-analysis of literatures and datasets. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(9):16036–51. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/13917>
13. Ayene IS, Koch CJ, Krisch RE. DNA strand breakage by bivalent metal ions and ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 2007;83(3):195–210.
 14. Lorimore SA, Wright EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2003;79(1):15–25. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12556327
 15. Folkes LK, Neill PO. Free Radical Biology and Medicine Modification of DNA damage mechanisms by nitric oxide during ionizing radiation. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013;58:14–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.014>
 16. Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, Milne G, Wright EG. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: A mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene* [Internet]. 2001;20(48):7085–95. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1204903>
 17. Robert R. Greenberg, Peter Bode, Elisabete A. De Nadai Fernandes, Neutron activation analysis: A primary method of measurement, *Spectrochimica Acta B* 66 (2011) pp. 193-241.
 18. B.E.Tomlin, R.Zeisler, R.M.Lindstrom, $\gamma\gamma$ coincidence spectrometer for instrumental neutron-activation analysis, *Nuclear Instrum. Meth. Phys. Res. A* 589 (2008) pp. 243-249.
 19. Y.Hatsukawa, M.Oshima, T.Hayakawa, Y.Toth, N.Shinohara, Application of multiparameter coincidence spectrometry using a Ge detectors array to neutron activation analysis, *Nuclear Instrum. Meth. Phys. Res. A* 482 (2002) pp. 328-333.
 20. G. S. Zahn, F. A. Genezini, I. S. Ribeiro Jr., E. Fagionato, on the use of gamma-gamma coincidence to detect very low activities. In: *XL Brazilian Workshop on Nuclear Physics, 2017, Campos do Jordão.*