



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

Análisis de la influencia in vitro de bajas dosis de radiación producidas por ^{222}Rn sobre proliferación celular, apoptosis y respuesta a agentes citotóxicos

Carlos Sainz Fernández

Santander 2002

INDICE

| | PÁGINA |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| | |
| CAPÍTULO I .- Efectos de las radiaciones ionizantes sobre sistemas biológicos..... | 14 |
| 1.- Efectos a escala molecular | 15 |
| 1.1 .- Formación de radicales libres..... | 16 |
| 1.2 .- Efectos sobre ADN, mecanismos de reparación y mutagénesis. | 19 |
| 1.3 .- Aberraciones cromosómicas | 25 |
| 1.4 .- Interacción con otros componentes celulares..... | 27 |
| 2 .- Efectos a escala celular..... | 29 |
| 2.1 .- Respuestas generales..... | 30 |
| 2.2 .- Apoptosis/necrosis..... | 30 |
| 2.3 .- Curvas de supervivencia | 33 |
| 2.4 .- Influencia del tipo de radiación y de la tasa de dosis..... | 36 |
| 3.- Efectos de bajas dosis | 37 |
| 3.1.- Efectos a escala celular | 39 |
| 3.2.- Efectos a escala orgánica. Epidemiología | 40 |
| | |
| CAPÍTULO II.- Metodología de irradiación y dosis..... | 44 |
| 1.- Sistema de irradiación..... | 45 |
| 1.1.- Irradiación con dosis altas | 45 |
| 1.2.- Irradiación con dosis bajas | 46 |
| 2.- Cadena de espectrometría γ..... | 53 |
| 2.1.- Descripción | 53 |
| 2.2.- Calibración y puesta a punto | 58 |

| | |
|---|------------|
| 2.3.- Determinación de actividades | 65 |
| 2.3.1.- Cálculo de actividad | 66 |
| 2.3.2.- Errores en la medida de actividad | 66 |
| 3.- Dosimetría | 68 |
| 3.1.- Microdosimetría α | 75 |
| 3.2.- Simulación Montecarlo..... | 80 |
| | |
| CAPÍTULO III.- Metodología e instrumentación de análisis celular | 84 |
| | |
| 1.- Hemocitómetro y test de exclusión de colorante “Trypan blue” | 85 |
| 2.- Citometría de flujo..... | 86 |
| 3- PCR | 92 |
| 4.- Electroforesis en gel..... | 93 |
| 5.- Secuenciación de DNA..... | 94 |
| | |
| CAPÍTULO IV .- Proliferación en 3T3 y MCF-7..... | 96 |
| | |
| 1.- Introducción | 97 |
| 2.- Irradiación y cultivo de 3T3 y MCF-7 | 98 |
| 3.- Resultados en 3T3 | 101 |
| 4.- Resultados en MCF-7 | 103 |
| 5.- Discusión..... | 105 |
| | |
| CAPÍTULO V.- Proliferación, apoptosis y muerte celular en CD34+ | 109 |
| | |
| 1.- Irradiación y cultivo de CD34+ | 110 |
| 2.- Proliferación de CD34+..... | 114 |
| 3.- Apoptosis y muerte celular total..... | 118 |
| 4.- Discusión..... | 123 |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO VI.- Expresión de genes relacionados con apoptosis | 126 |
| 1.- Introducción | 127 |
| 2.- Protocolos para análisis genéticos | 128 |
| 3.- Resultados en MCF-7 | 130 |
| 4.- Discusión..... | 133 |
| | |
| CAPÍTULO VII.- Sensibilización a quimioterápicos | 137 |
| 1.- Introducción | 138 |
| 2.- Descripción de experimentos | 140 |
| 3.- Resultados de la combinación radiación/Taxol..... | 142 |
| 4.- Resultados de la combinación radiación/VP-16..... | 144 |
| 5.- Análisis de ciclo celular y apoptosis | 147 |
| 6.- Discusión..... | 153 |
| | |
| CONCLUSIONES .-..... | 159 |
| | |
| BIBLIOGRAFÍA.- | 163 |

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El estudio de los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes resulta siempre complejo debido al carácter multidisciplinar que lo caracteriza. La sucesión de procesos que tiene lugar desde la interacción primaria radiación-célula viva hasta la observación del efecto biológico requiere la contribución de diferentes campos de la ciencia, desde la física nuclear hasta la bioquímica o la fisiología. La física es capaz de abordar gran parte de estos procesos que componen la interacción radiobiológica. El campo de acción de la física en este marco es muy amplio, abarcando desde la caracterización de los fenómenos básicos de ionización/excitación que ocurren a escala atómica y el cálculo de la energía depositada en el sistema biológico estudiado, hasta la instrumentación empleada en los diferentes análisis dosimétricos y biológicos, y la metodología correspondiente.

La acción de las radiaciones ionizantes sobre la célula viva puede considerarse siempre lesiva. Sin embargo, al igual que ocurre con otros agentes ambientales, su toxicidad depende de la dosis. En dosis elevadas, cualquier agente físico o químico externo a la célula resulta nocivo, e incluso letal. En dosis altas, por encima de 1 Gy, se producen siempre efectos negativos para la salud humana. Algunos de ellos son provocados por la inducción de muerte celular por la radiación y presentan una relación dosis efecto lineal, de forma que cuanto mayor sea la dosis recibida, mayor será la gravedad de los efectos. Para este tipo de respuestas se asume la existencia de un umbral para la dosis [ICR90], es decir, una dosis mínima necesaria para provocar un número tal de muertes celulares en el tejido irradiado que haga que el efecto se manifieste.

Existe otro tipo de efectos cuya gravedad no aumenta con la dosis. La aparición de estos efectos es probabilística, de manera que el incremento de la dosis supone un incremento de la probabilidad de ocurrencia del efecto y no de su gravedad. El ejemplo más significativo de este tipo de respuestas es la inducción de cáncer por la radiación ionizante. Partiendo de la hipótesis que supone que la iniciación del cáncer está en mutaciones en el material genético de la célula, que no son reparadas o lo son incorrectamente, el aumento de la dosis de radiación incrementa la probabilidad de ocurrencia de dichas mutaciones, pero no la gravedad de las consecuencias biológicas de las mismas. Para este conjunto de efectos denominados estocásticos [UNS00] se

asume que no existe un umbral de dosis por debajo del cual pueda asegurarse que el efecto no aparecerá. Esta hipótesis considera que la relación dosis efecto es lineal en todo el rango de dosis. Según esto, se considera que los efectos producidos por dosis bajas y muy bajas de radiación son extrapolables de los observados en el rango de dosis mayores [NCR95]. La principal justificación de esta asunción está en la protección de las personas frente a cualquier dosis de radiación ionizante, por pequeña que sea. Desde los organismos reguladores se considera que esta hipótesis debe ser mantenida hasta que no se demuestre suficientemente la ausencia de efectos perjudiciales por debajo de un determinado umbral.

La demostración de efectos biológicos de la irradiación en el intervalo de bajas dosis presenta problemas prácticos cuando se aborda desde la perspectiva epidemiológica. Para este tipo de estudios resulta necesario analizar grupos de población suficientemente amplios, con grupos de control adecuados, para conseguir la significación estadística necesaria [CON84]. A lo anterior hay que añadir la dificultad que supone aislar el efecto producido por dosis muy bajas de radiación de los debidos a otras variables ambientales y sociales igualmente influyentes, como son la presencia de contaminantes, la alimentación y los hábitos de vida de las poblaciones estudiadas. Esta es una de las razones fundamentales por las que la experimentación en cultivos celulares in vitro constituye una base fundamental y un punto de partida para la comprensión de los mecanismos que subyacen a estas respuestas.

La experimentación in vitro con bajas dosis de radiación tiene interés desde tres puntos de vista:

- las dosis ambientales recibidas por los seres vivos son bajas
- la elaboración de normas de protección de las personas frente a las radiaciones ionizantes precisa un conocimiento lo más exhaustivo posible de los efectos que se producen por dosis próximas a las ambientales
- la posibilidad de utilización terapéutica en diferentes afecciones

Desde la perspectiva ambiental, alrededor del 50 % de la dosis recibida por los seres humanos por causas naturales es debida al gas radiactivo radón (^{222}Rn). Este gas está presente en todos los lugares habitados por el hombre [QUI89] y es el responsable

de la mayor parte de la dosis recibida por fuentes naturales de radiación [QUI91]. El radón es producto de la desintegración del ^{226}Ra , el cual es a su vez un elemento de la cadena de desintegración del ^{238}U , que forma parte de la composición natural de suelos, rocas y aguas de la corteza terrestre. El interés de los estudios acerca de sus efectos sobre la salud radica en que por su carácter gaseoso, puede acumularse en recintos cerrados como viviendas, balnearios, cuevas o minas, alcanzando concentraciones elevadas. Este hecho es especialmente notable en aquellas regiones que, por la composición geológica de sus suelos y rocas, presentan altos niveles de radiación natural. La irradiación que el radón y sus descendientes de vida corta producen en el hombre se debe principalmente a su inhalación. Sus efectos en concentraciones elevadas, dando lugar a dosis altas son conocidos [CRO84, ELL90].

Sin embargo, cuando las dosis se encuentran en las proximidades de las correspondientes a valores medios ambientales, la presunción de efectos nocivos debidos al radón, y en general a la radiactividad de origen natural, plantea cuestiones como la posible adaptación de los seres vivos a un ambiente en el que se han recibido siempre estas radiaciones. Ante este hecho innegable, cabe preguntarse si los efectos que el radón produce en este rango de dosis pueden ser perjudiciales, inocuos o incluso favorables. Por ello, una vez conocidos los efectos perjudiciales a dosis altas, resultan necesarios estudios más completos de irradiación con bajas dosis que especifiquen y cuantifiquen los efectos existentes.

En la composición de la radiación de origen natural, las partículas α tienen un papel determinante por los efectos biológicos que producen. Las bajas dosis de este tipo de radiación tienen particularidades dosimétricas que deben ser tenidas en cuenta en la valoración de los efectos biológicos que producen. La mayor parte de las estimaciones de riesgos relacionados con la exposición a este tipo de radiación se basan en las características de las interacciones directas con macromoléculas biológicas. Sin embargo, el corto alcance de este tipo de radiación hace que, en dosis bajas, la probabilidad de ocurrencia de tales interacciones sea muy baja. Por el contrario, el efecto biológico debe interpretarse sobre la base de la interacción indirecta con estas moléculas clave, mucho más probable. La interacción mediada por especies químicas reactivas puede resultar menos traumática para la célula, permitiendo la actuación de sus mecanismos de defensa. Teniendo en cuenta que la deposición de energía

normalmente no es directa en los blancos radiobiológicos, el daño producido en los mismos puede resultar reparable. Así, las lesiones iniciales producidas por la radiación, pueden inducir la actividad de mecanismos de reparación enzimática que preparen a la célula ante posteriores agresiones, en un proceso dinámico de adaptación.

Desde el punto de vista de la protección radiológica se presupone que los efectos esperados en el rango de bajas dosis surgen de la extrapolación de la relación dosis-efecto observada a dosis altas. La aceptación de la existencia de un umbral de dosis para los efectos estocásticos debe ser estudiada experimentalmente y supondría una profunda reestructuración de los actuales sistemas de vigilancia y protección radiológica.

En este contexto, numerosos estudios apuntan hacia la existencia de efectos en el rango de dosis bajas, del orden del cGy y menores, cualitativamente diferentes de los observados en dosis mayores [SAG87]. Estos efectos se interpretan por la actuación de los mecanismos de defensa naturales de que la célula dispone para defenderse y adaptarse a las agresiones del entorno. La llamada respuesta adaptativa ha sido comprobada y caracterizada en cultivos celulares *in vitro*, y existen evidencias de su existencia en organismos completos [UNS94, WOL98]. De manera general, puede afirmarse que los efectos que muestran la capacidad de los seres vivos para adaptarse al entorno surgen del balance entre la intensidad de las agresiones recibidas y la eficacia de los mecanismos de respuesta frente a tales agresiones. En el caso de las radiaciones ionizantes, los efectos observados en seres vivos pueden interpretarse en base a la comparación entre las dosis recibidas y la capacidad de reparación de los daños producidos por dichas dosis. Este balance resulta desfavorable cuando las dosis de radiación son elevadas, y podría equilibrarse, e incluso inclinarse a favor de una respuesta de distinto tipo en el rango de dosis bajas. [JAW95, POL97]

Cabe añadir en este sentido que los efectos debidos a las radiaciones ionizantes procedentes de fuentes de radiación naturales son, por supuesto, iguales a los producidos por otras fuentes de radiación que generen las mismas dosis. Por ello los resultados de esta clase de estudios son extrapolables a otras situaciones de exposición tales como las exposiciones médicas o, en general, profesionales a fuentes artificiales de radiación.

Por fin, la experimentación *in vitro* con bajas dosis de radiación constituye una base para la comprensión de determinadas aplicaciones terapéuticas. Éstas son llevadas a cabo fundamentalmente en balnearios radiactivos, donde las dosis debidas al radón y descendientes recibidas por los pacientes son moderadamente superiores a las dosis promedio ambientales. Entre las afecciones tratadas destacan los trastornos nerviosos y patologías relacionadas con desregulaciones en la respuesta inmunitaria como son la artritis reumatoidea, el asma bronquial o la psoriasis. Algunos estudios experimentales de irradiación *in vitro* y en animales de laboratorio muestran explicaciones, aún incompletas, de este tipo de efectos [GOS90, DEE90].

En experimentos sobre la influencia de bajas dosis de radiación sobre el potencial de membrana se han encontrado cambios en dicho valor [RED77], y en el flujo de iones K^+ dependientes de la dosis [KUO93]. Este tipo de efecto también ha sido observado tras la irradiación de células nerviosas con radón [SOT96]. Por otro lado, el mecanismo genérico de acción de las bajas dosis sobre el sistema inmunitario parece implicar cambios en la concentración de calcio intracelular junto con la expresión del gen *c fos* relacionado con la activación de células T [KAR92, ISH93]. En ratones irradiados se ha observado una regulación de la relación entre células T ayudantes y T supresoras con disminución selectiva de estas últimas en respuesta a dosis entre 25 y 250 mGy [NAG96]. En esta línea, parece que la acción sobre el sistema inmunitario de las bajas dosis producidas en el organismo por el radón está relacionada con cambios hormonales que dan lugar a modificaciones en los diferentes grupos de células T que componen este sistema [LIU93].

Teniendo en cuenta el interés que presenta la experimentación *in vitro* con bajas dosis de radiación, hemos llevado a cabo un conjunto de experimentos de irradiación de diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales. La memoria que se presenta se estructura en tres bloques referidos a generalidades acerca de la interacción entre radiaciones ionizantes y materia viva, instrumentación y metodología de irradiación y análisis celulares y presentación de resultados, respectivamente.

En el primer capítulo se describen las bases de la interacción entre las radiaciones ionizantes y la materia viva. Actualmente se dispone de gran cantidad de información acerca de los fundamentos de esta interacción. Sin embargo, la

interpretación de algunos efectos de las radiaciones sigue resultando complicada, especialmente al aumentar la escala de complejidad a la que se deseen analizar dichos efectos. Por eso, en esta parte se aborda la descripción de algunos efectos producidos por las radiaciones a diferentes escalas. Partiendo de la interacción primaria de la radiación con diferentes componentes celulares se describen efectos moleculares, celulares y orgánicos haciendo hincapié en las bajas dosis de radiación de alta LET, objeto de estudio de los experimentos que se presentan en esta memoria. Finalmente se ha dedicado un apartado a la descripción de algunos efectos observados en el rango de dosis bajas tanto a escala celular como a escala orgánica con experimentos en animales y estudios epidemiológicos.

En los dos siguientes capítulos se describen la metodología y la instrumentación utilizadas para realizar los experimentos de irradiación celular que se muestran posteriormente. En el primer apartado se muestra con detalle el sistema utilizado para introducir el radón en el medio de cultivo celular. Consiste en una fuente calibrada de ^{226}Ra desde la cual el radón difunde hasta entrar en contacto con el medio de cultivo y disolverse en él. Después se describe la cadena de espectrometría gamma utilizada para medir las concentraciones de radón disuelto en los medios de cultivo preparados para la irradiación celular. También se detallan tanto los cálculos de actividad como la calibración del sistema.

A continuación se presenta la dosimetría empleada en las dos condiciones experimentales probadas, es decir, cultivos celulares en placas abiertas al ambiente y en tubos cerrados. A continuación se señalan algunas de las dificultades que surgen al abordar la dosimetría de la radiación α desde una perspectiva microscópica. Al hilo de estas consideraciones se presenta una simulación sencilla tipo Montecarlo realizada con el fin de estimar el porcentaje de células irradiadas en los dos casos presentados

En cuanto a la instrumentación usada para realizar los análisis celulares se describe la técnica de recuento celular utilizando el hemocitómetro y el test de exclusión de colorante “trypan blue” empleado para estimar la viabilidad de una población celular. También se exponen las bases de la citometría de flujo, usada para el análisis de ciclo celular y apoptosis, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis en gel, éstas últimas empleadas en los estudios de expresión de genes. Finalmente, también

se describe brevemente la técnica de secuenciación de ADN, usada para identificar fragmentos de ADN que se deseen analizar.

En el primero de los cuatro capítulos dedicados a la exposición de resultados obtenidos tras irradiar diferentes líneas celulares se presentan los protocolos seguidos para el cultivo celular y los resultados obtenidos tras irradiar células 3T3 (fibroblastos, no tumorales) y MCF-7 (cáncer de mama humano metastásico). Estas líneas tienen periodos de mitosis relativamente cortos (del orden de horas), resultando ser modelos de experimentación útiles para observar cambios en periodos de tiempo reducidos. Los resultados son referentes a la influencia de las bajas dosis de radiación empleadas (entre 0.01 y 15 mGy) en la proliferación de estas líneas celulares.

Utilizando una metodología de cultivo diferente se analizó la influencia de dosis bajas (entre 0.3 y 0.6 Gy) de radiación α sobre el crecimiento de precursores hematopoyéticos CD34+, no tumorales. A pesar de que la médula ósea es uno de los sistemas del organismo más afectado por dosis altas de radiación, no hay trabajos previos acerca de los efectos que se producen en CD34+ tras la exposición a dosis bajas de radiación de alta LET. Nuestra observación de cambios significativos en la proliferación de las células irradiadas nos llevó a analizar también cambios en los niveles de apoptosis temprana y muerte celular total (causada por apoptosis y necrosis).

Con respecto a la línea tumoral MCF-7, en un interesante estudio realizado por Sumantran [SUM95] se observó una sensibilización celular a la acción de los agentes quimioterápicos Taxol y VP16 cuando las células eran transfectadas con adenovirus con el fin de incrementar la expresión del gen inductor de apoptosis bcl-x_s. Estos fármacos actúan induciendo apoptosis y existen indicios que relacionan la resistencia celular a su acción con la expresión de genes inhibidores de este mecanismo de muerte celular, pertenecientes a la familia bcl-2 [MIN95, DOL94, FUK99].

Tras observar un efecto no lineal en la proliferación de las MCF-7 irradiadas, realizamos más experimentos de irradiación para poner a prueba la hipótesis de que las bajas dosis de radiación α pudieran sensibilizar a estas células a la acción de los fármacos. Este estudio se llevó a cabo en dos etapas. En la primera se realizaron análisis genéticos enfocados a estudiar modificaciones en la expresión de los principales

miembros de la familia multigénica bcl-2 relacionada con la apoptosis y con fenómenos de resistencia quimioterápica.

En la segunda etapa se combinó la irradiación con bajas dosis con la administración de diferentes concentraciones de Taxol y VP16. Las variables utilizadas para estudiar el posible efecto sensibilizante de la radiación fueron la proliferación y viabilidad celulares, y el nivel de apoptosis. Finalmente, también se analizó la relación entre este último valor y la fase del ciclo celular en que se encontraron las células tras la Irradiación y/o administración de fármacos.