

Estudio de los fenómenos de destrucción celular en leucocitos de sangre humana irradiada con gamma

Karla Josefina Santacruz-Gómez, César Manzano, Rodrigo Meléndez, Martín Pedroza-Montero, B Castaneda.

Resumen

La radiación de sangre induce efectos morfológicos y moleculares en sus células que, dependiendo de la severidad, conducen a la apoptosis. Pese al avanzado conocimiento que se tiene sobre los efectos de la radiación en el tejido biológico, el fenómeno de deterioro radioinducido se ha descrito muy poco de manera integral. En este trabajo se evaluaron las etapas de destrucción celular en leucocitos obtenidos de muestras de sangre irradiada con ^{60}Co a dosis de 25 y 50 Gy. Se analizaron los cambios morfológicos radioinducidos, así como su relación con los aumentos en la concentración de potasio sérico y sobreexpresión de p53 usando la tinción Giemsa, la interacción estreptavidina-biotina y la reacción tetrafenilborato de sodio respectivamente. Nuestros resultados muestran que la radiación gamma induce al menos tres fenómenos morfológicos en leucocitos: pérdida de la integridad celular en linfocitos, fragmentación leucocitaria y disociación lobular en neutrófilos, acompañados de la sobreexpresión de p53.

Introducción

La radiación ionizante produce lesiones en las células en forma directa dañando su ADN o indirectamente generando radicales libres. Durante este proceso la proteína p53 actúa reconociendo el ADN celular dañado, lo que estimula la síntesis de dicha proteína deteniendo el ciclo celular y permite reparar el daño infringido. Sin embargo, cuando la lesión es irreversible, la proteína es capaz de desencadenar apoptosis^(1,2).

La muerte celular programada es un proceso esencial para mantener la homeostasis de los tejidos con el objetivo de eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. Esta forma de muerte celular o apoptosis se cumple mediante la activación de un 'programa' intrínseco caracterizado por mantener las membranas celulares intactas permitiendo así su eliminación por exocitosis. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, rotura específica de proteínas celulares, fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos y rotura endolítica del ADN en fragmentos oligonucleosómicos⁽³⁾.

Algunos autores evaluaron los efectos radioinducidos para determinar el tipo de cambios que se provocan en el tejido biológico y la frecuencia con que éstos ocurren. En sangre irradiada se han considerado algunos parámetros bioquímicos tales como la concentración sérica de LDH, potasio y hemoglobina⁽⁴⁾ como buenos predictores del daño celular, así como las aberraciones citogenéticas inducidas en los linfocitos debido a su gran radiosensibilidad⁽⁵⁻¹⁰⁾. Sin embargo, los mecanismos intrínsecos que anteceden a la lesión celular o apoptosis radioinducida no han sido dilucidados del todo en el caso de los rayos gamma originados por una fuente de ^{60}Co a dosis moderadas y altas (25 y 50Gy).

Recientemente, un estudio de los efectos citogenéticas en linfocitos de sangre periférica demostró que existe una relación no lineal de los daños cromosómicos inducidos con respecto a la dosis, distinta a la predicha por el mecanismo de acción directa al ADN⁽⁹⁾. Dichos estudios fueron realizados con fuentes de diferentes LET, fundamentalmente rayos X y gamma a dosis muy bajas (1-100 cGy). Por otro lado, se encontró que el incremento en las concentraciones de potasio en sangre irradiada juega un rol muy importante en el proceso de deterioro celular y está directamente ligado a la reducción de la vida de anaquel de este producto. Dinning et al⁽¹¹⁾ reportaron que en sangre irradiada a 15Gy usando un irradiador Gammacell, las concentraciones de este ión se triplican a los 4 días de almacenaje a temperatura de 2-4°C, y que estos aumentos predispondrían al daño cromosómico y así a la muerte celular.

En otro sentido, el estudio de los frotis sanguíneos a través de la microscopia óptica brinda información valiosa acerca del número y forma de las células sanguíneas. La tinción de Giemsa es el método habitual que permite la coloración diferencial de zonas con un alto contenido de ADN y concretamente de uniones adenina-timina⁽¹²⁾. Esto permite distinguir el núcleo celular, los cromosomas durante la mitosis y, en algunos casos, el ADN mitocondrial gracias al efecto Romanowsky⁽¹³⁾.

El marcaje inmunohistoquímico de p53 se utiliza para conocer el grado de agresividad de una lesión celular, por ser esta proteína encargada de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético⁽¹⁴⁾. Este bloqueo se lleva a cabo deteniendo el ciclo celular en la fase G1, con el objetivo de que se produzca la reparación del ADN antes de su replicación^(15,16). Finalmente, la p53 mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño del ADN ha sido sustancial⁽¹⁷⁾.

En nuestro estudio evaluamos con detalle el mecanismo específico de destrucción celular en leucocitos de muestras de sangre periférica irradiadas con ⁶⁰Co a dosis de 25 y 50Gy, con respecto a los cambios moleculares y morfológicos debidos a los aumentos del potasio celular y sobreexpresión de p53.

Material y métodos

El presente estudio experimental se realizó en 5 sujetos voluntarios de sexo masculino aparentemente sanos, elegidos por conveniencia de acuerdo a los criterios de selección. Se colectaron 4 tubos a cada sujeto, 3 de ellos anticoagulados con EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético) y uno sin anticoagulante que se utilizó para separar el suero. El proceso de irradiación consistió en aplicar un rango de dosis de 0 a 50Gy, administradas con una fuente de ⁶⁰Co usando un GC-220E. Se consideró la dosis de 25Gy como la ideal para irradiar sangre de uso terapéutico y los 50Gy como el límite máximo. Los ensayos se realizaron por triplicado con sus respectivos controles.

Se evaluaron los siguientes parámetros morfológicos:

- Cambios morfológicos en leucocitos. Las muestras irradiadas y control fueron teñidas con el colorante Giemsa y se observaron al microscopio. Se evaluaron las anomalías morfológicas ocurridas en 100 campos del frotis.
- Expresión de marcadores moleculares en linfocitos. Se utilizó el método inmunohistoquímico biotina-estreptavidina a las muestras irradiadas y al control. Para valorar la inmunorreactividad de la proteína p53 se consideró un grupo positivo de tejido de mama, mientras que para el linfocito T se usó como autotestigo tejido de ganglio CD3+, y para el linfocito B tejido de amígdala CD20+. Estos dos últimos se usaron para evaluar el predominio de la expresión de p53 entre las subpoblaciones linfocitarias. Se determinó un sistema de graduación de la siguiente manera: (-) negativo, (+) débil hasta un 10%, (++) regular 10 a 30%; (+++) abundante >30%.
- Determinación del ión potasio (K+). Se realizaron mediciones de la concentración del K+ sérico en las muestras control e irradiadas a las 2, 4, 24, 48 y 72 horas posteriores a su almacenaje a 4°C, usando el método turbidimétrico de la reacción tetrafenilborato de sodio de Randox18. Este método consiste en determinar la concentración de iones potasio en un medio alcalino libre de proteínas que reaccionan con el tetrafenilborato de sodio para producir una suspensión turbia de tetrafenilborato de potasio. Se utilizó el medidor automatizado Vitalab Selectra.

Resultados

Los mecanismos de destrucción morfológica leucocitarios fueron estudiados considerando dos posibles factores causantes de estrés celular radioinducidos: el incremento en la concentración de potasio celular y la señalización molecular de lesión y muerte celular⁽¹⁹⁾. En el análisis morfológico se observaron tres efectos biológicos radio-inducidos los cuales presentaron evolución, población blanco y dosis de aparición característica.

El primer fenómeno se caracterizó por mostrar inestabilidad estructural linfocitaria a dosis de 3,21 a 10,29Gy. La primera manifestación de este efecto fue la condensación del núcleo, dándole apariencia de hendido a 3,21Gy. Esta irregularidad se clasifica como subtipo 1 de acuerdo al Laboratorio Nacional de Referencia de Hematología⁽²⁰⁾. A dosis de 5,57 a 7,93Gy el efecto evolucionó a anomalías en la estructura del citoplasma y condensación del núcleo. Estas características morfológicas coinciden con la descripción de una célula en fase de muerte programada, tales como: condensación de la cromatina nuclear, disminución y/o desintegración nuclear, alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana^(21,15). En la última etapa de este fenómeno se encontró condensación del citoplasma y liberación de restos nucleares a los 10,29Gy (fig. 1). La frecuencia de aparición de esta anomalía aumentó con la dosis, triplicándose a los 50Gy con respecto a los 25Gy.

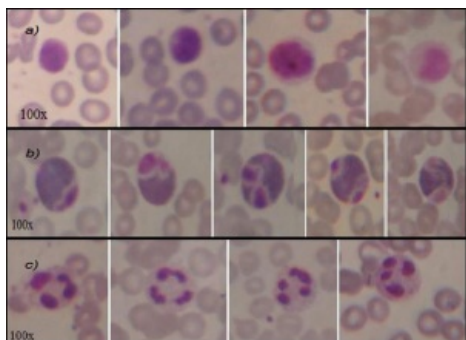


Figura 1 Mecanismos de destrucción morfológica leucocitaria (tinción Giemsa 100x). a) inestabilidad estructural linfocitaria a dosis de 3,21 a 10,29Gy; b) fragmentación celular (nuclear y citoplasmática) a dosis desde 12,65 a 24,45Gy; c) disociación lobular en neutrófilos a 50Gy.

El segundo fenómeno, de fragmentación celular, se caracterizó por el rompimiento nuclear y citoplasmático en linfocitos a dosis desde 12,65 a 24,45Gy. En este evento destacaron el aumento en el volumen celular, la condensación del núcleo y la consiguiente fragmentación celular, inicialmente del citoplasma y evolucionado después al núcleo (fig. 1b). En etapas moderadas de este daño (aproximadamente de los 15 a los 20Gy), se enfatizó la ruptura del núcleo en dos o más fragmentos y a dosis cercanas a los 25 Gy éste se seccionó completamente y a su vez, en el exterior de la célula, se observaron desprendimiento de inclusiones nucleares como gránulos azurófilos o subtipo 4⁽²⁰⁾. El rango de dosis que abarca este mecanismo es especialmente importante para el estudio de la calidad de la sangre irradiada con fines terapéuticos, en particular la culminante de esta etapa, es decir los 25 Gy⁽²²⁾. La asiduidad de los defectos descritos en el segundo mecanismo, se intensificó fuertemente a pocas horas del almacenaje a 4°C hasta alcanzar su punto máximo 24 horas post-irradiación, seguido por una disminución de ocurrencia casi total a las 48 horas posteriores.

De los 25 a los 50Gy se observaron pocos linfocitos mostrando etapas severas de los mecanismos descritos anteriormente. Sin embargo, a partir de los 50Gy se mostró un tercer efecto morfológico radioinducido, denominado en este trabajo como *disociación lobular en neutrófilos*, en el cual los lóbulos del núcleo, que habitualmente se mantienen unidos por un filamento de cromatina, se observaron separados entre sí (fig. 1c). Este defecto se encontró infrecuentemente a los 25Gy sin mostrar grandes incrementos debidos al almacenaje; sin embargo a los 50Gy la frecuencia aumentó considerablemente hasta las 48 horas post-irradiación (fig. 2).

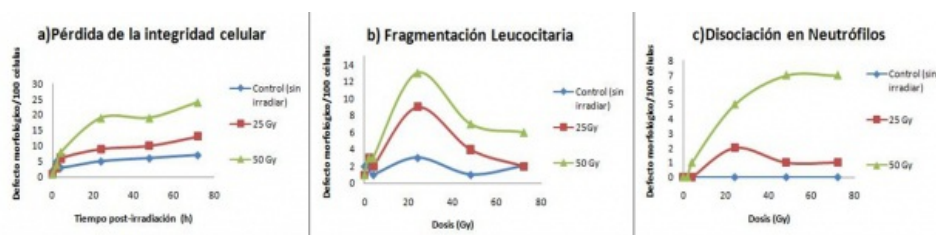


Figura 2 Frecuencia de defectos morfológicos ocurridos por cada 100 células.

En otro orden, para evaluar la evidencia de reparación celular debido a la injuria radioinducida, se estudió la expresión de p53 por medio de la técnica inmunohistoquímica biotina-estreptavidina. Se encontró que a 25Gy algunas células linfocitarias disminuyen la expresión del marcador de superficie CD3 con respecto al control sin irradiar. Estas diferencias nos demuestran que a dosis del orden de 25Gy o mayores, los linfocitos T presentes inicialmente en la muestra sanguínea sin irradiar dejan de expresar antígenos de superficie debido probablemente a un efecto radioinducido y/o por activación de la muerte celular.

Además, se observó que el CD20 se expresó moderadamente en linfocitos a los 25Gy con respecto al control sin irradiar, pero mayoritariamente con respecto a las células T a la misma dosis, mientras la proteína p53 se presentó fuertemente con una intensidad mayor al 30% (tabla 1). A los 50Gy no se observó ningún linfocito en las muestras, al contrario de la proteína p53 que se expresó fuertemente con una intensidad mayor al 60% (tabla 1).

Dosis (Gy)	Marcador utilizado	Intensidad (cruces)
0	CD3	+++
	CD20	+++
	P53	-
25	CD3	-
	CD20	+
	P53	+++
50	CD3	-
	CD20	-
	P53	+++

Tabla 1. Expresión de marcadores en leucocitos post-irradiación gamma. Sistema de graduación de positividad: (-) negativo, (+) débil hasta un 10%, (++) regular 10 a 30%; (+++) abundante mayor de 30%.

En otro sentido, se analizó la relación entre las concentraciones de potasio sérico y el tiempo post-almacenaje (fig. 3). Se encontró que en las muestras almacenadas a 4°C las concentraciones de potasio se incrementaron linealmente tanto en aquellas irradiadas a 25G y 50Gy como en el control sin irradiar. Sin embargo, a partir de las 24 horas post-irradiación las concentraciones de potasio crecieron en más de 1 mmol/L en el caso de los 25Gy hasta alcanzar una concentración promedio de 8,57mmol/L. En las muestras irradiadas a 50Gy se observó un incremento más acelerado en las concentraciones de potasio con respecto a la muestra irradiada a 25Gy y al control (tabla 2).

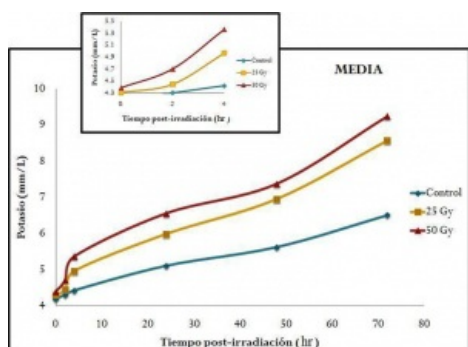


Figura 3 Cambios en la determinación de potasio sérico inducidos en células de sangre irradiada con gamma. En las muestras irradiadas a 25 y 50Gy las concentraciones de potasio se duplican y cuadruplican respectivamente. En el recuadro que se muestra arriba de la figura se puede observar notables incrementos en la concentración de potasio a las 2 y 4 horas post-irradiación.

Tiempo post-irradiación y (h)	Control sin irradiar	25Gy	50Gy
0	4,19±0,543	4,31±0,53	4,39±0,52
2	4,30±0,56	4,45±0,49	4,70±0,53
4	4,24±0,53	4,97±0,49	5,37±0,58
24	5,11±0,80	5,99±0,73	6,56±1,08
48	5,62±0,93	6,96±0,83	7,38±1,15
72	6,51±0,74	8,57±0,66	9,25±1,09

Tabla 2. Cambios en la concentración de K+ en muestras de sangre irradiada en un período de 72 horas. Valores promedios ± DE (desviación estándar).

Discusión

Las características morfológicas descritas en nuestros resultados: pérdida de la integridad celular, fragmentación celular y disociación lobular, coinciden en su mayoría con los cambios morfológicos descritos en células apoptóticas⁽³⁾. Esto nos permite establecer una relación cualitativa entre el posible efecto directo causado a la célula y su expresión molecular de reparación celular, rastreando la proteína p53. A su vez, se resaltó la elevada radiosensibilidad de los linfocitos T con respecto las células B y se confirmó que la radiación induce lesión celular de manera estocástica a bajas dosis y determinística a partir de los 25Gy, conduciendo a la apoptosis en los linfocitos. Estos resultados coinciden con datos de otros estudios sobre lesión celular que demuestran que los linfocitos y timocitos son altamente sensibles a la radiación y mueren por apoptosis en un período de horas luego de una exposición aún a bajas dosis^(23,24).

En el mismo sentido, los incrementos de potasio celular se sumaron a nuestro mecanismo de lesión, recuperación, programación y muerte celular por apoptosis radioinducida vía p53. Particularmente, estos aumentos pueden explicarse

retomando la teoría de la acción indirecta: inicialmente, la radiación produce el fenómeno de radiolisis en el agua del medio intracelular provocando la formación de radicales libres, los que intoxican el microambiente celular sometiendo a la célula a un severo estrés oxidativo. A su vez, la acción de los radicales libres (rompimiento de enlaces, desnaturalización de proteínas, etc.), ocasiona la fragmentación nuclear y membranal descrita anteriormente. El rompimiento membranal interfiere con el funcionamiento adecuado de la bomba sodio/potasio, provocando la salida y entrada de iones y electrólitos libremente a través de la membrana celular. Al ser la célula más permeable, pierde el control del flujo de líquidos extracelulares al interior y del intercambio catiónico de la bomba sodio-potasio, provocando influjo pasivo de agua y un notable aumento de las concentraciones de algunos iones como Cl^- , K^+ y Na^+ . Estos cambios son posiblemente los responsables del aumento de volumen celular observado al microscopio y descrito con anterioridad, así como del incremento en las concentraciones de potasio extracelular. El conjunto de estas injurias irreversibles puede producir, en un momento aún indeterminado de dichos cambios, la sobreexpresión de la proteína p53 y, en algunos casos, la sucesiva programación de la muerte celular por apoptosis.

Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que es posible describir los efectos biológicos a partir de tres fenómenos morfológicos de destrucción leucocitaria: pérdida de la integridad celular en linfocitos a dosis de 3,21 a 10,29Gy, fragmentación leucocitaria especialmente a los 20Gy, y disociación lobular en neutrófilos a dosis de 50Gy y más.

La expresión de p53 en las muestras de sangre irradiada aumenta con respecto a la dosis de radiación, lo cual se encuentra fuertemente relacionado con las lesiones morfológicas producidas a las células, con escasa o nula probabilidad de reparación. En el caso del linfocito T, la radiosensibilidad es mayor en comparación con las células B.

Asimismo, es importante notar que la sangre irradiada a 25Gy usando el GC-220E excede la concentración de potasio considerada en los límites de referencia (3,6–5,5 mmol/L) a las 48 horas posteriores a su almacenaje a 4°C. Por lo anterior, si esta sangre es usada en medicina se recomienda transfundirla con el mínimo tiempo de almacenaje sin exceder las 48 horas.

Finalmente, los fenómenos de destrucción leucocitaria estudiados en este trabajo pueden ser útiles en la determinación de la calidad y estabilidad de la sangre irradiada para uso terapéutico y el futuro diseño de un protocolo de irradiación de sangre humana para el GC-220E.

Agradecimientos

CONACYT, Universidad de Sonora.

Referencias

01. Brostoff J, Scadding GK, Male A, Roitt IM. Clinical Immunology. Gower Medical Publishing, London & New Cork, 1991.
02. Pardo Mindán J, Panizo A, Martínez L. Valoración del sistema de polímeros de dextrano En Vision (PDE) en la detección inmunohistoquímica. Rev Esp Patol 1998;31:9-16.
03. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-57.
04. Agarwal P, Ray VL, Choudhury N, Chaudhar. Effect of pre-storage gamma irradiation on red blood cells. Indian J Med Res 2005;122:385-7.
05. Holmberg K, Meijer AE, Harms-Ringdahl M, Lambert B. Chromosomal instability in human lymphocytes after low dose rate c-irradiation and delayed mitogen stimulation. Int J Radiat Biol 1998;73:21-34.
06. Lucas JN. Cytogenetic signature for ionizing radiation. Int J Radiat Biol 1998;73:15-20.
07. Marples B, Wouters BG, Collis SJ, Chalmers AJ, Joiner MC. Low-dose hyper-radiosensitivity: a consequence of ineffective cell cycle arrest of radiation damaged G2-phase cells. Radiat Resp 2004;161:247-55.
08. Krasavin EA, Govorun RD, Shmakova NL, Koshlan IV, Nasanova EA, Repin MV. Genetic action of radiation with different physical characteristics on mammalian cells. Phys Part Nucl 2002;35:797-813.
09. Nasonova EA, Shmakova NL, Komova OV, Mel'nikova LA, Fadeeva TA, Krasavin EA, Ritter S. Cytogenetic effects of low-dose radiation with different LET in human peripheral blood lymphocytes. Radiat Environ Biophys 2006;45:307-12.
10. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. Harvey Lect 1966;62:21.

11. Dinning G, Doughty RW, Reid MM, Lloyd HL. Potassium concentrations in irradiated blood. *BMJ* 1991;303:1110.
12. Manwell RD, Feilgelson P. A modified method of preparing the J.S.B. stain. *J Lab Clin Med* 1948; 33:777-82.
13. Barlow DL. A simplified method of preparing a modifies Romanoswky blood stain. *Med J Austal* 1923;11:90.
14. Pérez-Carro Ríos A, Lozano Ramírez T, García Caballero R, Labella Caballero A, Clemente García A. Proteína p53 mediante inmunohistoquímica en el carcinoma epidermoide de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2003;54:263-8.
15. Cohen J. Apoptosis. *Immunol Today* 1993;4:126.
16. Meyn RE, Stephens LC, Mason KA, Medina D. Radiation-induced apoptosis in normal and premoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and P53 status. *Int J Cancer* 1996;66:466-72.
17. Tanaka H, Shilbagaki I, Shimada Y, Wagata T, Imamura M, Ishizaki K. Characterization of p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: Increased frequency and different spectrum of mutations from primary tumors. *Int J Cancer* 1996;65:372-6.
18. Hillman, Beyer G. Rapid determination of serum potassium by turbidity measurement with kalignost after protein precipitation. *Z Klin Chem Klin Biochem* 1967;5:93-4.
19. Santacruz-Gomez K. Estudio de los mecanismos biológicos inducidos post-irradiación gamma en leucocitos de adultos del sexo masculino. Tesis de especialización en Inmunohematología Diagnóstica. UNISON, Sonora, 2008.
20. Recomendaciones para la interpretación del frotis sanguíneo en morfología hematológica. Instituto de Salud Pública, Gobierno de Chile, 2004.
21. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 1984;142:67.
22. Guidelines for gamma irradiation of blood components. Australia.
23. Guidelines for gamma irradiation of blood components. Australian & New Zeland Society of Blood Transfusion Inc, 2000.
24. Olive P, Durand R. Apoptosis: an indicator of radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Biol* 1997;71:695-707.
25. 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* 1994;180:525-35.