

Efecto Citotóxico y Genotóxico causado por $^{153}\text{Sm-EDTMP}$, Combinado con BrdU un Análogo de Timidina

Morales-Avila .E., Ferro-Flores, G. y Morales-Ramírez-P.

*Departamento de Biología del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
Km 33.5 Carretera México-Toluca, Ocoyoacac Edo. Mex.*

Resumen

La ablación de la médula ósea previa al trasplante mediante radiación y antineoplásicos químicos. afectan indiscriminadamente a los tejidos sanos y en particular aquellos que están en proliferación. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la incorporación de la BrdU al ADN sobre la genotoxicidad y citotoxicidad de las células de la médula ósea causada por el radiofármaco $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. La genotoxicidad se determinó por la tasa de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPC-MN) y la citotoxicidad por la frecuencia de EPC. Ambos parámetros determinados en sangre periférica tras la administración de BrdU y $^{153}\text{Sm-EDTMP}$. La combinación de la BrdU y el radiofármaco produjo una mayor citotoxicidad que la radiación y la BrdU solos; en cambio produjo una reducción de los EPC-MN producidos por la radiación, sugiriendo que la citotoxicidad no permitió la expresión de la genotoxicidad.

1. INTRODUCCIÓN

El aumento sustancial en la muerte de células sometidas a tratamientos con radiación es denominado radiosensibilización, las sustancias que inducen este aumento del daño se conocen como radiosensibilizadores. Investigaciones recientes recomiendan el uso combinado de drogas radiosensibilizadoras con tratamientos de radiación, tratando que los daños citotóxicos y genotóxicos en tejidos neoplásicos se incrementen mientras que en los a tejido sanos se vean reducidos. Además es posible que se requiera una dosis menor de radiación que reduzca los daños producidos por la radiotoxicidad en tejido sano.

Los análogos de timidina como la bromodesoxiuridina (BrdU) y la iododesoxiuridina (IdU), han sido usados como radiosensibilizadores en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de cuello y cabeza (1,2), gliomas malignos, sarcomas de tejido suave, cánceres hepáticos, pulmonares (3), cánceres cervicales y sobre diversas líneas celulares de tejidos tumorales humanos (4,5,6).

Las estrategias terapéuticas usando los análogos de timidina se han enfocado permite la incorporación en células que están en proliferación continua, como es el caso de las células cancerosas. Para extender el uso de los análogos de timidina, se han hecho estudios que determinan si estos compuestos pueden ser usados en tumores en los cuales los limitantes de la dosis de radiación son tejidos sanos de rápida división, como el epitelio intestinal (7) o la médula

ósea, ya que estas estructuras pueden exceder la incorporación del análogo en comparación a otras estructuras, en la forma que se incrementa la concentración plasmática del compuesto.

Por otra parte, estudios de biodistribución en pacientes tratados con $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ muestran una rápida fijación del complejo en el hueso, con un completo aclaramiento de radiotoxicidad en los compartimentos no esqueléticos en 6-8 horas(8). La eliminación es caracterizada por una curva doble-exponencial. La fase rápida presenta un tiempo medio de aclaramiento, con un remanente del 4% al 34% de la actividad administrada en el suero después de 1 hora. La segunda fase lenta de aclaración del suero presenta un rango entre 8.1 a 17.1 horas. La excreción urinaria del ^{153}Sm se completa en seis horas después de la infusión (8).

Por lo anterior se propone que la incorporación de BrdU en células de la médula ósea las sensibilizaría a la exposición posterior de un radiofármaco que se fija específicamente en hueso. Esto permitiría la muerte específica de las células de la médula ósea, con un efecto secundario leve sobre otros tejidos.

El objetivo de este estudio es determinar si la incorporación de BrdU en las células de la médula ósea de ratones las sensibiliza a la inducción de daño genotóxico y citotóxico causado por el radiofármaco $^{153}\text{Sm-EDTMP}$.

2. METODOLOGÍA

Animales

Se formaron cinco grupos de cinco ratones machos cada uno, de 2-3 meses de edad de la cepa BALB/c, con un peso aproximado de 30 g, reproducidos y mantenidos en el bioterio del departamento de biología del ININ, en jaulas de plástico, bajo condiciones controladas de temperatura, periodicidad de luz-oscuridad, alimentados con comprimidos *Laboratory rodent* para roedores pequeños y agua *ad libitum*.

Tratamientos

Se administraron al grupo II y IV 0.20 mg/g de peso de BrdU, adsorbida a carbón activado vía intraperitoneal, 16 hrs después se administraron los grupos III y IV con 0.27 ± 0.041 mCi y 0.24 ± 0.038 de $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ respectivamente.

Preparaciones

Su obtuvieron muestras de sangre, al tiempo cero (basales) y cada 8 hrs hasta las 80 hrs Las muestras se recibieron en suero fetal de ternera y se colocaron en portaobjetos, con el fin de realizar un frotis y ser teñidas con la técnica MayGrunwald-Giemsa.

Análisis.

a. Actividad Citotóxica: La actividad citotóxica se estimó como el número de eritrocitos policromáticos (EPC) en porcentaje con respecto a la frecuencia al tiempo inicial. Para lo cual se analizará un mínimo de 2000 eritrocitos al inicio del experimento y en cada periodo de 8 h después del tratamiento.

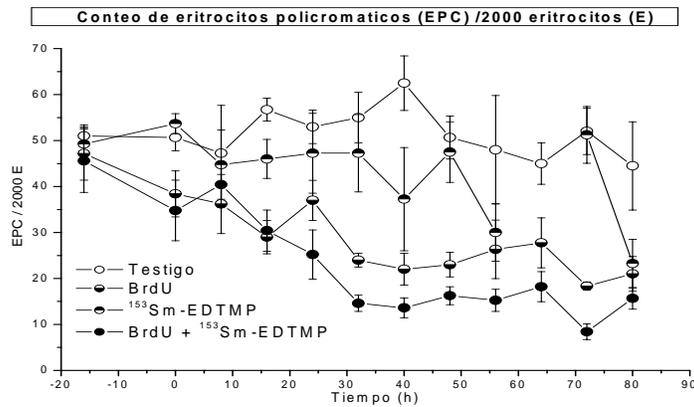
b. Actividad genotóxica: Se estimó como la el número de eritrocitos micronucleados policromáticos (MN-EPC) con respecto a la frecuencia al tiempo inicial. Para lo cual se analizará un mínimo de 2000 eritrocitos policromáticos a t(0) y en cada periodo de 8 h después del tratamiento.

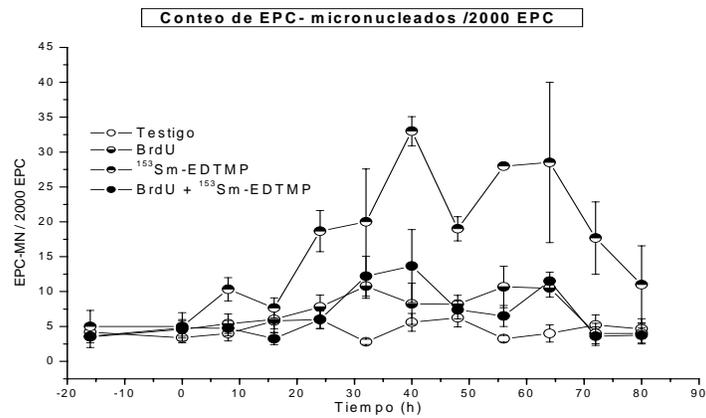
Análisis estadístico: Análisis estadístico se valuó la concentración que produzca una respuesta significativa en los conteos de EPC, a la cual no se tenga una severa toxicidad en los ratones.

Resultados

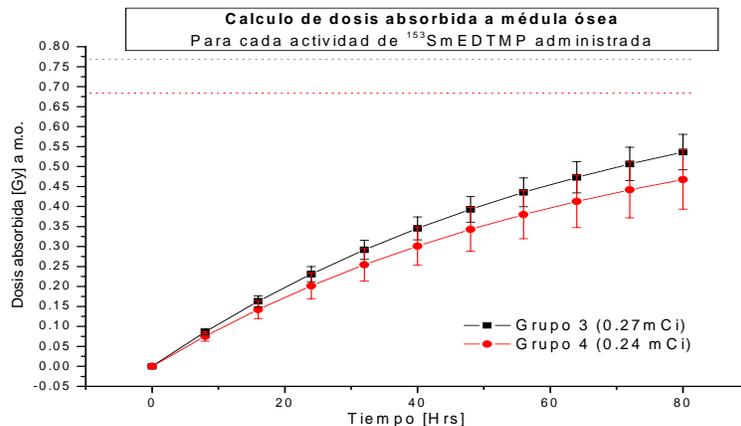
Como se aprecia en las gráficas, los tratamientos independientes de BrdU y ¹⁵³Sm-EDTMP produjeron una reducción máxima de aproximadamente el 70 % de las células policromáticas y una disminución del 80 % para el tratamiento combinado de BrdU + ¹⁵³Sm-EDTMP para la evaluación del efecto citotóxico. Para la respuesta de genotoxicidad se aprecia una inducción promedio máxima de 30 EPC-MN para el tratamiento de ¹⁵³Sm-EDTMP en cambio para el tratamiento combinado solo de 13 EPC-MN/2000 EPC a las 40 hrs, comportamiento similar al presentado por la respuesta del grupo sometido únicamente al tratamiento con BrdU que presentó una inducción máxima de 11 EPC-MN al mismo tiempo de muestreo.

Las curvas correspondientes a los tratamientos de BrdU y BrdU + ¹⁵³Sm-EDTMP presentan evidentemente una respuesta similar en cito y genotoxicidad, sin embargo la coitotoxicidad del grupo de ¹⁵³Sm-EDTMP es menor en comparación con demás tratamientos y sin embargo presentan una mayor inducción de genotoxicidad.





La determinación de la Dosis se realizó de acuerdo al formalismo MIRD, y en donde la fracción de energía impartida por unidad de actividad se calculo por simulación con Montecarlo MCNM-4C generando un modelo de para el hueso del ratón. Los valores aproximados de las dosis en médula ósea obtenidos presentados en la grafica, indican que la dosis máxima a obtener fluctuó cerca de 0.75 Gy para el grupo 3 y 0.70 Gy para el grupo 4, aunque para el tiempo de muestreo únicamente se había administrado una dosis máxima de alrededor de 0.55 Gy a la médula ósea.



Discusión

La BrdU produce radiosensibilización por medio de su incorporación al ADN. A partir de estudios comparativos entre los niveles de incorporación y la correlación de daño producido en el ADN, se han propuesto dos mecanismos para explicar la radiosensibilización de las células. Uno es la sensibilización causada por el incremento de la cantidad de daño inducido por la radiación por unidad de dosis absorbida que correlaciona linealmente con la presencia de BrdU en el ADN. El otro es su influencia sobre la tasa de reparación de daño del ADN y/o de la fijación del daño potencialmente letal. El primer mecanismo se basa en los aspectos fisicoquímicos resultado de la energía impartida por la radiación, mientras que el segundo está enfocado a procesos metabólicos relacionados con el procesamiento de las lesiones en el ADN; hay evidencia (9, 10) de que ambos mecanismos no son excluyentes e incluso pueden actuar en forma combinada para dar el efecto radiosensibilizador.

Diversos estudios (11, 12), han demostrado que la formación de rupturas de oligonucleotidos conteniendo 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU), ocurre con mayor eficiencia en oligonucleotidos de doble cadena que en el respectivo material de cadena sencilla. Esto es atribuido a la alta proporción de rupturas, resultantes de la captura electrónica entre la 5-´desoxiadenosina y la BrdU en el sustrato de doble cadena (13). Sin embargo Cecchini et al. (14) demuestran que la sustitución de timidina por BrdU en el ADN de doble cadena (T-A \rightarrow BrdU-A) no tiene influencia sobre el daño de la cadena complementaria; en contraste la presencia de un error de apareamiento causado por la BrdU (mismatched bubble BrdU-T) en la doble cadena causó un incremento significativo de daño en la cadena complementaria y en las posiciones cercanas al error de apareamiento. Por otra parte, se observó un aumento en la susceptibilidad a la radiohidrolisis en cadenas sustituidas, aproximadamente tres veces más en las simples que en las dobles. Los resultados sugirieron que el apareamiento de las bases de Watson-Crick puede estabilizar el bromuro en el bromouracilo, lo cual inhibe un paso crucial en el proceso de radiosensibilización del ADN.

El mecanismo relacionado con el aumento en la producción de rupturas de doble cadena, causado por a la incorporación de BrdU, puede estar determinado por la acumulación de los sitios de energía impartida por unidad de evento; los eventos de alta deposición de energía hacen más probable la producción de sitios de daño local múltiple (LMDS: letal multiple damage sites), conteniendo rupturas de doble cadena y reduciendo la distancia entre los eventos de deposición de energía en la célula, de esta forma los eventos de ruptura de cadena sencilla más cercanos en la cadena de ADN hacen más probable la producción de rupturas de doble cadena convirtiéndose en dsb-LMDS (13).

Es interesante notar que la inducción de radiosensibilización en el ADN esta influenciado, por la cantidad de base halogenada sustituida, sin embargo de acuerdo con Lawrence (11) la radiosensibilización no es mayor en cadenas bifilarmente sustituidas (en ambas hebras) que en el análogo material unifilarmente sustituido (sustitución de una hebra), no descartando que la incorporación bifilar este relacionada con un incremento de daño al modificar la estructura terciaria del ADN y aumentar la exposición del ADN a los radicales libres generados por la radiación.

En general se ha demostrado que la radiosensibilización del ADN ocurre de acuerdo a reacciones sucesivas que finalizan en la ruptura de la cadena de ADN, las propiedades radiosensibilizadoras de la BrdU resultan no solo de la habilidad de la interacción de los electrones con el material genético, el cual no es muy diferente de la timidina, pero si influye la naturaleza electrofílica del bromuro que resulta en la formación de radicales dU^{\bullet} o dU^{\ominus} .

Se supone que el daño en el material genético esta distribuido de manera azarosa, sin embargo la evidencia presentada, indica que la ruptura de las cadenas del ADN ocurre de manera primaria en regiones de una sola hebra y donde hay sustitución de las bases por la BrdU al tiempo de la irradiación. Las situaciones fisiológicas donde encontramos segmentos monocatenarios de ADN pueden ser, a) los sitios de replicación, sitios de transcripción, en las regiones D-loop de los telómeros y en los "bulges" de ADN. El daño resultante de la presencia de BrdU en la hebra parenteral en los sitios de replicación, durante la irradiación, debe distribuirse aleatoriamente en el genoma de una población de células en replicación asincrónica, sin embargo en el caso de la transcripción y los telómeros, el daño solo puede ser ocasionado en genes con actividad

transcripcional y al final de los cromosomas respectivamente, independientemente de la fase del ciclo celular.

La inducción de micronúcleos coincide con una cinética de tratamiento crónico de acuerdo con nuestros datos previamente publicados (15).

3. CONCLUSIONES

Los resultados nos permiten concluir que el tratamiento combinado de incorporación de BrdU al ADN y el radiofármaco produce un efecto aditivo sobre la coitotoxicidad. Aparentemente causa un efecto inhibitorio sobre la genotoxicidad, aunque esto seguramente es debido a que las lesiones causadas por la radiación sobre el ADN substituido con BrdU son muy letales, de tal forma que el tratamiento combinado no permite que las células se dividan y expresen su daño en forma de micronúcleos.

AGRADECIMIENTOS

A la Biol. Teresita Vallarino Kelly, y a los técnicos Angel Reyes P., Perfecto Aguilar V. Departamento de Biología. En general al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y al SUTIN por su apoyo brindado.

REFERENCIAS

1. Russo A. et al., (1984) Pharmacological Evaluation of Intravenous delivery of 5-Bromodeoxyuridine to Patients whit Brain Tumors. *Cancer Research*, **44**:1702-1705
2. Surasak, P. et al., (1984) Phase I study of intravenous Bromodesoxyuridine used concomitantly whit radiation therapy in patients whit primary malignant brain tumors. *Int J Oncology Biol Phys*, **10**:1769-1772
3. Kinsella J. et al., Timothy, M.D., Angelo Russo, M.D., James B. Mitchell, Ph.D., Janet Rowland, R.N., Jean Jenkins, R.N., James Schwade, M.D., Charles E. Myers, M.D., Jerry M. Collins, Ph.D., James Speyer, M.D., Paul Kornblith, M.D., Barry Smith, M.D., Conrad Kufra, M.D., and Eli Glatstein, M.D. (1983) A phase I study of intermittent intravenous bromodeoxyuridine (BudR) whit conventional fractionated irradiation. *Int J Oncology Biol Phys*, **10**:69-74
4. Franken, N. et al., (2001) Radiosensitization by Bromodeoxyuridine and Hyperthermia: Analysis of Linear Quadratic Parameters of Radiation Survival Curves of two Human Tumor Cell Lines. *Journal Radiation Research*, **42**:179-190
5. Doiron A. et al., (1999) Tumor radiosensibilization by sustained intratumoral relase of bromodeoxyuridine. *Cancer Research*, **59**:3677-3681
6. Van Bree C. et al., (1997) Hyperthermia and incorporation of halogenated pyrimidines: Radiosensitization in cultured rodent and human tumor cells. *Int J Oncology Biol Phys*, **39**(2):489-496
7. Lawrence T.S. et al., (1994) Kinetics of bromodesoxyuridine elimination from human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Research*, **54**:2954-2958

8. Eary, F. et al., (1993) Samarim-153-EDTMP Biodistribution and Dosimetry Estimation. *J Necl Med*; **34**:1031-1036
9. Iliakis, G. et al (1989) Mechanism of radiosensitization by alogened pyrimidines: effect of BrdU on radiation induction of DNA and chromosome damage and its correlation with cell killing. *Radiation Research*, **119**, 286-304
10. Iliakis, G. et al. (1992) Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: effect of BrdU on repair of DNA breaks, interphase chromatin breaks, and potentially lethal damage in plateau-phase CHO cells. *Radiation research*, **129**:202-211
11. Lawrence T.S. et al., (1990) The effect of single versus Double-Strand Substitution on Halogenated Pyrimidine-Induced Radioosensitization and DNA Strand Breakege in Human Tumor Cells. *Radiation Research* **123**, 192-198
12. Webb C.F. (1993) Mechanism of radiosensitization in bromodeoxyuridine-substituted cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **64**:695-705
13. Cook G. et al., (1999) The effects of secondary structure and O₂ on the fomati3n of direct strand breaks upon UV irradiation of 5-bromodeoxi-uridine-containing oligonucleotides. *Chemistry & Biology*, **6**:451-459
14. Cecchini C. et al., (2004) Single-strand-Specific radiosensitization of DNA by Bromodexyuridine, *Radiation Research* **162**: 604-615.
15. Morales-Ram3rez et al., (1994) Induction of micronuclei by acute and chronic exposure *in vivo* to gamma rays in murine polychromatic erythrocytes. *Mutation Res.* **341**, 47-55.