

Mecanismos Involucrados en el Efecto Radioprotector del Factor de Crecimiento Tipo Insulínico-1 (IGF-1) en la Mucosa del Intestino Delgado.

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

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

M. Croci, E. Crescenti

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

Resumen

El empleo de terapias radiantes en tejidos malignos presenta el inconveniente de afectar también a los tejidos sanos, sobre todo cuando éstos presentan una alta tasa de proliferación como en el caso de la mucosa del intestino delgado. El factor de crecimiento de tipo insulínico-1 (IGF-1) ha sido señalado como un posible protector de tejidos normales en condiciones de irradiación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del IGF-1 como radioprotector de la mucosa del intestino delgado en ratones irradiados con 10 Gy a cuerpo entero, determinando las características histológicas del tejido, la presencia de células apoptóticas, la expresión de antígeno de proliferación celular (PCNA) y de enzimas antioxidantes.

Se utilizaron cuatro grupos de ratones: control, tratados con IGF-1, irradiados e irradiados y tratados con IGF-1. Los dos grupos tratados fueron inyectados subcutáneamente con dos dosis por día de 2.5 µg de IGF-I /0.1ml durante cuatro días (días 1 a 4). Los dos grupos irradiados recibieron 10 Gy a cuerpo entero el día 2. El día 5 todos los animales fueron sacrificados y se obtuvieron cortes de la mucosa del intestino delgado. Los cortes histológicos se evaluaron por tinción con hematoxilina-eosina; la presencia de células apoptóticas se determinó por el método Tunel (*Apoptag* kit); la expresión de PCNA, superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZnSOD), superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), por inmunohistoquímica.

Los resultados demostraron que el tratamiento con IGF-1 preservó parcialmente la histología de la mucosa del intestino, la expresión de PCNA y la presencia de células apoptóticas en las criptas frente a la irradiación. La CuZnSOD se expresó sobre todo en las vellosidades y, en menor medida, en las criptas aumentó en el grupo IR+IGF-1. El IGF-1 produjo la expresión de MnSOD en las criptas y en las vellosidades intestinales. La expresión de CAT en las vellosidades aumentó significativamente en el grupo tratado con IGF-1 e irradiado, con respecto a los demás grupos.

Concluimos que el tratamiento con IGF-1 induce la reparación y/o proliferación en la mucosa intestinal irradiada, previene la muerte celular apoptótica y modula positivamente la expresión de enzimas antioxidantes, actuando de este modo como radioprotector de la misma.

1. INTRODUCCIÓN

A partir del descubrimiento de los rayos X por Roentgen en 1895 se abrió el enorme campo de las aplicaciones de las radiaciones ionizantes, especialmente en la medicina. Años más tarde tanto Becquerel como los esposos Curie, experimentaron serios problemas de salud debido a la manipulación de sales de radio que empleaban en sus investigaciones. Así nació la investigación de los efectos biológicos de las radiaciones y más adelante su aplicación en el tratamiento de distintos tipos de tumores malignos [1, 2].

Es sabido que algunos de los efectos biológicos que ocurren a nivel celular son las lesiones subcelulares, las aberraciones cromosómicas, el alargamiento del ciclo celular, el retraso en la entrada en mitosis, la muerte celular o apoptosis [1, 2]. Se entiende por *muerte celular* la pérdida irreversible de la capacidad reproductiva o de proliferación de la célula. Esta definición adquiere gran relevancia en la radioterapia puesto que un tumor estará localmente controlado si todas sus células han perdido su capacidad de dividirse indefinidamente y por lo tanto de invadir otros tejidos [1]. Uno de los desafíos aún planteados en la radioterapia es la posibilidad de contar con sustancias radiosensibilizantes para las células malignas y radioprotectoras para las células normales; es decir, sustancias capaces de modular selectivamente la radiosensibilidad celular.

Teniendo en cuenta los antecedentes positivos en cuanto a la preservación de la mucosa del intestino delgado ejercida por el factor de crecimiento insulínico tipo-1 (IGF-I) en la sepsis [3], en ratas normales [4] y en la enteritis por radiación [5], nos parece importante estudiar los mecanismos oxidativos, de apoptosis y proliferación celular en intestinos irradiados con dosis que superan ampliamente las utilizadas normalmente en fraccionamiento de radioterapia en pacientes humanos.

Se ha reportado que las especies reactivas del oxígeno (ROS) juegan un importante rol en la acción de la radiación ionizante [6]. Si bien el daño primario generado por el efecto directo sobre las moléculas de agua con la consecuente formación de radicales libres es imposible de evitar, el daño secundario dependiente del estado oxidativo celular es posible de modificar a través de tratamientos que influyan sobre las enzimas que lo regulan. Las superóxido dismutasas (SODs), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), son enzimas atraparadoras de radicales libres que defienden a la célula del stress oxidativo. Los radicales libres generados post-irradiación son detoxificados por dichas enzimas. Los agentes radioprotectores actuarían por competencia con el oxígeno o por aumento de la reparación del daño inducido por radiación. Por otro lado, los radiosensibilizadores incrementan los efectos letales de la irradiación. Es aún un desafío el desarrollo de compuestos que radiosensibilicen a las células malignas y radioprotejan a las células normales.

Se han planteado diversos modelos de estudio para comprender la biología de los tumores y conocer su sensibilidad a las radiaciones ionizantes: a) modelos *in vitro*, empleando líneas celulares en cultivo irradiadas en distintas condiciones y en combinación con distintas drogas b) modelos *in vivo*, empleando animales de laboratorio (ratas o ratones de distintas cepas, incluidos ratones nude), irradiados a cuerpo entero o bien irradiados localmente en tumores desarrollados experimentalmente [7, 8, 9, 10, 11] Nosotros hemos elegido para nuestra experiencia el de irradiación a cuerpo entero [9].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del IGF-1 como radioprotector de la mucosa del intestino delgado en ratones irradiados con 10 Gy a cuerpo entero, determinando las características histológicas del tejido, la presencia de células apoptóticas, la expresión de antígeno de proliferación celular (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 tercer día post-irradiación a cuerpo entero, empleándose 20 animales repartidos en 4 lotes de 5 ratones cada uno. Los lotes tratado con IGF-1 se inyectaron dos veces al día cada doce horas con una dosis de 2.5 µg de IGF-I /0.1ml (human recombinant IGF-1Sigma). Uno de los lotes fue sometido a irradiación con 10 Gy al segundo día de tratamiento. Otro de los lotes fue irradiado sin tratamiento y el último se utilizó como control sin irradiar y sin tratar. Al tercer día post-irradiación se sacrificó los animales por desnucamiento e inmediatamente se extrajo las muestras de intestino delgado, extendiéndose y estaqueándose sobre placas de aglomerado que inmediatamente se sumergen en formol buffer al 5 %.

Las muestras se procesaron rutinariamente y se hicieron cortes de 3 micrones para su tinción con hematoxilina-eosina; la determinación de células apoptóticas se realizó por el método Tunel (*Apoptag* kit) y 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 revelado 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.

2.2. Fuente de Irradiación.

Para la irradiación de los animales se utilizó una fuente de ¹³⁷Cs 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 Argentina con un TLD 700 en polvo contenido en cápsulas de polietileno.

3. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en cuanto a histopatología, presencia de células apoptóticas y expresión de PCNA y enzimas antioxidantes en los cuatro grupos de animales estudiados.

3.1. Hallazgos histopatológicos

El tratamiento con IGF-1 no irradiado, no mostró diferencias con la mucosa normal (Fig. 1, 2). El tratamiento pre y post radiación con IGF-1 fue útil como preservador parcial de la histología de la mucosa intestinal. Fue evidente la ausencia de edema, la menor aparición de alteraciones nucleares en las células de las criptas, el menor daño vascular y estructural del epitelio respecto de la mucosa irradiada no tratada. El número de criptas fue sólo parcialmente conservado (Fig. 3, 4). Los resultados están expresados 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 IGF-1

Intestino	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
No irradiado	Normal	110	Ausente	Ausentes	Ausente	Ausente
No irradiado + IGF-I	Normal	105	Ausente	Ausentes	Leve o ausente*	Ausente
Irradiado	Marcada atrofia	45	Severa	Anisocariosis, anisocitosis marcadas	Presente intenso	Presente
Irradiado + IGF-I	Moderada atrofia	65	Leve	Leve anisocariosis	Ausente	Moderado

*diferencia no significativa respecto al intestino no irradiado

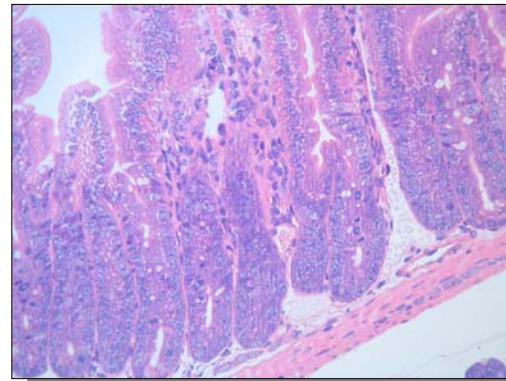
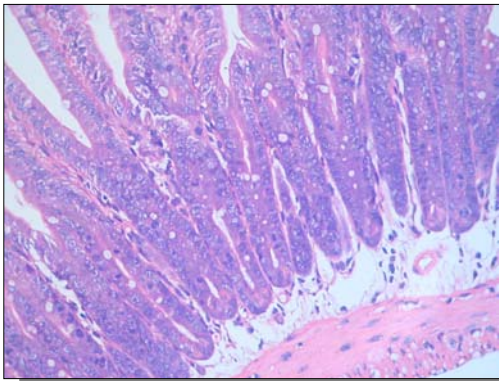


Figura 1. Control sin irradiar y sin tratar mostrando mucosa con número y morfología normal de criptas y vellosidades. (H.E. 400x). Figura 2. Ratón tratado con IGF-1 y sin irradiar, mostrando conservación de la histología normal. (H.E. 400x)

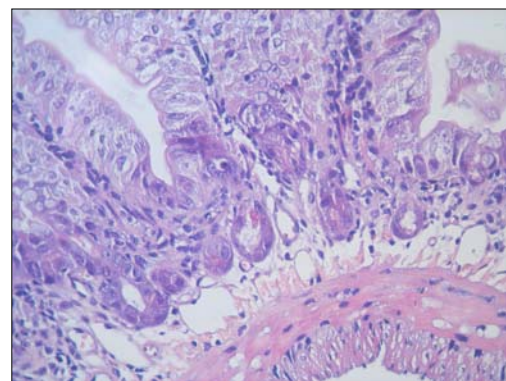
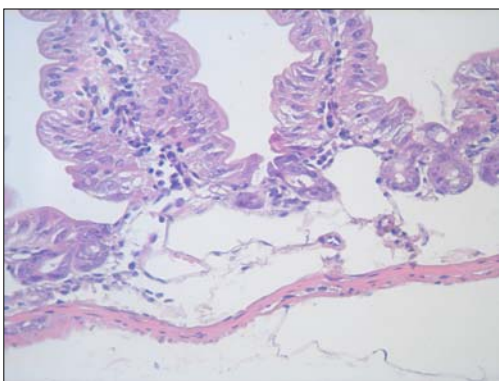


Figura 3. Control de irradiación con 10 Gy, evidenciando grave alteración de la mucosa con pérdida de criptas y vellosidades, con congestión y edema del corion. (H.E. 400x) Figura 4. Ratón tratado con IGF-1 e irradiado con 10 Gy en el que se observa parcial preservación de criptas y vellosidades. (H.E. 400x)

3.2. Resultados de la evaluación con técnicas de Inmunohistoquímica.

Tabla II: Hallazgos de los estudios inmunohistoquímicos en mucosa intestinal de ratón control, irradiado con 10 Gy y tratado con IGF-1.

Intestino	<i>Apoptag</i>	PCNA	Catalasa	CuZnSOD	MnSOD
No irradiado	++ en extremos vellositarios	+++ en criptas	ausente	++ en vellosidades - en criptas	++++ en vellosidades - en criptas
No irradiado + IGF-I	++ en extremos vellositarios	+++ en criptas	ausente	+++ en vellosidades - en criptas	+++ en vellosidades + en criptas
Irradiado	+++ en toda la mucosa	ausente	+ en vellosidades	++ en vellosidades + en criptas	+++ en vellosidades - en criptas
Irradiado + IGF-I	++ en toda la mucosa	++ en criptas	++ en vellosidades	+++ en vellosidades + en criptas	++++ en vellosidades - en criptas

El tratamiento con IGF-1 en intestino irradiado produjo una leve disminución del número de células apoptóticas en todo el espesor de la mucosa respecto de los ratones irradiados (Fig. 5, 6).

Tanto los controles como los tratados solamente con IGF-1 mostraron valores altos de expresión de PCNA en las criptas de la mucosa (Fig.7, 8); en cambio, como es previsible, las muestras irradiadas sufrieron una masiva desaparición de células positivas para PCNA (Fig 9). El tratamiento con IGF-1 recuperó significativamente la expresión de este marcador (Fig. 10).

Con respecto a las enzimas antioxidantes, la catalasa sólo se observó en valores perceptibles en las vellosidades de las mucosas irradiadas con valores levemente superiores luego del tratamiento con IGF-1 (Fig 11, 12). Por su parte, la CuZnSOD aumentó en las vellosidades de las mucosas tratadas con IGF-1, observándose una leve expresión en las criptas de las mucosas irradiadas (Fig. 13, 14).

Por último, la MnSOD tiene mayor expresión en las mucosas irradiadas tanto en las no tratadas como en las tratadas con IGF-1 con leve aumento en estas últimas (Fig. 15, 16).

Las determinaciones destinadas a detectar la presencia de GPX en la mucosa intestinal no dieron resultados positivos en ningún caso.

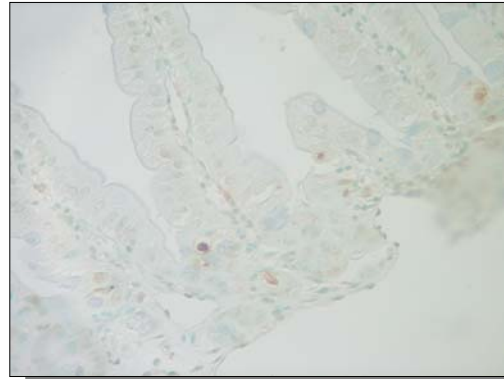
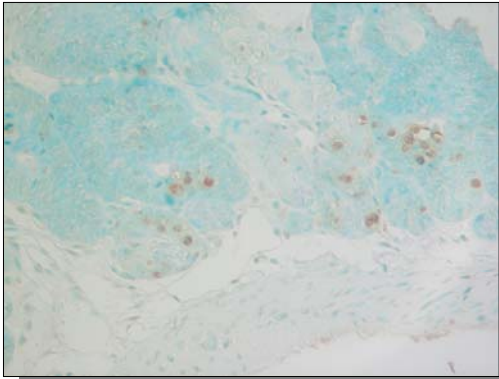


Figura 5. Control de irradiación con 10 Gy, mostrando numerosas células en apoptosis en los fondos de las criptas. (Apoptag 400x) Figura 6. Ratón tratado con IGF-1 e irradiado con 10 Gy, si bien existen algunas células en apoptosis su número es menor que en el control irradiado. (Apoptag 400x)

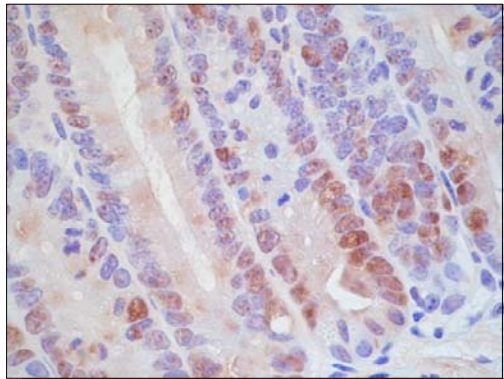
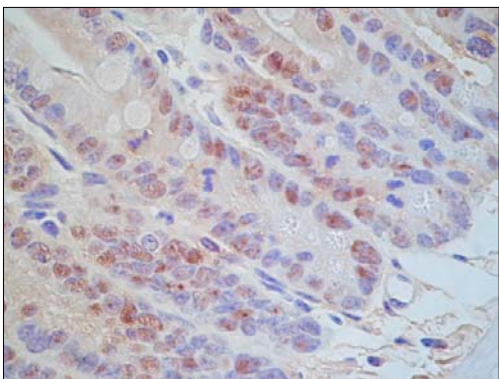


Figura 7. Marcada positividad en criptas de la mucosa para PCNA en ratón control sin irradiar y sin tratar. (PCNA 630x) Figura 8. Similar intensa positividad para PCNA en mucosa de ratón tratado con IGF-1. (PCNA 630 x)

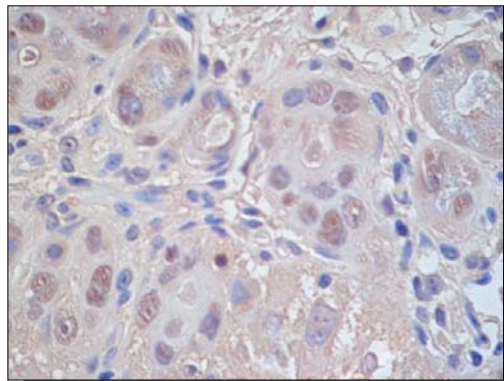
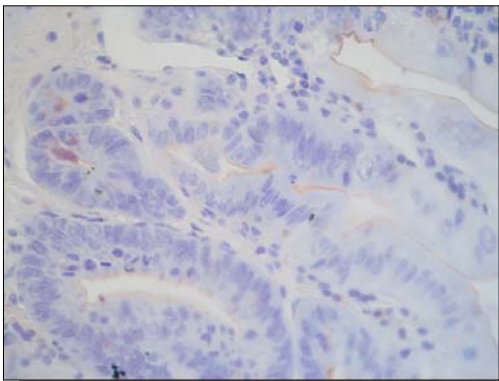


Figura 9. Mucosa intestinal con ausencia casi completa de elementos positivos para PCNA en ratón irradiado con 10 Gy. (PCNA 630x) Figura 10. Moderado número de células teñidas para PCNA en criptas de intestino de ratón irradiado y tratado con IGF-1. (PCNA 630x)

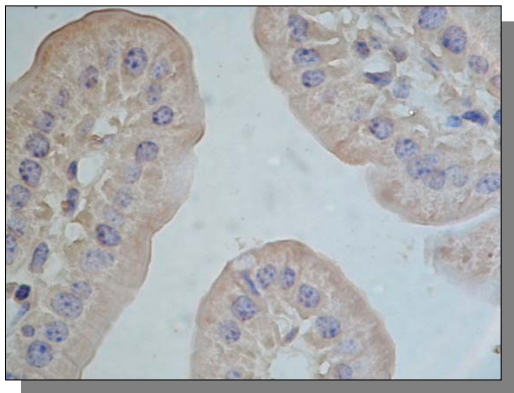


Figura 11. Control de irradiación con 10 Gy, mostrando escasa expresión de catalasa en vellosidades remanentes. (Catalasa 630x) Figura 12. Ratón tratado con IGF-1 e irradiado con 10 Gy, marcada positividad para catalasa en vellosidades intestinales. (Catalasa 630x)

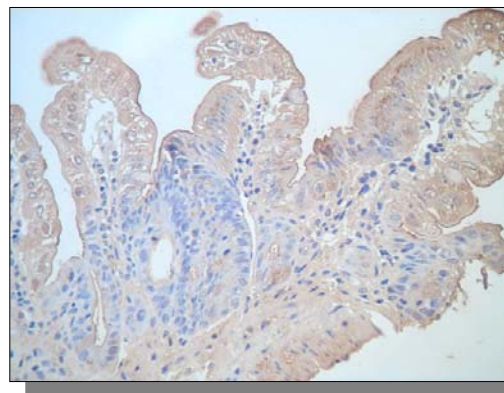
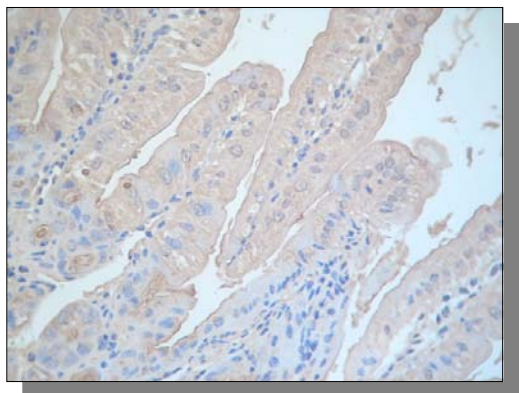


Figura 13. Moderada expresión de CuZnSOD en mucosa intestinal de ratón irradiado sin tratamiento. (CuZnSOD 400x) Figura 14. Moderado aumento de la expresión de la enzima en las vellosidades del intestino de ratón tratado con IGF-1 e irradiado respecto del irradiado no tratado. (CuZnSOD 400x)

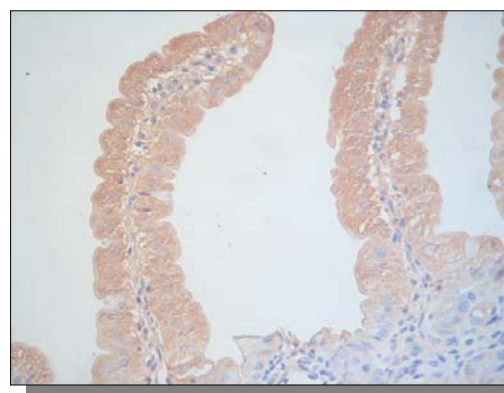
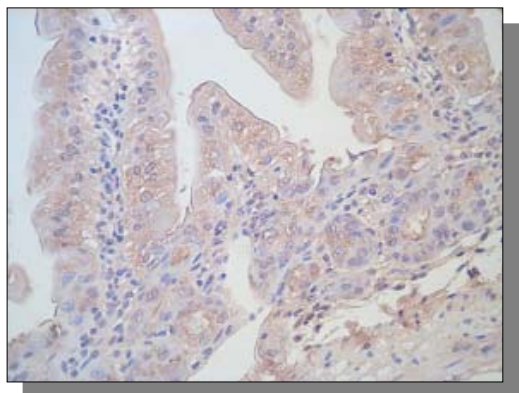


Figura 15. Abundante expresión de MnSOD en mucosa intestinal de ratón irradiado sin tratamiento. (MnSOD 400x) Figura 16. Importante aumento de la expresión de MnSOD en las vellosidades del intestino de ratón tratado con IGF-1 e irradiado respecto del irradiado no tratado. (MnSOD 400x)

4. CONCLUSIONES

En conclusión podemos decir que el tratamiento con IGF-1 en intestino de ratones irradiados es capaz de inducir la reparación y/o proliferación de la mucosa, previniendo simultáneamente en forma parcial la inducción de apoptosis por irradiación. Además es capaz de aumentar levemente la expresión de las enzimas antioxidantes MnSOD y CuZnSOD encontradas normalmente en la mucosa intestinal y de inducir la expresión de catalasa ausente en nuestra experiencia en los controles. Este aumento permitiría una menor acumulación de agua oxigenada en las células de los intestinos irradiados, mecanismo por el cual el IGF-1 cumpliría un efecto radioprotector.

Teniendo en cuenta estos resultados es posible proponer el uso de este factor de crecimiento para prevención de los efectos secundarios de la radioterapia en altas dosis en campos abdominales. Las condiciones de su utilización en pacientes oncológicos debe ser previamente investigada en modelos animales considerando el efecto estimulante de invasión y metástasis mediado por la sobreexpresión del receptor a IGF-1 [12, 13].

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica de Alejandro Paredes.

Este trabajo fue financiado por los subsidios ANPYCT - PICT 12250, UBACYT- B112 y los aportes de la Fundación Ernesto Crescenti.

REFERENCIAS

1. Tubbiani M, Dutreix J, Wambersie A, *Introduction to radiobiology*, Ed. Taylor and Francis, London, Gr. Br. (1990).
2. Steel G. Gordon, *Basic Clinical Radiobiology*, Ed. Arnold, London, Bg. Br. (1997).
3. Chen K, Okuma T, Okamura K, Tabira Y, Kaneko H, Miyauchi Y, Insulin-like growth factor-I prevents gut atrophy and maintains intestinal integrity in septic rats, *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **19(2)**, p. 119-24 (1995).
4. Steeb CB, Trahair JF, Read LC, Administration of insulin-like growth factor-I (IGF-I) peptides for three days stimulates proliferation of the small intestinal epithelium in rats, *Gut*, **37(5)**, p. 630-8 (1995).
5. Howarth GS, Fraser R, Frisby CL, Schirmer MB, Yeoh EK, Effects of insulin-like growth factor-I administration on radiation enteritis in rats, *Scand J Gastroenterol*, **32(11)**, p. 1118-24 (1997).
6. Riley PA., Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation, *Int J Radiat Biol*, **65(1)**, p. 27-33 (1994).
7. Venkat S, Apte SK, Chaubey RC, Chauhan PS, Radioadaptive response in human lymphocytes in vitro, *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **20(3)**, p. 165-75 (2001).
8. Nakamura M, Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K, Ascorbic acid prevents ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine, *Transpl Int*, **10(2)**, p. 89-95 (1997).
9. Mylonas P, Matsouka P, Papandoniou E, Vagianos C, Kalfarentzos F, Alexandrides T, Growth hormone and insulin-like growth factor 1 protect intestinal cell from radiation induced apoptosis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, **160(1-2)**, p. 115-122 (2000).
10. Francois A, Aigueperse J, Gourmelon P, MacNaughton WK, Griffiths NM, Exposure to ionizing radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon in vitro. *Int J Radiat Bio*, **73(1)**, p. 93-101 (1998).

11. Kandasamy SB, Hunt WA, Involvement of prostaglandins and histamine in radiation-induced temperature responses in rats, *Radiat Res*, **121(1)**, p. 84-90 (1990).
12. Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR, AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells, *Cancer Res*, **61(2)**, p. 589-93 (2001).
13. Naidu KA, Karl RC, Naidu KA, Coppola D, Antiproliferative and proapoptotic effect of ascorbyl stearate in human pancreatic cancer cells: association with decreased expression of insulin-like growth factor 1 receptor, *Dig Dis Sci*, **48(1)**, p. 230-7 (2003).