

Rayos X inducen cambios en la viabilidad celular: expresión de Hsp70 y caspasa-8 en leucocitos humanos

Jennifer Ortiz Letechipia, David Alejandro García López, Consuelo Letechipia de León, Héctor Rene Vega Carrillo, Sergio Hugo Sánchez Rodríguez.

Universidad Autónoma de Zacatecas, Zac. México
jenniferoletechipia@live.com.mx

RESUMEN

Los leucocitos son células que pueden sufrir daño por radiación ionizante, tales como los rayos X utilizados comúnmente en consultorios odontológicos con fines de diagnóstico. Se ha reportado una relación entre la leucopenia y la exposición a la radiación ionizante, de tal manera que han sido utilizados como modelo biológico para exposición a radiaciones ionizantes. Se ha visto que el daño celular se manifiesta a través de la expresión de bioindicadores, como las proteínas Hsp, o con la muerte celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad, expresión de Hsp70 y caspasa-8 en leucocitos humanos expuestos a rayos X provenientes de equipos odontológicos. Se concluye que la tasa de muerte celular fue dependiente de la dosis de exposición. Los datos obtenidos determinan que la proteína Hsp70 es un bioindicador de estrés celular, mientras que la caspasa-8 es un bioindicador del proceso de muerte celular por apoptosis.

PALABRAS CLAVE

Leucocitos, rayos X, proteínas, Hsp70, caspasa-8.

ABSTRACT

Leukocytes are cells that can suffer damage from ionizing radiation, such as x-rays commonly used in dental offices for diagnostic purposes. A relationship between leukopenia and exposure to ionizing radiation has been reported, so that they have been used as a biological model for exposure to ionizing radiation. It has been seen that cell damage manifests itself through the expression of bioindicators, such as Hsp proteins, or with cell death. The objective of this work was to evaluate the feasibility, expression of Hsp70 and caspase-8 in human leukocytes exposed to X-rays from dental equipment. It is concluded that the rate of cell death was dependent on the exposure dose. The data obtained determine that the Hsp70 protein is a cell stress bioindicator, while caspase-8 is a bioindicator of the process of cell death due to apoptosis.

KEYWORD

Leukocytes, X-rays, proteins, Hsp70, caspase-8.

INTRODUCCIÓN

Los efectos a largo plazo asociados con la exposición a la radiación ionizante de dosis bajas son los principales factores de riesgo en el área de diagnóstico. Los profesionales de la radiación de estos centros siempre están expuestos a un daño celular potencial, ocasionado por dicha exposición. Varios estudios han sugerido que el riesgo de daño en los trabajadores expuestos a dosis de radiación más bajas que el límite fue mayor que el de sus compañeros no expuestos. Principalmente las células hematopoyéticas se consideran las más sensibles a la radiación, y entre ellas, los linfocitos muestran la mayor respuesta a la radiación de dosis baja (especialmente a los rayos X).^{1,2} Es común que se presente linfopenia como uno de los primeros síntomas a la exposición de radiación, además se presentan alteraciones en su metabolismo debido a cambios en la conformación de la membrana, su permeabilidad y actividad enzimática,³ por ende, la función de la célula cambia como resultado de los daños post-radiación. La facilidad de obtención, la gran cantidad de células que podemos obtener y su alta radiosensibilidad, hace de los leucocitos un modelo experimental idóneo para estudiar.

Por otra parte, las proteínas de estrés calórico (Hsp), pertenecen a una familia altamente conservadas a través de la evolución. En condiciones normales ayudan al plegamiento de proteínas, en los procesos de transporte a través de membranas, así como a su integración a diversos organelos. Una proteína importante es la Hsp70 la cual actúa como chaperona y juega un rol en la homeostasis de proteínas en la célula.⁴ Durante diversos procesos de estrés celular como choque térmico, exposición a metales pesados, a especies reactivas de oxígeno, a radiación (ionizante y no ionizante),⁵ entre otros, estas proteínas se sobre expresan para recuperar la homeostasis celular al renaturalizar proteínas o al inducir su destrucción cuando son dañadas.⁶ Además, se ha encontrado una relación directa a la dosis de radiación ionizante y la expresión de la proteína Hsp70 en células tumorales⁷ y en células sanguíneas inmunológicas.⁸

Sin embargo, la apoptosis es caracterizada por una serie de cambios morfológicos que incluyen la contracción celular, condensación de cromatina, fragmentación de ADN, presencia de vacuolas en la membrana, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos.⁹⁻¹¹ Para la regulación y ejecución de este proceso están presentes las caspasas, proteínas implicadas también en procesos de maduración proteica, por lo que errores en los procesos mediados por estas, son algunos de los principales responsables en el desarrollo de tumores y enfermedades autoinmunes.¹² Una de las funciones de caspasa-8 es iniciar la cascada de la apoptosis, en donde se recluta y procesa su procaspasa-8, generando dos fragmentos catalíticos que la conforman, a su vez esta conduce a la activación de otras proteínas para formar la cascada que culmina el proceso apoptótico.¹³

Se considera que las fuentes de rayos X de diagnóstico funcionan con una radiación de energía más baja (alrededor de 100 keV) con una transferencia de energía lineal más alta¹⁴ que otros dispositivos terapéuticos, sin embargo estas fuentes tienen un riesgo aceptable de daño debido a las dosis bajas (en el orden de 0.1 mGy a 400 mGy).¹⁵ Por esta razón, es de gran interés estudiar los efectos de los rayos X sobre los leucocitos ya que estos son los principalmente afectados por la exposición a la radiación ionizante, se ha observado en diversos estudios clínicos una disminución de estos en el personal ocupacionalmente expuesto.^{1,16}

Además, se ha investigado la relación entre la expresión de Hsp70 y caspasa-8 con la apoptosis en células expuestas a rayos X, en donde Hsp70 participa la recuperación de estas,^{7,8} y la caspasa-8 como proteasa mediadora de la apoptosis, inducida por la radiación.¹⁷

El objetivo de este trabajo es estudiar las proteínas Hsp70 y caspasa-8 como bioindicadores de daño celular en el proceso apoptótico en leucocitos humanos expuestos a diferentes dosis de rayos X odontológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Se seleccionaron 4 donadores de edades entre 19-24 años, sin historial de radioterapia, ni consumo de alcohol, tabaco, medicamentos, sin presentar síntomas y signos de enfermedad, evaluado esto previamente con un estudio general de salud, de los cuales se obtuvieron muestras de sangre venosa periférica (venopunción antebraquial), aproximadamente 5 ml con 50 μ L de heparina.

Exposición de leucocitos

La exposición de las muestras se realizaron con una fuente de rayos X marca Corix® de la empresa CORAMEX, S.A. cuyas condiciones de operación fueron tomadas con base al distribuidor (70 plus-USV) las dosis de exposición fueron calculadas y se establecieron para 5, 10, 20 y 30 disparos respectivamente para cada muestra y el duplicado, excepto los controles.

Determinación de la dosis absorbida

La dosis absorbida fue determinada usando TLD's (detectores termoluminiscentes), que se depositaron en viales de cono. Los TLD-100 fueron expuestos en grupos de cuatro, para cada diferente cantidad de disparos del equipo de rayos X. Un lote de TLDs 100 se usó para medir la radiación de fondo. El procedimiento se repitió con un monitor de estado sólido RaySafe modelo ThinX RAD que se activa cuando el equipo de rayos X se dispara. El mismo número de disparos usados para exponer los TLDs se usaron con el equipo RaySafe.

Cálculo de la dosis absorbida

Las respuestas de los TLDs expuestos se promediaron y se corrigieron con la respuesta promedio de los TLDs usados para medir el fondo. Estos valores se correlacionaron con las lecturas del monitor RaySafe y se obtuvo una correlación ($r^2=0.9987$) entre la respuesta de los TLDs en nanoCoulombs. La dosis en función de los disparos se muestra en la tabla I.

Evaluación de la viabilidad celular

Para la evaluación de la viabilidad celular, se realizaron frotis sanguíneos en portaobjetos y se procedió a teñirlas con colorante de Wright (WR0505 de la casa comercial Golden Bell®). Una vez realizado lo anterior, se observaron los frotis sanguíneos en un microscopio óptico con objetivo de inmersión y se realizó un conteo de 100 leucocitos para el control y las distintas dosis de exposición.¹¹

Tabla I. Dosis absorbida en función de los disparos.

Número de disparos	Dosis absorbida (mGy)
0	0
5	2.28 ± 0.05
10	4.56 ± 0.09
20	9.12 ± 0.18
30	13.69 ± 0.27

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Lisis celular

Cada muestra después de 40 min post-tratamiento fue lavada con solución PBS 1X y homogenizada en tubos Eppendorf con 500 µL de buffer de lisis que contiene: Triton X-100 al 1%, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 e inhibidor de proteasas 1 mM, PMSF (Sigma Chemical Co, St Louis MO, USA, P-7626), realizando inversiones sucesivas. El lisado celular se centrifugó por 10 minutos a 14,000 r.p.m. y el sobrenadante se recuperó para determinar la concentración de proteínas totales.

Cuantificación de proteínas y PAGE-SDS al 7.5%

La cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica descrita por Bradford en 1976. Para cada muestra 20 µg de proteína fueron caracterizados en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS al 7.5%) de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli en 1970.¹⁸

Western Blot e inmunodetección

Las proteínas en los geles de poliacrilamida-SDS se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Amersham Biosciences Laboratories, Buckinghamshire, England, RPN303C), tal como describió Towbin en 1979.¹⁹ El papel con las proteínas fue bloqueado con solución amortiguadora (PBS-Caseína al 3%) durante 12 horas, los papeles fueron incubados con anticuerpos monoclonales para identificar las proteínas Hsp70 (SC-24 Santa Cruz Biotechnology®) y caspasa-8 en dilución 1:1000 en solución bloqueadora, por 1 hora. Posteriormente se realizaron 5 lavados intercalados con PBS y PBS-Tween. Se procedió a incubar durante 1 hora con el segundo anticuerpo anti ratón y anti conejo para caspasa-8 IgG-HRP conjugado a peroxidasa (SC-2005 Lot F0412 Santa Cruz Biotechnology®). Al finalizar se realizaron 10 lavados intercalados con PBS y PBS-Tween. La unión antígeno-anticuerpo fue observada mediante colorimetría empleando una solución de Diaminobencidina al 0.1% activada con peróxido de hidrógeno, de tal manera que la sobre expresión de la proteína pudiera ser identificada.

RESULTADOS

Evaluación de la viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad de los leucocitos expuestos a rayos X para cada una de las muestras, se observó una disminución en el porcentaje promedio de células

vivas de 97.5% a 39.5% y un aumento en el porcentaje de células muertas de 2.5% a 60.5% respecto a las diferentes dosis de exposición, donde la última dosis (13.69 mGy) presentó mayor porcentaje de células muertas como lo representa la figura 1.

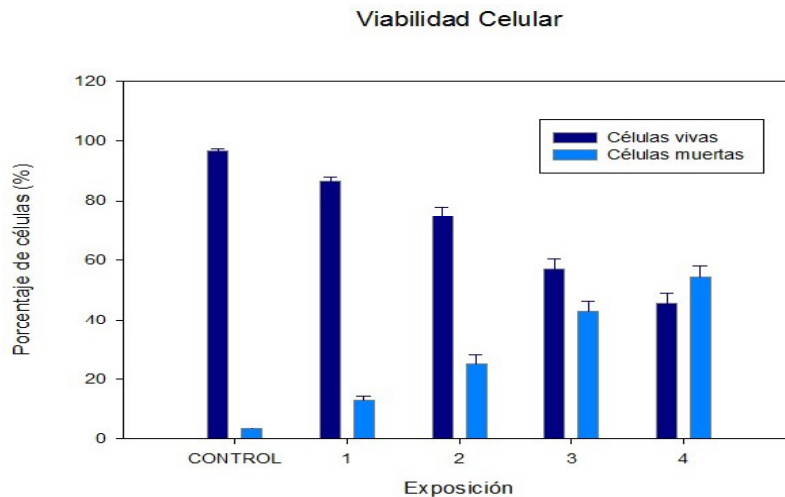


Fig. 1. Viabilidad de leucocitos humanos expuestos a rayos-X a diferentes dosis.

Expresión de proteínas

Expresión de Hsp70 en leucocitos humanos expuestos por rayos X

Se obtuvo una expresión basal de Hsp70 para el control y para las primeras dosis (2.28 ± 0.05 y 4.56 ± 0.09 mGy), en la tercera dosis la expresión se incrementó (9.12 ± 0.18 mGy), por otro lado para la dosis más alta (13.69 ± 0.27 mGy) la expresión disminuyó, figura 2.

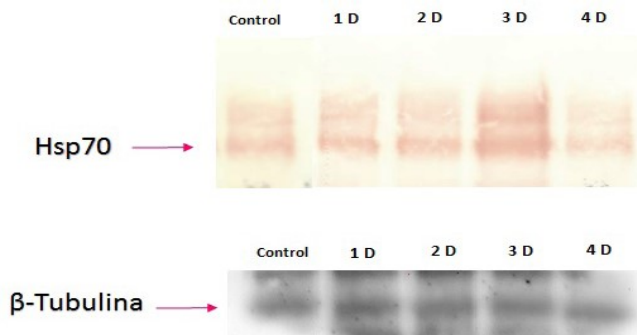


Fig. 2. Expresión de Hsp70 en leucocitos humanos expuestos a rayos-X.

Expresión de Caspasa-8 en leucocitos humanos expuestos por rayos X

Se obtuvo una expresión basal de caspasa-8 para el control, para las primeras dosis (2.28 ± 0.05 y 4.56 ± 0.09 mGy) la expresión se modificó, en la tercera dosis la expresión se incrementó (9.12 ± 0.18 mGy), por otro lado para la dosis más alta (13.69 ± 0.27 mGy) la expresión disminuyó ver figura 3.

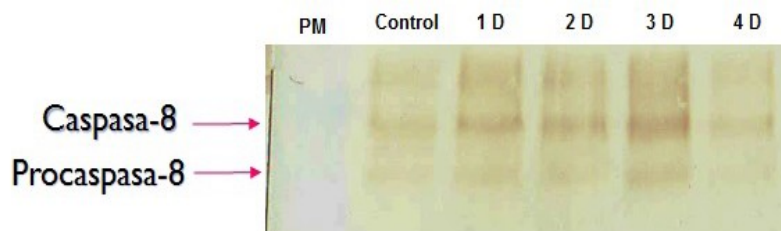


Fig. 3. Expresión de Caspasa-8 en Leucocitos humanos expuestos a rayos-X.

DISCUSIÓN

La viabilidad celular de los leucocitos expuestos a rayos X para cada una de las muestras, disminuyó respecto a la cantidad de dosis recibida, ocasionando un aumento en el porcentaje de células muertas, presentando así para la última dosis un porcentaje mayor de células muertas, posiblemente esto es resultado del daño celular producido, lo anterior es similar a los resultados obtenidos por¹⁶ donde disminuye el número de células sanguíneas en POES expuestos a rayos X.

El comportamiento en la sobre expresión de Hsp70 es un bioindicador de estrés celular por radiación ionizante como lo reporta,⁸ de tal manera que los datos generados en el trabajo demuestran este hecho por exposición rayos X. Por lo anterior se observó un incremento de esta proteína exponencialmente para la primera, segunda y tercera dosis y una disminución para la cuarta dosis, este comportamiento posiblemente se puede deber a que el daño celular para esa dosis fue letal y por consiguiente su mecanismo de respuesta no fue el óptimo. Datos reportados por²⁰ coinciden con esta explicación pero con otro modelo biológico como células C3H 10T1/2 cuando fueron expuestas a rayos gamma de 7.5 Gy, además con el trabajo reportado²¹ en células de carcinoma expuestas a 10 Gy en gammas.

Al observar que con el incremento de dosis de irradiación la viabilidad celular disminuyó, se procedió a medir la expresión de caspasa-8 para determinar si esta muerte es por apoptosis, esta proteína modificó su expresión para las primeras dosis (2.28 ± 0.05 y 4.56 ± 0.09 mGy), en la tercera dosis se incrementó (9.12 ± 0.18 mGy) y para la dosis más alta (13.69 ± 0.27 mGy) la expresión decayó, estos resultados coinciden con los reportados por,¹⁷ donde la caspasa-8 incrementa su expresión por inducción de la radiación en diversos tipos celulares y también por²² en células de glioma expuestas a 2.3 Gy de rayos gamma.

CONCLUSIONES

El porcentaje de muerte celular es dependiente del incremento a la dosis de exposición por rayos X, debido al daño celular producido en las diferentes células sanguíneas.

Los datos obtenidos determinan que la proteína Hsp70 es un bioindicador de estrés celular, mientras que la caspasa-8 es un bioindicador del proceso de muerte celular por apoptosis. El daño celular de los leucocitos expuestos a rayos X provenientes de equipos odontológicos, provee información relevante para implementar mecanismos de protección en el área de seguridad radiológica.

Se observa muerte celular conforme aumenta la dosis de exposición, debido a esto la expresión de caspasa-8, nos indica que los leucocitos posiblemente mueren por un proceso apoptótico, sin embargo esta no es suficiente para determinar si el proceso de apoptosis se activó, por consiguiente, esto se corroborará con la evaluación morfológica de las células sometidas a estos campos de radiación.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. en C. Sergio Hugo Sánchez Rodríguez y su equipo de trabajo del laboratorio de biología celular y neurobiología en la Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. Al Dr. en C. Eduardo Medrano Cortes, del departamento de Radiología en la Unidad Académica de Odontología, Universidad Autónoma de Zacatecas.

REFERENCIAS

1. Davudian Talab, A., Z. Farzanegan, and F. Mahmoudi, Effects of Occupational Exposure on Blood Cells of Radiographers Working in Diagnostic Radiology Department of Khuzestan Province. *Iranian Journal of Medical Physics*, 2018. 15(2): p. 66-70.
2. Brengues, M., *et al.*, T lymphocytes to predict radiation-induced late effects in normal tissues. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2017. 17(2): p. 119-127.
3. Feinendegen, L.E. and J.M. Cuttler, Biological Effects From Low Doses and Dose Rates of Ionizing Radiation: Science in the Service of Protecting Humans, a Synopsis. *Health Physics*, 2018. 114(6): p. 623-626.
4. Mayer, M.P., Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013. 38(10): p. 507-514.
5. Eriksson, D. and T. Stigbrand, Radiation-induced cell death mechanisms. 2010. 31: p. 363-72.
6. Sarkar, S. and S. Roy, A MINI REVIEW ON HEAT SHOCK PROTEINS (HSPS): SPECIAL EMPHASIS ON HEAT SHOCK PROTEIN70 (HSP70). Vol. 9. 2017. 129-138.
7. Murakami, N., *et al.*, Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells. *Radiation Oncology*, 2015. 10(1): p. 1-13.
8. Multhoff, G., *et al.*, The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Letters*, 2015. 368(2): p. 179-184.
9. Wolnicka-Głubisz, A., *et al.*, Apoptosis in leukocytes induced by UVA in the presence of 8-methoxypsoralen, chlorpromazine or 4,6,4'-trimethylangelicin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2002. 68(2): p. 65-72.
10. Kessel, D., Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 2019. 95(1): p. 119-125.
11. Shidham, V.B. and V.K. Swami, Evaluation of Apoptotic Leukocytes in Peripheral Blood Smears. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2000. 124(9): p. 1291-1294.

12. McArthur, K. and B.T. Kile, Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends in Cell Biology*, 2018. 28(6): p. 475-493.
13. Tummers, B. and D.R. Green, Caspase-8: regulating life and death. *Immunological Reviews*, 2017. 277(1): p. 76-89.
14. Hall, J., et al., Ionizing radiation biomarkers in epidemiological studies – An update. *Mutation, Research/Reviews in Mutation Research*, 2017. 771: p. 59-84.
15. Truong, K., *et al.*, The effect of well-characterized, very low-dose x-ray radiation on fibroblasts. *PLoS ONE*, 2018. 13(1): p. 1-16.
16. Faraj, K. and S. Mohammed, Effects of chronic exposure of X-ray on hematological parameters in human blood. *Comparative Clinical Pathology*, 2018. 27(1): p. 31-36.
17. Rahmanian, N., S.J. Hosseinimehr, and A. Khalaj, The paradox role of caspase cascade in ionizing radiation therapy. *Journal of Biomedical Science*, 2016. 23: p. 1-13.
18. He, F., Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol*, 2011. 1(11): p. e80.
19. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979. 76(9): p. 4350-4354.
20. Calini, V., C. Urani, and M. Camatini, Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicology in Vitro*, 2003. 17(5): p. 561-566.
21. Gehrman, M., *et al.*, Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death And Differentiation*, 2004. 12: p. 38.
22. Afshar, G., *et al.*, Radiation-Induced Caspase-8 Mediates p53-Independent Apoptosis in Glioma Cells. *Cancer Research*, 2006. 66(8): p. 4223-4232.