

# **Avaliação do efeito de três metais constituintes da monazita sobre a radiosensibilidade de osteoblastos humanos**

Lucas Kiyoshi da Fonseca Iwahara\*, Monica Stuck de Oliveira, Marcus Alexandre Vallim de Alencar

Instituto de Radioproteção e Dosimetria (IRD/CNEN) Rio de Janeiro/RJ

\*Av. Salvador Allende s/n, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 22783-127

E-mail: [lucas@bolsista.ird.gov.br](mailto:lucas@bolsista.ird.gov.br)

## **ABSTRACT**

Thorium has gained notoriety in recent years, as a potential source of nuclear energy, substituting uranium in power plants. Monazite is an important font of thorium, as well of uranium and rare earths elements. Professionals involved in the extraction and manipulation of this mineral are occupationally exposed to aerosols containing metals and to ionizing radiation. This paper analyzed the effects of thorium, cerium and lanthanum on cell radiosensitivity. As an osteotropic substance, thorium is mostly deposited in bone tissue and may interfere in cellular radiosensitivity. A human osteoblast cell line was used to evaluate the effects of thorium, cerium and lanthanum on cell radiosensitivity, using proliferation as indicator. Assays were performed using cell cultures exposed to metals and to ionizing radiation. As a result, metals in combination with ionizing radiation induced changes on cell proliferation, in a concentration-dependent manner, in comparison with the exposure to metals alone. That suggests the possibility of combination interfering with radiosensitivity of osteoblasts, indicating an enhancement in occupational risk for workers that manipulate monazite byproducts and are subject to radiation in the environment. Thus, the development of risk assessment models that include the evaluation of metal-radiation mixtures and their cytotoxic and radiotoxic effects on tissues and organs must be highlighted.

Key words: radiation-induced effects, cell proliferation, occupational risk

## **RESUMO**

O tório vem ganhando notoriedade como fonte potencial de energia nuclear, em substituição ao urânio em usinas. Monazita é uma fonte importante de tório, assim como de urânio e elementos de terras raras, como o cério e o lantânio. Profissionais envolvidos na extração e manipulação desse mineral estão ocupacionalmente expostos a aerossóis contendo metais e a outros agentes, como a radiação ionizante. Sendo elementos osteotrópicos, actínídeos e lantanídeos são depositados principalmente no tecido ósseo e podem interferir na radiosensibilidade celular. Uma linhagem de osteoblastos humanos foi usada para a avaliação de efeitos do tório, cério e lantânio sobre a radiosensibilidade utilizando-se como indicador a proliferação celular. Ensaios foram realizados utilizando-se culturas celulares expostas aos metais e à radiação ionizante. Os resultados mostram que os metais, em associação com radiação ionizante,

causaram efeitos distintos sobre a proliferação celular, dependendo da concentração, em comparação com a exposição aos metais de forma isolada. Tal observação sugere a possibilidade de combinações interferirem na radiosensibilidade dos osteoblastos, manifestando o aumento do risco ocupacional para os trabalhadores envolvidos com areias monazíticas e que estão sujeitos à radiação no ambiente. Portanto, o desenvolvimento de modelos de avaliação de riscos que incluam o estudo das associações metal-irradiação e seus efeitos citotóxicos e radiotóxicos sobre tecidos e órgãos relevantes devem ser enfatizados.

Palavras-chaves: efeitos radioinduzidos, proliferação celular, risco ocupacional

## **1. INTRODUÇÃO**

Radiossensibilidade pode ser definida como a susceptibilidade relativa de células, tecidos ou órgãos à ação lesiva da radiação ionizante. A radiosensibilidade celular é diretamente proporcional à taxa de divisão celular e inversamente proporcional ao grau de diferenciação celular (Rubin e Casarett, 1968). A exposição das células humanas à radiação ionizante leva a respostas celulares complexas, que podem resultar em alterações e seu ciclo celular e dos estágios de proliferação, e em casos mais graves, na mutagênese e morte celular (UNSCEAR, 2000). Na análise da radiosensibilidade, uma das principais metodologias é a medição dos graus de resposta de uma célula à radiação, permitindo a avaliação de um grande número de fenômenos em nível celular (HPA, 2013).

A exposição humana ocupacional ou ambiental a agentes químicos raramente é limitada a uma única substância (Yang e Rauckman, 1987). Uma mistura pode produzir efeitos distintos aos esperados em casos de exposição a um único fator. Dentre essas combinações, existem as associações metal-irradiação. Em nível celular, os principais efeitos da combinação de radiação ionizante e outros agentes são mutações, inativação celular ou apoptose (UNSCEAR, 2000).

O tório é um elemento radioativo natural do grupo dos actinídeos, emissor alfa e meia-vida de aproximadamente  $14 \times 10^9$  anos. É encontrado em vários minerais, associado com outros actinídeos e elementos do grupo terras raras, como cério e lantânio, dentre os quais a monazita, com concentração relativa de 18% de óxido de tório (USPHS, 1990). O cério e o lantânio são elementos do grupo dos lantanídeos e, ao contrário do tório, são metais estáveis. O cério ocorre naturalmente no meio ambiente sob a forma de diversos minerais (Dahle e Arai, 2015) e o lantânio associado com o cério (Paiva et al., 2009). Ambos possuem aplicações similares, como catálise, luminescência, combustível, cosméticos e utensílios médicos (Zhou et al., 2013). Em depósitos de monazita, os trabalhadores podem estar expostos a combinações de aerossóis contendo tório, cério e lantânio e radiação ionizante. Essas misturas podem afetar a radiosensibilidade de células e intensificar os efeitos radio-induzidos, aumentando o risco ocupacional.

O tecido ósseo é um dos maiores alvos de deposição de actinídeos e lantanídeos, que são substâncias osteotrópicas (Ansoborlo et al., 2006; Taylor e Leggett, 2003) e apresentam uma

retenção prolongada no esqueleto (Vidaud, Bourgeois e Meyer, 2012). O principal objetivo desse trabalho foi examinar a possibilidade de tório, cério e lantânio interferirem na radiosensibilidade celular, através de análises da proliferação celular em osteoblastos humanos submetidos a exposições de 1 Gy.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Cultura celular**

A linhagem celular usada foi a MG63 (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), modelo de osteoblastos humanos, derivado de osteosarcoma. Culturas de osteoblastos foram mantidas em garrafas de 25 e 75 cm<sup>2</sup> e as células foram cultivadas em meio DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). As células foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C, e atmosfera de 5% de gás carbônico.

### **2.2 Materiais**

Foram utilizados metais na forma de nitrato: nitrato de tório (Merck, Darmstadt, Alemanha), nitrato de cério (Vetec química Fina, Rio de Janeiro, Brasil) e nitrato de lantânio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) com concentrações 0, 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM e 1 mM. Foi usado irradiador usado Picker X-ray Corporation (EUA) e fonte radioativa de cobalto-60.

### **2.3 Proliferação celular**

Os osteoblastos foram distribuídos em duas placas de 96 poços (40000 células por poço). Na placa 1, as células foram expostas aos metais de forma isolada e a placa 2 aos metais em combinação com radiação. Após a adesão, o meio de cultura foi descartado cuidadosamente e os osteoblastos foram irradiados. Após a irradiação, foi adicionado 200µl de solução DMEM com as concentrações metálicas pré-definidas. Controles foram preparados com a adição de 200 µL de meio DMEM puro. As placas foram, então, mantidas em estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) por 48 horas. Para a estimativa da proliferação celular, foi utilizado o método colorimétrico de redução do sal de tetrazolium MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma Aldrich). Foi adicionado 5% do volume inicial de cultura de solução MTT em cada poço. As placas foram mantidas por quatro horas em estufa e protegidas da luz. Em seguida, retirou-se o meio de cada poço e para dissolução do formazan foi adicionado 100 µl DMSO por cada poço. Passado 24 horas, as placas foram lidas no espectrofotômetro (TP Reader NM, versão número 1.4) no comprimento de onda de 570 nm.

### **2.4 Análise estatística**

Os dados experimentais foram apresentados sob a forma média±desvio padrão. Foram usadas quatro réplicas para cada grupo. Avaliação da dose-resposta de metais foi feita por meio da análise de variância (ANOVA), testes de Tukey, Games-Howell, Kruskal-Wallis e teste de Mann-Whitney.

A comparação da radiosensibilidade entre grupos irradiados e não irradiados foi feita pelo teste de t-Student e pelo teste de Mann-Whitney. Foi usado o programa IBM SPSS Statistics versão 21.

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Efeitos da radiação ionizante nos osteoblastos**

Resultados preliminares indicaram que doses de 1 Gy não foram capazes de alterar significativamente a proliferação celular, indicando que a irradiação isolada não interferiu na proliferação de osteoblastos.

#### **3.2 Metais**

Os índices de proliferação de osteoblastos expostos ao tório, cério e lantânio são mostrados na Figura 1. Para o grupo não irradiado (Figura 1A), observou-se que: (i) todas as concentrações de tório aumentaram a proliferação; (ii) todas as concentrações exceto a de 0,50 mM de cério aumentaram a proliferação; (iii) somente a concentração de 0,75 mM de lantânio foi capaz de estimular a proliferação. Para as amostras irradiadas (Figura 1B): (i) a combinação tório e radiação estimulou a proliferação em todas as concentrações; (ii) apenas a concentração de 0,50 mM de lantânio causou alteração significativa na proliferação, diminuindo-a.

#### **3.3 Análises da radiosensibilidade**

Usando os dados apresentados na Figura 1, foi possível analisar se os metais foram ou não capazes de afetar a radiosensibilidade, comparando os índices de proliferação entre os grupos irradiados e não irradiados. Em amostras expostas ao tório, observou-se que a proliferação de osteoblastos irradiados foi menor, para todas as concentrações exceto 0,25 mM, em relação às células não irradiadas e expostas às mesmas respectivas concentrações de metal (Figura 2A). Em amostras irradiadas e expostas ao cério, em todas as concentrações exceto a de 0,50 mM de cério, a proliferação de células irradiadas diminuiu, incluindo observações de morte celular em 0,25 e 1 mM de cério (Figura 2B). Similarmente, em células expostas ao lantânio, foi visto morte celular em osteoblastos irradiados e tratados com todas as concentrações de lantânio (Figura 2C).

FIGURA 1. Proliferação de osteoblastos, em resposta à exposição a Th, Ce e La: amostras não irradiadas (A) e amostras irradiadas (B) (\* =  $P < 0.05$ )

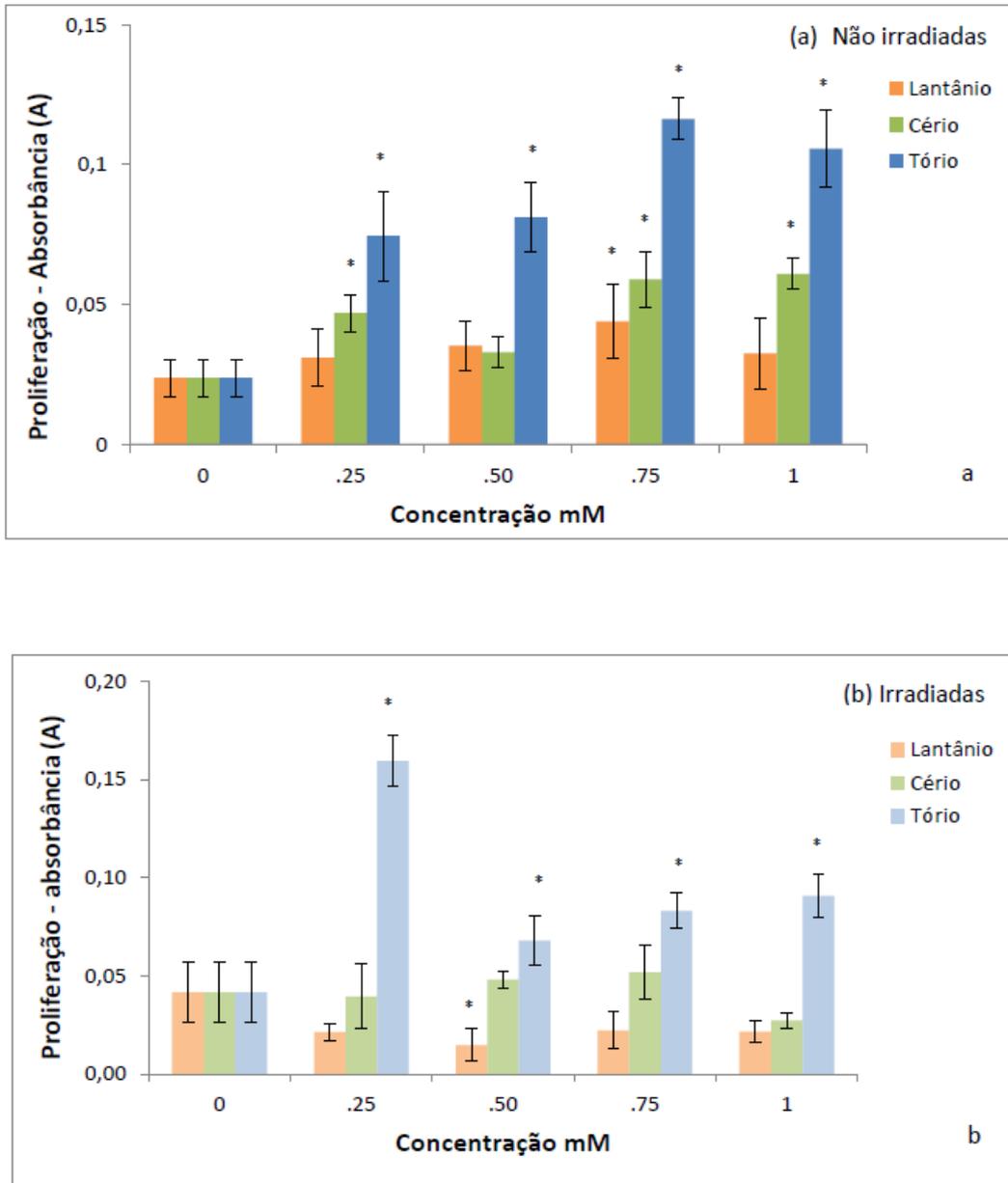
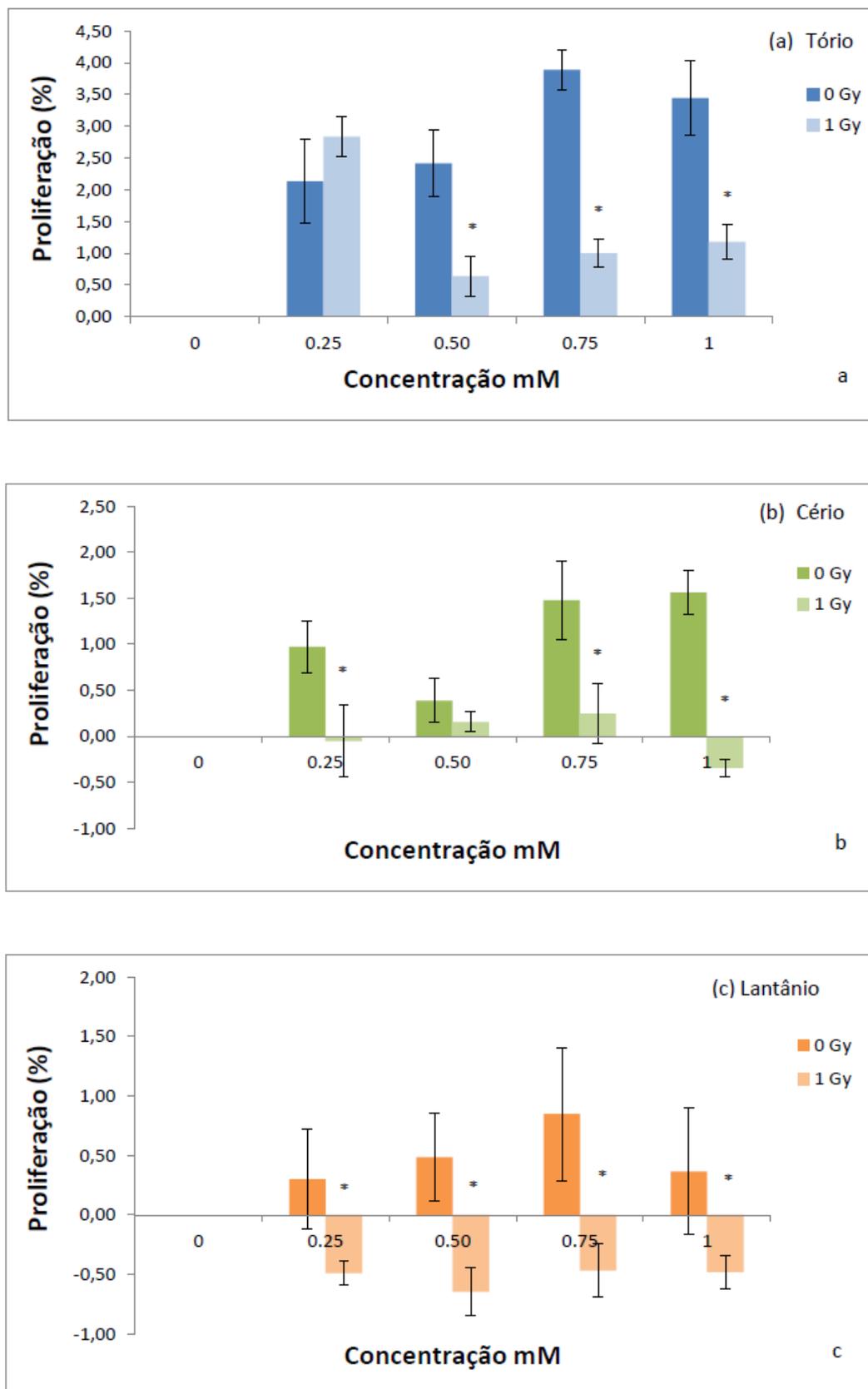


FIGURA 2. Análises da radiosensibilidade de osteoblastos expostos à dose absorvida de 1 Gy e ao Tório (A), Cério (B) e Lantânio (C) em concentrações (\* =  $P < 0.05$ , comparativo entre grupos irradiados e não irradiados)



#### **4. DISCUSSÃO**

Elementos metálicos podem influenciar a proliferação de células osteoblásticas, bem como de outros tipos celulares. As respostas podem ser instigadas por diferentes parâmetros tais como concentração, tempo de exposição e especificidade de cada agente (Hallab et al., 2002).

Observou-se que todas as concentrações de tório foram capazes de estimular a proliferação dos osteoblastos. Da mesma forma, já foi descrito esse efeito em células hepáticas e hemólise em eritrócitos humanos (Kumar, Ali e Pandey, 2014) e nenhum efeito em macrófagos humanos (Lizon e Fritsch, 1999), quando expostos ao tório. Essas observações sugerem a influência do tipo celular e do tempo de exposição ao tório sobre a proliferação celular. Em amostras expostas aos lantanídeos, todas as concentrações, exceto a de 0,50 mM de cério, estimularam a proliferação, enquanto a concentração de 0,50 mM de lantânio incentivou o mesmo efeito. Foi registrado que ocorre estímulo da proliferação em culturas de osteoblastos primários (Zhang et al., 2010) e pré-osteoblastos de rato (Liu et al., 2012a) quando expostos ao cério. Da mesma forma, o lantânio pode estimular a proliferação a baixas doses, mas também como um agente citotóxico em doses elevadas, conforme observações em osteoblastos de ratos expostos ao lantânio (Wang et al., 2008; Liu et al., 2012b), sugerindo que concentração do cério ou do lantânio, o tempo de exposição da cultura e o tipo de linhagem celular são determinantes na proliferação celular (Feyerabend et al., 2010).

Por outro lado, a irradiação de osteoblastos, na ausência de metais, não provocou alterações na proliferação celular. Contudo, outros efeitos sobre a proliferação de osteoblastos irradiados foram vistos, sugerindo que uma variedade de fatores pode influenciá-la, tais como dose, taxa de dose, tipo celular e tempo de exposição (Dudziak et al., 2000; Dare et al., 1997).

Os resultados sugerem que tório, cério e lantânio podem influenciar a radiosensibilidade de osteoblastos humanos, de forma concentração-dependente. Foi observado que todas as concentrações de tório, exceto a de 0,25 mM quando irradiadas, produziram um efeito combinatório na proliferação celular, diminuindo-a e sugerindo a interação química entre metal e radiação. Efeitos combinados já foram notados em rato (Ballou, George e Thompson, 1962) e planta (Vanhoudt et al., 2010), quando houve exposição simultânea a actinídeos e radiação. De forma similar, os resultados revelaram interação entre radiação e metal nas concentrações de 0,25; 0,75 e 1 mM de cério e todas as concentrações de lantânio. A existência de associação entre radiação e os metais cério e lantânio foi reportada em grupos de ratos (Floersheim, 1995) e em células cancerosas do pâncreas (Wason et al., 2013).

Todas as interações metal-irradiação observadas indicam uma resposta negativa sobre a proliferação, com a redução dos índices. Foi visto sinais de morte celular em amostras irradiadas expostas aos lantanídeos, mas não ao tório. A maior similaridade entre o cério e o lantânio na influência da radiosensibilidade deve-se, provavelmente, às suas semelhanças químicas por pertencerem ao mesmo grupo. Elementos metálicos podem aumentar ou inibir os efeitos radioinduzidos em sistemas biológicos, através de modificações na radiosensibilidade de células alvos. Essa interferência na fisiologia celular pode ser explicada pelos metais agirem como um catalisador de processos que produzem radicais livres, diminuindo a energia de ativação ou aumentando a reatividade de radicais radioinduzidos (Floersheim, 1995).

No caso de incorporação interna de tório no tecido ósseo, a principal preocupação reside na sua radioatividade (emissor alfa) e longa meia-vida física. Contudo, a natureza química do tório também pode ser relevante em curto prazo (Ali, Kumar e Pandey, 2014). O uso do tório tem crescido, aumentando o risco ocupacional em minas e empresas de beneficiamento (Kumar, Ali e Pandey, 2010). Esses profissionais podem estar expostos a tório, em combinação com a radiação externa de elementos instáveis do ambiente e com a radiação interna da incorporação de tório (Hu et al., 1984; Hewson e Hartley, 1990). Essas combinações podem produzir diferentes efeitos, através da atuação dos metais sobre a radiosensibilidade celular e representar um risco potencial. A redução dos índices de proliferação observada nesse trabalho corrobora a possibilidade do aumento do risco para profissionais, indicando a necessidade do desenvolvimento de modelos de avaliação de risco que incluam o estudo das misturas metal-irradiação.

## **5. CONCLUSÕES**

Metais podem afetar a radiosensibilidade de osteoblastos humanos, considerando as condições desse estudo (linhagem celular, dose da radiação, tempo de exposição e concentração usada). Um aumento da radiosensibilidade de células ósseas de profissionais que manipulam areias monazíticas ou que trabalham em seu processamento é esperado, indicando maior risco ocupacional. Futuros trabalhos serão realizados com misturas de tório, cério e lantânio, já que em ambientes monazíticos, a exposição a múltiplos fatores pode ocorrer de forma mais realista. Associações entre combinações de metais e radiação ionizante serão analisadas para avaliar os possíveis impactos sobre a radiosensibilidade de células ósseas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M.; KUMAR, A.; PANDEY, B. N. Thorium induced cytoproliferative effect in human liver cell HepG2: role of insulin-like growth factor 1 receptor and downstream signaling. **Chem Biol Interact**, v. 211, p. 29-35, Mar 2014.
- ANSOBORLO, E.; PRAT, O.; MOISY, P.; DEN AUWER, C.; GUILBAUD, P.; CARRIERE, M.; GOUGET, B.; DUFFIELD, J.; DOLZI, D.; VERCOUNTER, T.; MOULIN, C.; MOULIN, V. Actinide speciation in relation to biological processes. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1605-18, Nov 2006.
- BALLOU, J. E.; GEORGE, L. A.; THOMPSON, R. C. The combined toxic effects of plutonium plus x-ray in rats. **Health Phys**, v. 8, p. 581-7, Dec 1962.
- DAHLE, J. T.; ARAI, Y. Environmental geochemistry of cerium: applications and toxicology of cerium oxide nanoparticles. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, n. 2, p. 1253-78, Feb 2015.
- DARE, A.; HACHISU, R.; YAMAGUCHI, A.; YOKOSE, S.; YOSHIKI, S.; OKANO, T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **J Dent Res**, v. 76, n. 2, p. 658-64, Feb 1997.
- DUDZIAK, M. E.; SAADEH, P. B.; MEHRARA, B. J.; STEINBRECH, D. S.; GREENWALD, J. A.; GITTES, G. K.; LONGAKER, M. T. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. **Plast Reconstr Surg**, v. 106, n. 5, p. 1049-61, Oct 2000.
- FEYERABEND, F.; FISCHER, J.; HOLTZ, J.; WITTE, F.; WILUMEIT, R.; DRÜCKER, H.; VOGT, C.; HORT, N. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. **Acta Biomater**, v. 6, n. 5, p. 1834-42, May 2010.
- FLOERSHEIM, G. L., Modification of radiation sensitivity by salts of the metals beryllium and indium and the rare earths cerium, lanthanum and scandium. **Radiat Res**, v. 141, n. 3, p. 318-23, 1995.
- HALLAB, N. J.; VERMES, C.; MESSINA, C.; ROEBUCK, K. A.; GLANT, T. T.; JACOBS, J. J. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. **J Biomed Mater Res**, v. 60, n. 3, p. 420-33, Jun 2002.
- HEWSON, G. S.; HARTLEY, B. M., Radiation research priorities in the mineral sands industry. **J. Radiol. Prot.** v. 10, n. 3, p. 221-229, 1990.
- HPA. Human Radiosensitivity, Report of the Independent Advisory Group on Ionising Radiation. United Kingdom. Documents of the Health Protection Agency – Radiation, Chemical and Environmental Hazards. March 2013.

- HU, S. J.; KOO, W. K.; TAN, K. L. Radioactivity associated with among upgrading plants. **Health Phys**, v. 46, n. 2, p. 452-5, Feb 1984.
- KUMAR, A.; ALI, M.; PANDEY, B. N.; HASSAN, P. A.; MISHRA, K. P. Role of membrane sialic acid and glycoprotein in thorium induced aggregation and hemolysis of human erythrocytes. **Biochimie**, v. 92, n. 7, p. 869-79, Jul 2010.
- LIU, D.; ZHANG, J.; LI, Y.; WANG, S.; YANG, M. The effects of Ce on the proliferation, osteogenic differentiation and mineralization function of MC3T3-E1 cells in vitro. **Biol Trace Elem Res**, v. 149, n. 2, p. 291-7, Nov 2012a.
- LIU, D.; ZHANG, J.; WANG, G.; LIU, X.; WANG, S.; YANG, M., The dual-effects of LaCl<sub>3</sub> on the proliferation, osteogenic differentiation, and mineralization of MC3T3-E1 cells. **Biol Trace Elem Res**, v. 150, n. 1-3, p. 433-40, 2012b.
- LIZON, C.; FRITSCH, P. Chemical toxicity of some actinides and lanthanides towards alveolar macrophages: an in vitro study. **Int J Radiat Biol**, v. 75, n. 11, p. 1459-71, Nov 1999.
- PAIVA, A. V.; OLIVEIRA, M. S.; YUNES, S.N.; OLIVEIRA, L. G.; CABRAL-NETO, J. B.; ALMEIDA, C. E. Effects of lanthanum on human lymphocytes viability and DNA strand break. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 82, n. 4, p. 423-7, Apr 2009.
- RUBIN, P.; CASARETT, G. W., Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. **Cancer**, v. 22, n. 4, p. 767-78, 1968.
- TAYLOR, D. M.; LEGGETT, R. W. A generic biokinetic model for predicting the behaviour of the lanthanide elements in the human body. **Radiat Prot Dosimetry**, v. 105, n. 1-4, p. 193-8, 2003.
- UNSCEAR. Report to the General Assembly with Scientific Annexes, Volume II: Effects, Annex H: Combined effects of radiation and other agents, United Nations Publication, New York, USA, 2000.
- USPHS. Toxicological Profile for Thorium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Public Health Service, October 1990.
- VANHOUDT, N.; VANDENHOVE, H.; HOREMANS, N.; WANNIJIN, J.; VAN HESS, M.; VANGRONVELD, J.; CUYPERS, A. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in Arabidopsis thaliana. **J Environ Radioact**, v. 101, n. 11, p. 923-30, Nov 2010.
- VIDAUD, C.; BOURGEOIS, D.; MEYER, D. Bone as target organ for metals: the case of f-elements. **Chem Res Toxicol**, v. 25, n. 6, p. 1161-75, Jun 2012.
- WANG, X.; YUAN, L.; HUANG, J.; ZHANG, T. L.; WANG, K. Lanthanum enhances in vitro osteoblast differentiation via pertussis toxin-sensitive G protein and ERK signaling pathway. **J Cell Biochem**, v. 105, n. 5, p. 1307-15, Dec 2008.

WASON, M. S.; COLON, J.; DAS, S., SEAL, S.; TURKSON, J.; ZHAO, J.; BAKER, C. H. Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production. **Nanomedicine**, v. 9, n. 4, p. 558-69, May 2013.

YANG, R. S.; RAUCKMAN, E. J. Toxicological studies of chemical mixtures of environmental concern at the National Toxicology Program: health effects of groundwater contaminants. **Toxicology**, v. 47, n. 1-2, p. 15-34, Dec 1987.

ZHANG, J.; LIU, C.; LI, Y.; SUN, J.; WANG, P.; DI, K.; ZHAO, Y. Effect of cerium ion on the proliferation, differentiation and mineralization function of primary mouse osteoblasts in vitro. **Journal of Rare Earths**, v. 28, n. 1, p. 138-142, 2010.

ZHOU, G.; GU, Q.; LI, Y.; ZHANG, Q.; WANG, W.; WANG, S.; ZHANG, J. Effects of cerium oxide nanoparticles on the proliferation, differentiation, and mineralization function of primary osteoblasts in vitro. **Biol Trace Elem Res**, v. 153, n. 1-3, p. 411-8, Jun 2013.