

EFFECTOS RADIOINDUCIDOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DESARROLLO

P. Gisone, D. Dubner, S. Michelin, y M del R Pérez
Autoridad Regulatoria Nuclear, Gerencia de Apoyo Científico, Buenos Aires, Argentina

Resumen

El embrión y el feto humano son particularmente sensibles a las radiaciones ionizantes y esta sensibilidad presenta variaciones cualitativas y cuantitativas en función del estado de desarrollo intrauterino. Fuera de la carcinogénesis radioinducida, el daño más grave que puede sobrevenir como consecuencia de una exposición prenatal en la especie humana es el retraso mental severo. El principal cuerpo de datos en humanos sobre efectos radioinducidos en el sistema nervioso central en desarrollo proviene de los estudios epidemiológicos realizados en individuos expuestos "in utero" durante las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki. Estas observaciones demostraron la existencia de un momento de máxima radiosensibilidad entre las semanas 8 y 15 de edad gestacional (e.g.), período en que tiene lugar la proliferación y migración neuronal. En el rango de las bajas dosis, donde adquieren relevancia los aspectos vinculados con la radioprotección y el establecimiento de límites de dosis tanto ocupacionales como del público, resulta particularmente importante poder determinar las características de la relación dosis-respuesta y la eventual existencia de un umbral para los efectos de la radiación sobre el SNC en desarrollo. Se estudió la generación de óxido nítrico (NO) y su relación con la producción de especies activas del oxígeno en cerebros de ratas expuestas "in utero" a dosis de hasta 1 Gy en el momento de máxima radiosensibilidad. Se discute su posible rol en el mecanismo de daño radioinducido en SNC en desarrollo.

1. INTRODUCCION

El sistema nervioso central (SNC), que en la vida adulta presenta una radiosensibilidad relativamente baja, resulta particularmente vulnerable a la acción de las radiaciones ionizantes en la vida prenatal. La exposición prenatal a radiaciones ionizantes puede causar una variedad de efectos sobre el sistema nervioso que pueden evidenciarse como microcefalia, retraso mental severo (RMS), disminución del rendimiento en tests de inteligencia, convulsiones y afectación del rendimiento neuromuscular.

La frecuencia de RMS en los individuos expuestos entre las semanas 8 y 15 de e.g. en Hiroshima y Nagasaki fue del orden del 40 % por Sv, observándose una frecuencia 4 veces menor en los individuos expuestos entre las semanas 16 y 25 de e.g. No hubo evidencias de RMS en los expuestos antes de la semana 8 ni después de la semana 25 de e.g. [1]. Las semanas 8 a 15 de e.g. corresponden al momento de máxima proliferación neuroblástica con un crecimiento de tipo exponencial. La mayor parte de los precursores neuronales culminan su multiplicación hacia el final de este período, iniciando un proceso de diferenciación. En esta etapa tiene lugar la migración neuronal, guiada a través de un tipo especial de células gliales con fibras elongadas: la glia radial. Sólo una variedad especial, las células granulares o microneuronas continúan teniendo actividad proliferativa hasta varios meses después del nacimiento en el cerebelo e hipocampo lo que explica la radiosensibilidad de estos tejidos aún al final de la gestación. Los fenómenos migracionales se combinan con fenómenos de muerte celular programada (apoptosis), esenciales para el normal desarrollo del cerebro y sus anexos. La secuencia de fenómenos debe respetar una adecuada correlación temporoespacial que asegure la posición final de las neuronas maduras, ya que las funciones del SNC dependen de la correcta disposición e interconexión de sus estructuras.

2- SNC EN DESARROLLO Y RADIACION

El efecto de las radiaciones ionizantes sobre el SNC en desarrollo podría explicarse a través de diferentes acciones: pérdida de la capacidad proliferativa de precursores neuronales y gliales, muerte de neuronas post-mitóticas en vías de diferenciación, muerte de las células de la glia radial con alteración de fenómenos migracionales, afectación de células gliales y disturbios en la formación de mielina, alteración del proceso de sinaptogénesis con afectación de las conexiones interneuronales.

La limitación de datos en humanos sobre irradiación prenatal ha inducido a la utilización de especies animales de ontogenia comparable en el intento de responder algunos interrogantes vinculados a los mecanismos subyacentes al daño radioinducido y la influencia de distintas variables tales como dosis, tasa de dosis y calidad de radiación.

La relación dosis-efecto para la inducción de RMS en el estudio de Hiroshima y Nagasaki no permite el ajuste de los datos a una función lineal o lineal cuadrática ni determinar la presencia de un umbral desde un punto de vista matemático. La diversidad de los fenómenos concurrentes tales como muerte celular, alteraciones migracionales y sinaptogénicas, que contribuyen a la inducción del RMS, hacen pensar que podría haber múltiples ajustes posibles. Se ha postulado que dosis mínimas del orden de los 0.1 Gy serían necesarias para inducir daño cerebral severo[2]. Estudios experimentales permitieron observar efectos más sutiles con dosis aún más bajas, del orden de los 0.05 Gy (disminución de la tasa de proliferación y diferenciación celular) en cultivos de cerebro de ratón expuestos a radiación beta [3] y hasta de 0.01 Gy (disminución de la masa encefálica) en ratas expuestas a neutrones de 600 keV en el período de máxima radiosensibilidad [4].

3. INJURIA OXIDATIVA Y OXIDO NITRICO

La producción de especies activas del oxígeno constituye el principal mecanismo indirecto de daño radioinducido en sistemas biológicos. La radiólisis de los sistemas acuosos genera un conjunto de moléculas altamente reactivas tales como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO\cdot$). El delicado equilibrio oxidativo celular es mantenido por la acción de sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. La alteración del equilibrio oxidativo desencadena una cascada de eventos autosostenidos que pueden llevar a la muerte celular.

Evidencias crecientes sostienen el concepto de que los fenómenos de stress oxidativo están implicados en la patogenia de numerosas enfermedades neurodegenerativas y en el daño radioinducido en el cerebro fetal [5]. En condiciones fisiológicas las estructuras fetales se encuentran sometidas a una baja presión parcial de oxígeno. El cerebro fetal contiene niveles relativamente bajos de antioxidantes resultando particularmente vulnerable al daño oxidativo. Por otra parte el alto contenido de lípidos, en particular ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), lo hace más susceptible de sufrir procesos de lipoperoxidación. La inducción de apoptosis mediada por injuria oxidativa sobre el ADN constituye uno de los principales mecanismos de daño radioinducido en este sistema.

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que cumple funciones de mensajero a nivel del SNC, implicado en procesos fisiológicos vinculados a la transducción de señales y la plasticidad sináptica, que incluyen la memoria y el aprendizaje. La enzima óxido-nítrico sintasa (NOS), que cataliza la síntesis de NO, se encuentra selectivamente distribuida en el 1 al 2 % de las neuronas del cerebro adulto. Su concentración es mayor a nivel de las neuronas del cerebelo. Las células gliales, particularmente los astrocitos, son la fuente principal de NO en el SNC. En el cerebro en desarrollo la cantidad y distribución de células que contienen NOS es variable de acuerdo a la edad gestacional. Se ha sugerido que el NO podría jugar un rol esencial en el proceso de sinaptogénesis.

El NO opera como un mensajero retrógrado: una vez producido en la terminal post-sináptica difunde fácilmente a la terminal pre-sináptica, ejerciendo así un control de la neurotransmisión. Dependiendo de su concentración y de su estado de óxido-reducción el NO puede ejercer funciones neuroprotectoras o neurotóxicas. Una cascada de señales que involucran al glutamato, uno de los principales neurotransmisores excitatorios del SNC, con la producción de NO, activación de

guanilatociclasa y producción de un segundo mensajero, el guanosin monofosfato cíclico (GMPc) regula la transmisión sináptica en el cerebro. En ciertas condiciones patológicas la excesiva activación de los receptores NMDA mediada por el glutamato conduce a una secuencia de eventos neurotóxicos conocidos como excitotoxicidad. Bajo ciertas condiciones el NO puede reaccionar con el O_2^- generando un agente oxidante extremadamente tóxico: el peroxinitrito ($ONOO^-$). En concentraciones fisiológicas de NO la tasa de formación de $ONOO^-$ no es significativa. Pero en situaciones en las que hay una producción excesiva de NO con alta disponibilidad de O_2^- , podría resultar altamente neurotóxico [6].

Los conceptos señalados conducen a la idea de que stress oxidativo y excitotoxicidad son eventos interdependientes que se potencian mutuamente para producir daño neuronal. Ambos fenómenos han sido descritos en desórdenes muy variados como la isquemia cerebral, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, epilepsia y otras [7] [8].

4-DESCRIPCION DEL TRABAJO

El objetivo del trabajo se orientó al estudio del rol del NO en el daño radioducido en el SNC en desarrollo y su relación con parámetros de stress oxidativo en un modelo experimental de irradiación prenatal a bajas dosis de radiación gamma.

Se irradiaron lotes de ratas Wistar preñadas el día 17 de e.g. con dosis de 0.4, 0.7 y 1 Gy (fuente de Co 60, tasa de dosis 0.23 Gy/min). Se disecaron los cerebros fetales los días 17 y 18 de e.g. (1 h, 6 hs y 24 hs post-radiación), y los días 2 y 9 de vida post-natal en lotes irradiados y controles. Luego de su homogeneización las muestras fueron centrifugadas y los sobrenadantes conservados para la realización de los distintos ensayos.

a) *Enzimas antioxidantes*: se midió la actividad de superóxido dismutasa (SOD) por espectrofotometría a 480 nm, a través de la tasa de inhibición de la formación de adrenocromo. La actividad de NADPH-diaforasa se determinó espectrofotométricamente a 600 nm con el agregado de NADPH como dador de electrones y DCPIP como aceptor.

b) *Enzimas vinculadas con el metabolismo del NO*: se determinó actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) a través de la tasa de formación de citrulina a partir de L-[3H]arginina. La actividad de guanilatociclasa se determinó midiendo la formación de GMPc a partir de [^{32}P]GTP.

c) *Radical ascorbilo*: se determinó concentración de radical ascorbilo por resonancia paramagnética electrónica.

c) *Lipoperóxidos*: Se determinó la concentración de sustancias reactantes al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Se observó aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes y del nivel de lipoperóxidos en muestras de 0.7 y 1 Gy respecto de los controles. Un incremento en la actividad de enzimas vinculadas al metabolismo del NO se observó solo en las muestras de 1 Gy. No se observaron diferencias significativas en la concentración de radical ascorbilo en los tiempos estudiados.

6-DISCUSSION

El aumento en la actividad de enzimas antioxidantes en las muestras de cerebro expuestas a dosis más altas revela la implicancia de la especies activas del oxígeno en el sistema estudiado. Su correlación con la actividad de enzimas vinculadas al metabolismo del óxido nítrico sugiere una vinculación de ambas vías en el mecanismo de daño radioinducido. El incremento en los niveles de lipoperóxidos, evidenciable en las muestras tomadas más tardíamente, durante la vida postnatal, podría relacionarse con una afectación de las estructuras lipídicas ocurrida como consecuencia de la exposición prenatal. Con el objeto de testear la hipótesis de que el stress oxidativo y la excitotoxicidad podrían ser fenómenos secuenciales e interactivos en la patogenia de la injuria radioinducida en SNC en desarrollo hemos comenzado irradiaciones "in vitro" de cultivos primarios de cerebro que permitirán estudiar los efectos radioinducidos y su relación con un conjunto de

variables tales como : respuesta del sistema a la incubación con antioxidantes (ácido lipoico, SOD), bloqueantes de receptores postsinápticos (MK-801) , bloqueantes de canales de calcio (nimodipina) e inhibidores de la NOS (L-NAME y gangliósidos). Se estudiará nitración de proteínas mediante técnica de inmunomarcación con anticuerpos antinitrotirosina y concentración de nitrito y nitrato en los sobrenadantes de cultivos .

REFERENCIAS

- [1] ICRP60, Comisión Internacional de Protección Radiológica Recomendaciones (SEPR, Ed, 1990)
- [2] UNSCEAR Report (Sources and effects of ionizing radiation) Anex H : “Radiation effects on the developing brain” (U.N. De, 1993)
- [3] B. WANG, K. WATANABE, T. YAMADA AND A. SHIMA “Effects of beta-radiation from organically bound tritium on cultured mouse embryonic mid brain cells” in Health Physics 71(6) 915-921 (1996)
- [4] H. REYNERS, E. GIANFELICI, F. POORTMANS, A CRAMETZ, H COFFIGNY AND J.R. MAISIN “Brain atrophy after foetal exposure to very low doses of ionizing radiation” in Int. J. Radiat. Biol. 62 (5) 619-626 (1992)
- [5] P. GISONE, D. DUBNER, M DEL R. PEREZ AND I. JAITOVICH “Radioinduced oxidative stress in the developing brain” (Proceedings Int. Congress of Radiation Research, vol 1, 1995)
- [6] J.S. BECKMAN “Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the rol of nitric oxide in superoxyde-dependent cerebral injury”(Annals of the N.Y. Academy of Sciences , vol 738, 69-75) (B.M.Boland, Ed 1994)
- [7] S VINCENT in: Nitric oxide in the nervous system (King’s College, London) 317 pags (Academic Press Ed, 1995)
- [8] V.L.DAWSON AND T.M. DAWSON “Free radicals and neuronal death” Cell Death and Differentiation (Vol 3) 71-78 1996