

Modulación de Enzimas Antioxidantes como Mecanismo Radioprotector de Oligoelementos y Lachesis muta en Tejidos Normales

E. Crescenti, M. Croci

*Instituto de Inmunooncología, Córdoba 3200, Buenos Aires, Argentina. E-mail:
crescentilab@fibertel.com.ar*

N. Mohamad, V. Medina, L. Sambuco, A. Gutiérrez, M. Núñez, G. Martín, G. Cricco, R. Bergoc, E Rivera.

*Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956. Buenos Aires. Argentina. E-mail:
erivera@ffyb.uba.ar*

Resumen

El empleo terapéutico de las radiaciones ionizantes (RI) ha adquirido gran relevancia en las últimas décadas aunque sus efectos no son selectivos y se manifiestan también sobre los tejidos normales. En trabajos previos demostramos el efecto radioprotector que la combinación de oligoelementos Zinc, Selenio y Manganeso asociados al veneno de serpiente Lachesis muta (O-LM) ejerce sobre el intestino delgado y la médula ósea de ratón irradiado. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos moleculares, y particularmente el papel de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasas (MnSOD y Cu/ZnSOD), Catalasa (CAT), y Glutathion Peroxidasa (GPx), en la acción radioprotectora que ejerce la combinación O-LM.

Se utilizaron cuatro grupos de ratones: A) control; B) tratados con O-LM; C) irradiados; D) irradiados y tratados con O-LM. Los dos grupos tratados fueron inyectados diariamente vía s.c. con 0,1 ml de O-LM desde 30 días antes de la irradiación y hasta 4 días después. Los dos grupos irradiados recibieron 10 Gy en cuerpo entero el día 30. El día 35 todos los animales fueron sacrificados. Los cortes histológicos de la mucosa intestinal se evaluaron por tinción con hematoxilina-eosina; la presencia de células apoptóticas se determinó por el método Tunel (*Apoptag* kit); la expresión de PCNA (antígeno nuclear de células proliferantes), MnSOD, CuZnSOD, CAT y GPx, por inmunohistoquímica. Los resultados demostraron que en el lote D se preservó totalmente la histología de la mucosa intestinal. En el control A se observó expresión de PCNA en las criptas, de MnSOD en las vellosidades y CuZnSOD, CAT y Gpx en ambos. El cambio producido por O-LM (grupo B) fue el aumento de PCNA, de CAT y la aparición de MnSOD en las criptas. Por otra parte, la irradiación (C) produjo un marcado descenso en la GPx, la completa desaparición de PCNA y un aumento de las células apoptóticas. El grupo D mostró que O-LM revirtió totalmente el efecto de la RI sobre la expresión de PCNA, disminuyó el número de células apoptóticas y aumentó la expresión de CAT y CuZnSOD en vellosidades y criptas. Concluimos que el tratamiento con O-LM modula la expresión de enzimas antioxidantes, aumenta la expresión de PCNA e inhibe la apoptosis. De esta forma el tratamiento con O-LM aumenta la proliferación y la capacidad antioxidante de la mucosa intestinal, acelerando la reparación del daño y ejerciendo de este modo un eficaz efecto radioprotector. Estos resultados avalan el potencial empleo de O-LM en pacientes sometidos a terapia radiante.

Tema: Aplicaciones médicas.

1. INTRODUCCIÓN

La radioterapia es uno de los tratamientos más ampliamente utilizados para el cáncer, pudiendo aplicarse sola o combinada con otras terapias. Su toxicidad se da no sólo contra las células tumorales sino también contra los tejidos sanos, sobre todo para aquellos que presentan alta tasa de proliferación, lo cual deriva en efectos adversos para el paciente. El mejoramiento de las actuales terapias puede lograrse mediante el desarrollo de drogas radioprotectoras que reduzcan los efectos deletéreos de la radiación sin afectar su efectividad antitumoral.

En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la combinación O-LM compuesta por los oligoelementos Selenio, Zinc y Manganeso (4 µg/ml) más veneno de *Lachesis muta* (4 ng/ml), ejerce un marcado efecto antitumoral tanto en tumores experimentales como en células en cultivo [1]. El tratamiento de pacientes humanos con distintos tipos de neoplasias produce un significativo aumento de la sobrevida [2]. Asimismo hemos reportado un efecto protector de este tratamiento frente a altas dosis de quimioterapia que se ejerce selectivamente sobre los tejidos normales [3]. En forma similar, estudios previos demuestran un efecto radioprotector selectivo producido por O-LM frente a altas dosis de radiación ionizante [4].

El objetivo de este trabajo fue investigar los mecanismos involucrados en el efecto radioprotector de O-LM en la mucosa del intestino delgado de ratones. Para ello se estudiaron las características histológicas del tejido, la presencia de células apoptóticas, la expresión de PCNA y de enzimas antioxidantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Modelo *in vivo*. Ratones nude.

Se empleó como modelo para la evaluación de los efectos biológicos de la radiación el modelo de observación histopatológica de criptas intestinales al quinto día post-irradiación en cuerpo entero del animal. Se utilizaron 24 ratones nude separados en cuatro grupos experimentales: A) control; B) tratados con O-LM; C) irradiados; D) irradiados y tratados con O-LM. Los dos grupos tratados fueron inyectados diariamente vía s.c. con 0,1 ml de O-LM desde 30 días antes de la irradiación y hasta 4 días después. Los dos grupos irradiados recibieron 10 Gy a cuerpo entero el día 30. El día 35 todos los animales fueron sacrificados por desnucamiento

2.2. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

Las muestras de intestino delgado se extrajeron, se abrieron por el borde mesentérico, se extendieron y estaquearon sobre placas de aglomerado que se sumergieron en formol buffer al 5 %. Las muestras se procesaron rutinariamente y se hicieron cortes de 3 micrones para su tinción con hematoxilina-eosina; determinación de células apoptóticas por el método Túnel (*Apoptag* kit); expresión de PCNA (Dako (Cytomation Clone PC10, Code No M 0879), superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD) (Calbiochem cat No. 574597), superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) (Calbiochem cat No. 574596), catalasa (CAT) (Sigma Clone CAT-505, No C0979) y glutatión peroxidasa (GPX) (Calbiochem cat No. ST1000), por inmunohistoquímica utilizando los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa y revelados con DAB.

Los cortes histológicos de rutina fueron además evaluados con análisis morfológico y recuento de criptas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Zeiss Axiolab y cámara Canon Power Shot G5.

2.3. Fuente de Irradiación.

Para la irradiación de los animales se utilizó una fuente de ^{137}Cs de 189 TBq y tasa de dosis 7.7 Gy/min (CEBIRSA, Buenos Aires, Argentina). Este equipo (IBL 437C tipo H número 90330) es calibrado y certificado periódicamente por la Autoridad Regulatoria Nuclear con un TLD 700 en polvo contenido en cápsulas de polietileno.

3. RESULTADOS

3.1. Resultados de los estudios histológicos

Los resultados demuestran que el tratamiento con O-LM no produjo ningún signo de alteración histológica respecto de la mucosa sin tratar, por el contrario evidenció un ligero aumento en el número de criptas (fig. 1, 2). El lote irradiado no tratado por su parte mostró importantes lesiones estructurales y anomalías nucleares (fig.3), mientras que el tratamiento con O-LM fue capaz de preservar casi totalmente la estructura histológica normal de la mucosa intestinal frente a los efectos de la radiación ionizante (fig.4). Estos resultados se resumen en la Tabla I.

Tabla I: Evaluación histológica de los cambios producidos en la mucosa de intestino delgado por la irradiación con 10 Gy y el tratamiento con O-LM

Lote	Trofismo de la mucosa	Número promedio de criptas / 0,5 cm	Ulceración de la mucosa	Cambios nucleares y citoplasmáticos	Edema de las vellosidades	Daño vascular
Control	Normal	110	Ausente	Ausentes	Ausente	Ausente
O-LM	Normal	135	Ausente	Ausentes	Ausente	Ausente
10 Gy	Marcada atrofia	45	Severa	Anisocariosis anisocitosis marcadas	Presente intenso	Presente
O-LM + 10 Gy	Leve atrofia	87	Leve	Leve anisocariosis	Ausente	Ausente

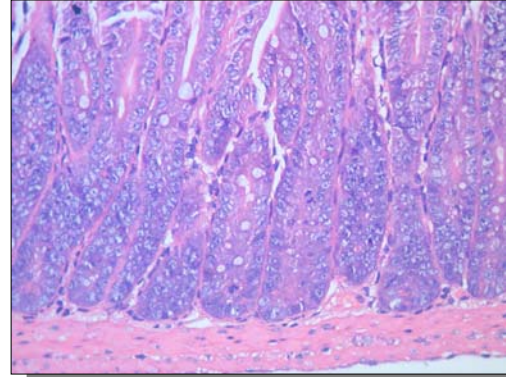
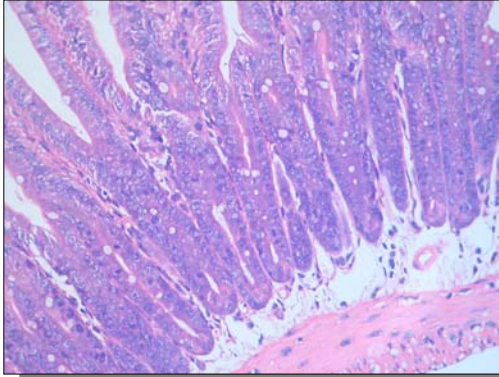


Figura 1. Control sin irradiar sin tratar mostrando mucosa con número y morfología normal de criptas y vellosidades. (H.E. 400x)

Figura 2. Ratón tratado con O-LM sin irradiar con conservación de la histología normal. (H.E. 400x)

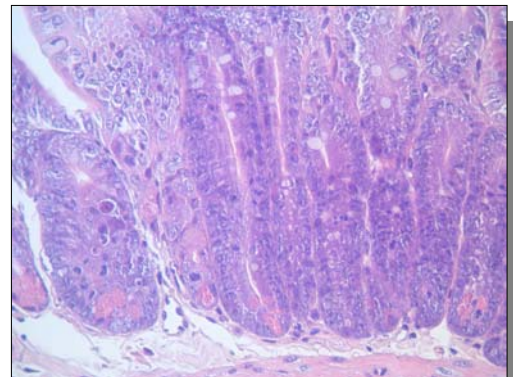
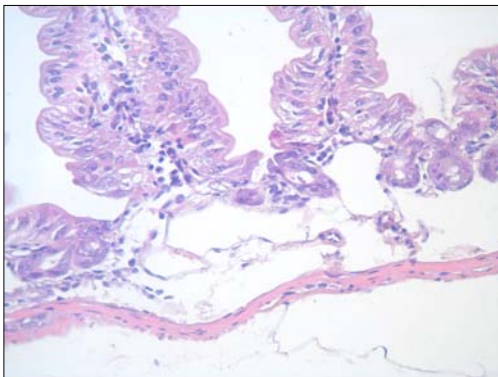


Figura 3. Control de irradiación con 10 Gy, evidenciando grave alteración de la mucosa con pérdida de criptas y vellosidades, con congestión y edema del corion. (H.E. 400x)

Figura 4. Ratón tratado con O-LM e irradiado con 10 Gy en el que se observa buena preservación de criptas y vellosidades. (H.E. 400x)

3.2 Estudios inmunohistoquímicos

En el lote control A se observó la marcada expresión de PCNA en las criptas intestinales (fig.5) y el cambio producido por el tratamiento con O-LM (grupo B) fue el aumento de la expresión (fig. 6). Por su parte el efecto de la RI resultó en la desaparición casi completa de células positivas para PCNA (fig.7) que fue totalmente revertido por el tratamiento con O-LM (fig.8).

La determinación de las células apoptóticas fue coincidente con estos resultados, solo se observaron un número significativo en los intestinos de los ratones irradiados (fig. 9). El tratamiento con O-LM mostró ausencia total de apoptosis tanto en el grupo B como en el lote tratado e irradiado con 10 Gy (fig.10).

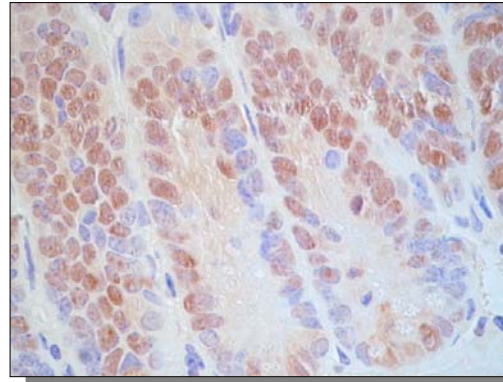
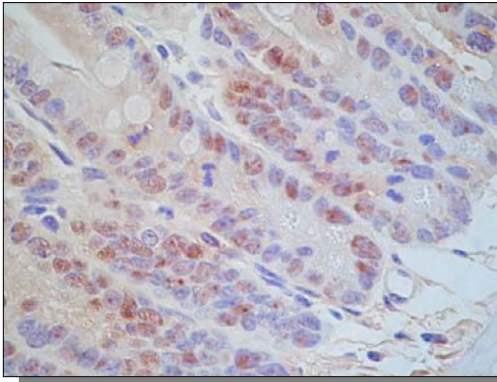


Figura 5. Marcada positividad en criptas de la mucosa para PCNA en ratón control sin irradiar y sin tratar. (PCNA 630x). Figura 6. Intensa positividad para PCNA en mucosa de ratón tratado con O-LM. (PCNA 630 x)

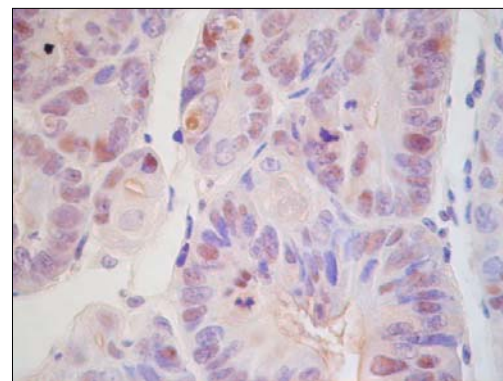
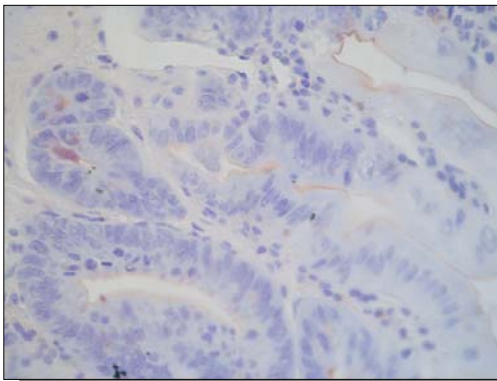


Figura 7. Mucosa intestinal con ausencia casi completa de células positivas para PCNA en ratón irradiado con 10 Gy. (PCNA 630x) Figura 8. Conservación del número de células teñidas para PCNA en criptas de intestino de ratón irradiado y tratado con O-LM. (PCNA 630x)

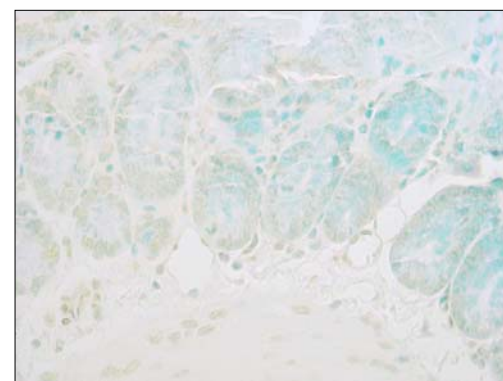
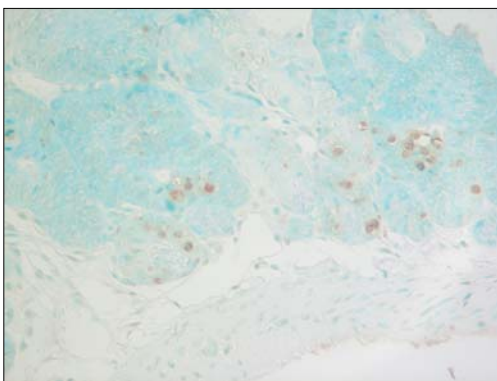


Figura 9. Control de irradiación con 10 Gy, mostrando numerosas células en apoptosis en los fondos de las criptas. (Apoptag 400x) Figura 10. Ratón tratado con O-LM e irradiado con 10 Gy, en el que no se observan elementos apoptóticos. (Apoptag 400x)

Las enzimas antioxidantes fueron detectadas en todos los grupos y su expresión se modificó tanto por la irradiación como por el tratamiento con O-LM. La CAT se encontró presente en muy baja concentración tanto en criptas como en vellosidades. El tratamiento con O-LM produjo un ligero incremento de su expresión, que se mantuvo a pesar de la irradiación. En contraposición los lotes irradiados no tratados mostraron ser similares a los controles (fig. 11, 12). La CuZnSOD se expresó significativamente en las vellosidades de los animales control. Tanto la irradiación como el tratamiento O-LM no produjeron cambios o una leve disminución en las vellosidades. En los animales irradiados y simultáneamente tratados con O-LM se produjo un aumento de la positividad en las vellosidades y su aparición en las criptas (fig. 13 a 16). La MnSOD está intensamente presente en las vellosidades de los lotes control, pero ausente en las criptas; el tratamiento con O-LM indujo su aparición en las criptas. La irradiación produjo una disminución de la expresión vellositaria que fue revertida por el tratamiento con O-LM, que al mismo tiempo generó la aparición de la enzima en las criptas intestinales (fig. 17 a 22). Por último, la GPx estuvo presente en moderada concentración en los animales sin irradiar. La irradiación produjo la desaparición total de la enzima, efecto escasamente revertido por el tratamiento.

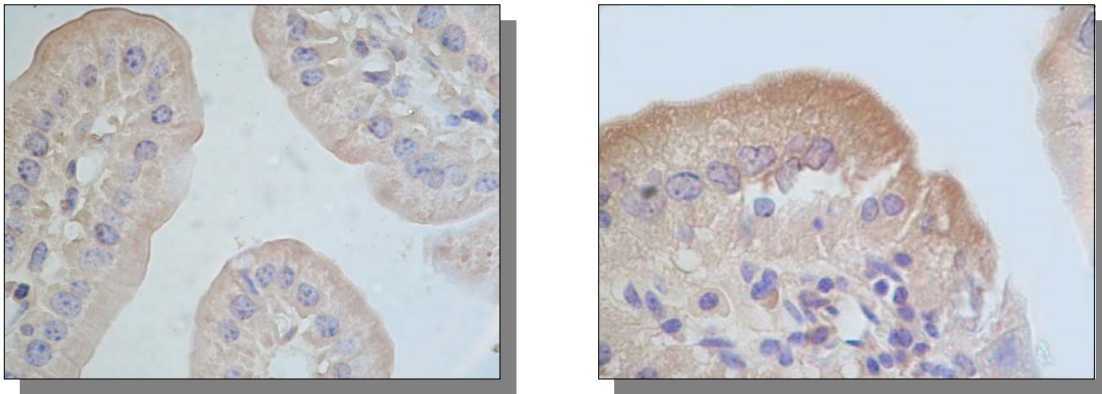


Figura 11. Control de irradiación con 10 Gy, mostrando escasa expresión de catalasa en vellosidades remanentes. (Catalasa 630x) Figura 12. Ratón tratado con O-LM e irradiado con 10 Gy, marcada positividad para catalasa en vellosidades intestinales. (Catalasa 630x)

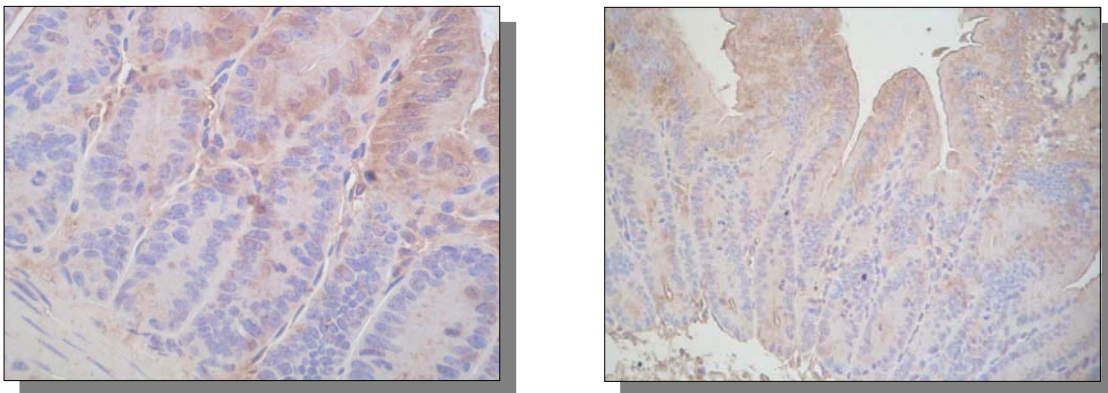


Figura 13. Ausencia de expresión de CuZnSOD en criptas de intestino delgado de ratón no irradiado ni tratado. (CuZnSOD 400x). Figura 14. Preservación de las características normales de expresión de CuZnSOD en intestino de ratón tratado con O-LM no irradiado. (CuZnSOD 400x)

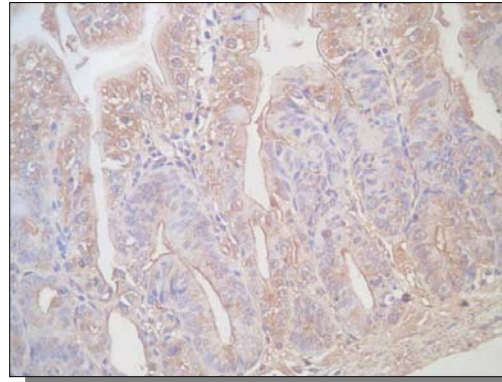
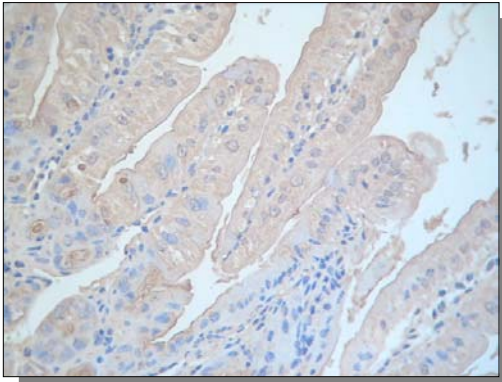


Figura 15. Moderada expresión de CuZnSOD en mucosa intestinal de ratón irradiado sin tratamiento. (CuZnSOD 400x) Figura 16. Conservación de la expresión de la enzima en las vellosidades del intestino de ratón tratado con O-LM e irradiado en un grado similar al control. (CuZnSOD 400x)

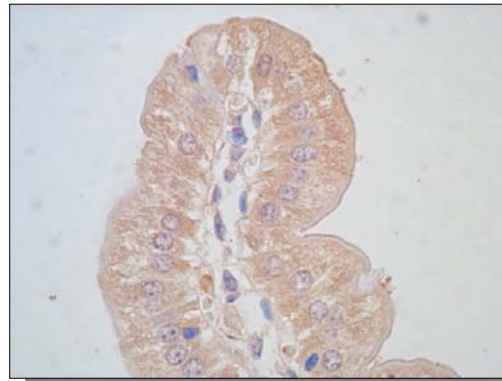
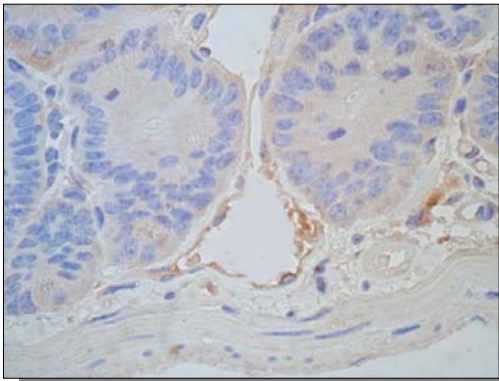


Figura 17. Escasa o nula expresión de MnSOD en criptas de intestino de ratón control. (MnSOD 630x) Figura 18. Marcada expresión de MnSOD en vellosidades de intestino de ratón control. (MnSOD 630x)

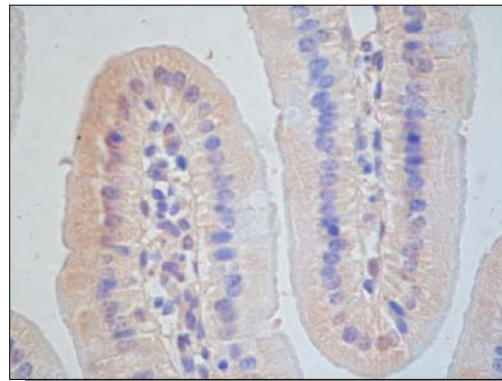
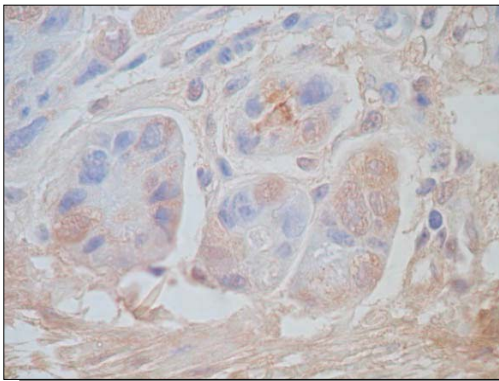


Figura 19. Escasa expresión de MnSOD en criptas de intestino de ratón tratado con O-LM sin irradiar. (MnSOD 400x) Figura 20. Moderada expresión de MnSOD en vellosidades de intestino de ratón tratado con O-LM sin irradiar. (MnSOD 400x)

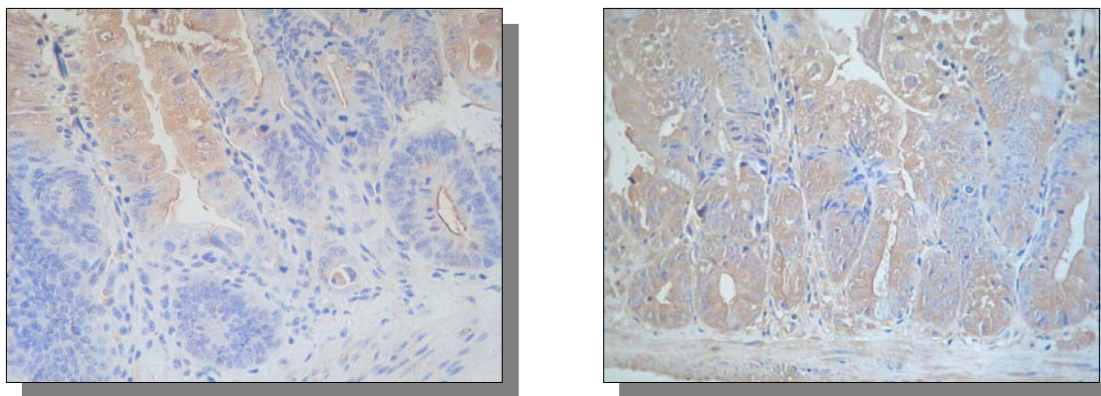


Figura 21. Relativa conservación de la expresión de MnSOD en vellosidades de intestino de ratón irradiado con 10 Gy, a pesar de la marcada desestructuración histológica de la mucosa. (MnSOD 400x). **Figura 22.** Persistencia de la expresión de MnSOD en las vellosidades de intestino de ratón irradiado con 10 Gy y tratado con O-LM. Se observa además aparición de positividad en la profundidad criptas. (MnSOD 400x).

Tabla II: Hallazgos de los estudios inmunohistoquímicos en mucosa intestinal de ratón control, irradiado con 10 Gy y tratado con O-LM.

Intestino	PCNA	<i>Apoptag</i>	Catalasa	GPx	CuZnSOD	MnSOD
Control sin irradiar	+++ en criptas	++ en extremos vellositarios	+ en vellosidades	++	+++ en vellosidades	++++ en vellosidades
O-LM	+++ en criptas	+ en extremos vellositarios	++ en vellosidades	++	++ en vellosidades	++++ en vellosidades + en criptas
Irradiado 10 Gy	-	++++ en toda la mucosa	+ en vellosidades	-	++ en vellosidades	++ en vellosidades
O-LM + 10 Gy	+++ en criptas	-	++ en vellosidades	+	+++ en vellosidades + en criptas	++++ en vellosidades + en criptas

4. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos podemos concluir que la combinación terapéutica O-LM es un efectivo radioprotector del intestino delgado, uno de los tejidos más radiosensibles del organismo. La radiación ionizante activa distintos puntos de control del ciclo celular, así como también desencadena vías apoptóticas en las células epiteliales y en células madre, mientras que las células del microentorno responden alterando su producción de citoquinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno [5, 6]. El efecto protector de O-LM frente a la radiación ionizante se relaciona con la modulación de las enzimas antioxidantes, con un aumento de la proliferación y reparación celular y con una disminución de la apoptosis. El aumento de la expresión de PCNA así como el aumento del número de criptas observado en los ratones tratados indican el efecto positivo de O-LM sobre la proliferación de células normales, y es coincidente con resultados reportados anteriormente donde se describe el efecto selectivo de esta medicación [3]. Estudios *in vitro* empleando distintas líneas celulares humanas normales y malignas, demostraron que la combinación O-LM inhibe significativamente la proliferación de las células transformadas mientras que estimula el crecimiento de las células normales [7]. El tratamiento previo con O-LM en ratones irradiados a cuerpo entero, produjo un aumento de la expresión de las enzimas MnSOD y CuZnSOD en las criptas intestinales. A su vez, se observó un incremento en la CAT y GPx, sugiriendo que el balance final es una disminución en los niveles de peróxido de hidrógeno, un potente oxidante que puede resultar altamente tóxico para las células. Es de destacar que a los tiempos evaluados, la RI no modificó la expresión de la de la enzima CAT. Estudios posteriores serán necesarios para determinar si hay variación de su actividad y/o si la modificación de su expresión se produce a otros tiempos experimentales. El efecto radioprotector se complementa con un aumento de células positivas para PCNA y desaparición de células apoptóticas lo que indica que O-LM puede acelerar la reparación de la mucosa intestinal después de la exposición a la RI. Estos resultados muestran claramente la capacidad de O-LM de disminuir el daño celular producido por la RI en tejidos normales y se complementa con su capacidad de aumentar la radiosensibilidad de las células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro* previamente descrito [8]. Es importante destacar que esta respuesta se observa con las mismas dosis con las que se obtiene el efecto terapéutico y que carece totalmente de toxicidad. Finalmente podemos concluir que esta característica de radioprotector selectivo de O-LM representa una importante aplicación clínica de este tratamiento para proteger a los tejidos normales en todos aquellos pacientes sometidos a un protocolo de terapia radiante.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica de Alejandro Paredes.

Este trabajo fue financiado por los aportes de la Fundación Ernesto Crescenti.

REFERENCIAS

1. Crescenti E., Bergoc R., Croci M., Medina V., Cricco G., Martín G., Garbarino G., Núñez M., Rivera E., "Molecular mechanism underlying the inhibitory action on tumor growth produced by the combination of Zn, Se and Mn plus Lachesis Muta", *Anticancer Res*, **24(5D)**, p. 3434-3435 (2004).
2. Crescenti E., Alegre E., Pereyra G., Croci M., "Novell Treatment For Advanced Pancreatic Cancer, 73 Patients 10 Years Follow", *Int J Cancer*, **S13**, p. 245 (2002).
3. Crescenti E.J.V, Croci M., Rivera E., Bergoc R., "Enhanced tolerance to high cytostatic doses by means of Oligoelements Zn, Se and Mn plus Lachesis Muta Venom. *In Vivo* and *In Vitro* Studies", *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **16**, p. 39-53 (2003).
4. Crescenti E., Croci M., Bergoc R., Rivera E., "Enhanced tolerance to high doses of ionizing radiation or chemotherapy by oligoelements plus Phospholipase A2", Proceedings of the 17th International

- Cancer Congress, UICC, Río de Janeiro, Brasil, Eds (M. Moraes, R. Brentani, R. Bevilaqua), **2**, p. 1495-1499 Bologna, Italia (1998).
5. Barcellos-Hoff M. H., Park C., Writgth E., "Radiation and the microenvironment-tumorigenesis and therapy", *Nature Reviews*, **5**, p. 867-874 (2005).
 6. G. Iliakis, Y Wang, J Guan, H Wang, "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation", *Oncogene*, **22**, p. 5834-5847 (2003).
 7. Crescenti E., Rivera E.S., Croci M, Cricco G., Martín G., Bergoc R., "Effect Of Oligoelements Se, Zn and Mn plus Lachesis Muta on Panc-1 cell line growth. *In Vitro* and *In Vivo* Studies, *Int J Cancer* **S13**, p. 193 (2002).
 8. Crescenti E., Croci M., Rivera E., Cricco G., Martín G., Medina V., Mohamad N., Nuñez M., Sambuco L., Bergoc R., "Oligoelements Se, Zn and Mn plus Lachesis Muta as radioprotectors of normal tissues and radiosensitizers of malignant cells", editado en soporte magnético por la International Radioprotection Association (IRPA), CD 825, code 1-4 (2004).