

RADIACION, OXIDO NITRICO Y MUERTE CELULAR

D. DUBNER, M. DEL R. PÉREZ, S.C. MICHELIN, P.A. GISONE
 Autoridad Regulatoria Nuclear, Gerencia de Apoyo Científico,
 Buenos Aires, Argentina

RESUMEN Los mecanismos de la muerte celular radioinducida constituyen un objetivo de investigación desde que los primeros efectos biológicos de las radiaciones fueron observados. La explosión de información producida en los últimos 20 años necesita de un cuidadoso análisis debido a los aparentemente conflictivos datos, que en realidad no son tales, sino que están en estrecha correlación con el sistema celular estudiado y el rango de dosis usado. Esta revisión, focaliza la atención en el rol de las especies activas del oxígeno, en particular el Oxido Nítrico, en relación a su relevancia como potenciales mediadores de la muerte celular radioinducida.

MUERTE CELULAR

La muerte celular inducida por radiación ionizante ha sido extensamente estudiada tanto desde el punto de vista del tejido normal, como de la respuesta tumoral. Dos formas de muerte celular, genética, bioquímica y morfológicamente diferentes han sido reconocidas: la apoptosis y la necrosis, siendo su expresión dependiente no sólo del tipo de célula sino de la dosis de radiación. Dosis altas pueden causar la destrucción de células linfoides via necrosis, mientras que dosis bajas inducen apoptosis [1]

La apoptosis o muerte celular programada es una forma genéticamente mediada de muerte celular en la cual la célula diseña y ejecuta el programa de su propia desaparición, en respuesta a estímulos externos e internos, cuya complejidad se está revelando recientemente. La necrosis es el resultado de un daño externo a la célula, que la lleva a un colapso metabólico, cuando la célula no puede mantener ya la homeostasis iónica, siendo un proceso pasivo, catabólico y degenerativo.

La capacidad de la radiación para inducir apoptosis ha sido bien documentada entre otras en células acinares de la glándula parótida, en timocitos, en células de la cripta intestinal y en linfocitos [2].

Debido a que la apoptosis implica un proceso regulado de degradación, ha sido postulado que la señal de inducción de apoptosis luego de la irradiación se origina en el núcleo [3]. Estudios que muestran la capacidad de BrdUrd de incrementar la apoptosis radioinducida y al decaimiento del I¹²⁵ en el DNA como inductor de apoptosis en células susceptibles, implican al daño en el DNA como disparador [1]

Sin embargo hay evidencias que el daño en la membrana puede inducir apoptosis. Estudios recientes han demostrado que la hidrólisis de la esfingomielina por rayos X lleva a la producción de un segundo mensajero lipídico- la ceramida- que contribuye a la respuesta apoptótica [4]

ESPECIES ACTIVAS DEL OXIGENO.

Las especies activas del oxígeno (EAO) con su capacidad de iniciar peroxidación en los lípidos de membrana, oxidación de proteínas, inactivación de sitios activos y rupturas de simple o doble cadena en la molécula de DNA, se constituyen en moléculas claves en el estudio de la muerte celular, tanto por necrosis como por apoptosis.

El stress oxidativo, que describe un desbalance entre la producción y la remoción de EAO ha sido propuesto como un mediador de apoptosis [5]. De hecho, la radiación ionizante genera por radiólisis del agua uno de las especies más activas, el radical hidroxilo (OH)

Varias clases de moléculas han sido propuestas como potenciales blancos del stress oxidativo en la apoptosis [6]:

- a) Factores de transcripción sensibles al estado redox de la célula podrían contribuir a la regulación de los genes involucrados en la apoptosis (c-myc , bcl-2, p-53) [2]
- b) La regulación redox de moléculas involucradas en la homeostasis del calcio pueden llevar al incremento sostenido de calcio intracelular que ha sido asociado con la apoptosis [7]
- c) Un stress oxidativo moderado induce un incremento en la proteólisis concordante con la observación de una incrementada proteólisis durante la apoptosis y con los estudios genéticos que ligan a la enzima convertidora interleukina-1- (ICE) de la familia de las cistein-proteasas al mecanismo de apoptosis [8]

OXIDO NITRICO

Entre las EAO, el óxido nítrico (NO), nombrada la molécula del año en 1992 por Science, [9] merece un enfoque especial por su caracter de mensajero biológico involucrado en una variedad de estados fisiológicos y patológicos.

Es producido por una variedad de células, incluyendo endotelio vascular, neuronas, células musculares lisas, macrófagos, neutrófilos, plaquetas y endotelio pulmonar. Es sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-arginina y se han identificado tres genes NOS: neuronal (n NOS), endotelial (e NOS) e inmunológica o inducible (i NOS), de acuerdo al tejido en el cual fueron primero clonados.

Existen ahora evidencias que demuestran que el NO[•] causa necrosis o apoptosis en una variedad de tipos celulares. La exposición sostenida a bajos niveles de NO[•] causa apoptosis, mientras que la exposición aguda a concentraciones altas, resulta en la muerte celular por necrosis [10].

Como media el NO sus efectos tóxicos?

Numerosas evidencias sugieren que gran parte del daño inducido por el NO puede deberse a la generación de peroxinitrito (ONOO⁻), producto de la reacción del NO con el anión superóxido (O₂^{-•}), generado en varias vías del metabolismo celular [11].

Cuidadosos estudios *in vitro* han demostrado que en algunos sistemas, el peroxinitrito es un potente inhibidor de la actividad de la aconitasa, no así el NO [12]. En forma similar, mientras el NO causa una inhibición reversible de las enzimas mitocondriales, la acción del peroxinitrito causa la inhibición permanente de la función mitocondrial [13].

El daño al DNA puede ser fundamental al efecto citotóxico. El daño por NO y principalmente por peroxinitrito ocurre a través de la deaminación, nitración e hidroxilación de las bases, así como por ruptura de las cadenas [14].

La fragmentación del DNA estimula la actividad de la poli-ADPribosil sintetasa (PARS). Esta enzima cataliza la unión de unidades de ADP-ribosa a proteínas nucleares tales como la histona y a la PARS en si misma. Por cada molécula de ADP-ribosa transferida, una molécula de NAD es consumida y su subsecuente regeneración consume cuatro moléculas de ATP.

Dado que la PARS es una enzima nuclear abundante y que el NO además actúa sobre la cadena mitocondrial de transporte de electrones, su activación lleva a una rápida depleción de los depósitos de energía y a la muerte celular [15].

Clarificar el rol del NO[•] en la muerte celular radioinducida requiere estudios de la respuesta en los diferentes tipos de células.

En macrófagos peritoneales obtenidos de ratones irradiados con bajas dosis (4 cGy) de radiación gamma, ha sido reportado un aumento de la producción de NO[•] y de la actividad citolítica, aunque bajas dosis de irradiación *in vitro* no los activaban. [16]. Los mismos autores, trabajando *in vitro* con dosis altas (6Gy) encontraron que la irradiación gamma aumentó la expresión de la i-NOS y la producción de NO. Dado que ha sido descrito un factor de transcripción nuclear (NF-kB) que se une al promotor del gen de la iNOS, cuya expresión y unión es inducida por irradiación con rayos gammas y es bloqueada por antioxidantes, sugieren

que el aumento es atribuible a efectos en el DNA directamente por los rayos gamma e indirectamente a través de la formación de EAO, pero no a la oxidación de la membrana celular. [17]

Es bien conocida la radiosensibilidad de las células del sistema nervioso central (SNC) en desarrollo. Horas después de una irradiación total o cefálica con una dosis de 0.25 Gy, a una tasa de dosis de 0.2 Gy/min, ya es posible observar precursores en diferentes estadios de la muerte por apoptosis [18]. Numerosos trabajos demuestran la participación del NO en la muerte neuronal en diferentes desórdenes neurodegenerativos [19].

Por otra parte en células exquisitamente radiosensibles como son linfocitos y timocitos, que mueren por apoptosis en un periodo de horas luego de una exposición aun a bajas dosis, no se ha demostrado hasta el momento una participación del NO.

Siendo el NO por sus características una molécula que estimula nuestra imaginación, su rol en la muerte celular radioinducida, es un desafío más que queda planteado.

REFERENCIAS

- 1- OLIVE,P., DURAND,R: Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro Int. J. Radiat. Biol., 71(1997) 695-707
- 2- BLANK,K.R., RUDOLTZ,M., KAO,G., MUSCHEL,R., McKENNA,W., The molecular regulation of apoptosis and implications for radiation oncology, Int. J. Radiat. Biol. ,71 (1997) 455-466
- 3- SZUMIEL,I: Ionizing radiation-induced cell death. Int.J. Radiat. Biol., 66, (1994) 329-341
- 4- HAMOVITZ-FRIEDMAN,A., CHU-CHENG,K., FUKS,Z., KOLESNICK,R: Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J. Exp. Med., 180, (1994) 525-535
- 5- BUTTKE, T., SANDSTROM, P., Oxidative stress as a mediator of apoptosis. Immunol. Today, 15, (1994) 7-10
- 6- BRIEHL,M., BAKER,A. Modulation of the antioxidant defence as a factor in apoptosis. Death and Differentiation, 3, (1996) 63-70
- 7- RICHTER,C., Pro-oxidants and mitochondrial Ca, their relationship to apoptosis and oncogenesis. FEBBS Letts., 325, (1993) 104-107
- 8- SLATER,A., NOBEL,S., van den DOBBELSTEEN,D., ORRENIUS, S., Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. Toxicol. Lett., 82/83, (1995) 149-153
- 9- KOSHLAND,D.: The molecule of the year. Science, 258, (1992) 1268
- 10- BONFOCO,E., KRAINC, D., NICOTERA,P., LIPTON, S.: Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with NMDA or nitric oxide/superoxide in cortical cell culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 92, (1995) 7162- 7166
- 11- DAWSON,V., DAWSON,T., Free radicals and neuronal cell death . Death and Differentiation, 3 (1996) 71-78
- 12- CASTRO,L., RODRIGUEZ,M., RADI,R., Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. J. Biol. Chem., 269, (1994) 29409-29415
- 13- BOLANOS,J., HEALES,S., LAND,J.,CLARK,J., Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: Differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. J. Neurochem.,64, (1995) 1965-1972.
- 14- TAMIR,S., BURNEY,S.,TANNENBAUM,S., DNA damage by Nitric Oxide. Chem. Res. Toxicol., 9, (1996) 821-827
- 15- SZABO,C., DNA strand breakage and activation of poly-ADP ribosyltransferase:a cytotoxic pathway triggered by peroxynitrite. Free. Radic. Biol. Med., 21, (1996) 855-869
- 16- IBUKI,Y., GOTO,R., Augmentation of NO production and cytolytic activity of macrophages

- obtained from mice irradiated with a low dose of gamma-rays. *J. Radiat. Res.*, **36**, (1995) 209-220
- 17-IBUKI,Y.,GOTO,R. Enhancement of NO production from resident peritoneal macrophages by in vitro gamma irradiation and its relationship to reactive oxygen intermediates. *Free Radic. Biol. Med* **22**, (1997) 1029-1035
- 18- GUENEAU,G., BAILLE-LE CROM,V., COURT,I.,SABATTIER,R., Effets des rayonnements ionisants sur le système nerveux central en développement: aspects neurohistologiques. Effets Tératogènes des Rayonnements Ionisants. EDF- Comité de radioprotection N°6 1990, 29-33
- 19- The Neurobiology of NO[•] and OH[•]. *Annals of the New York Academy of Science*, Volume 738, 471 págs.