

CAPÍTULO V

Proliferación, apoptosis y muerte celular en CD34+

1.- Irradiación y cultivo de CD34+

2.- Proliferación de CD34+

3.- Apoptosis y muerte celular total

4.- Discusión

1.- Irradiación y cultivo de CD34+

Por la gran actividad proliferativa que posee, el sistema hematopoyético es muy sensible a la radiación y el estudio de los efectos que ésta produce en las células de este sistema resulta de gran interés. En experimentación animal, se han observado efectos producidos por dosis intermedias y altas de radiación α cuantitativamente diferentes de los producidos por radiación de baja LET. Estos efectos han sido estudiados en diferentes etapas del desarrollo de los animales experimentales, desde el periodo embrionario hasta la etapa adulta. [LOR93, JIA94, YAN95, GRA 95]. Sin embargo, no se encuentran estudios acerca de los efectos que producen dosis muy bajas de radiación de alta LET sobre las líneas celulares que componen este tejido.

El análisis de la influencia de la radiación ionizante sobre la apoptosis es interesante por la relevancia que este fenómeno tiene en los sistemas celulares muy proliferativos. Cultivadas in vitro, las células CD34+ expresan inicialmente el gen bcl-2 (inhibidor de apoptosis), y esta expresión se pierde gradualmente, volviéndose las células positivas al gen Fas (inductor de apoptosis) [NAG96b]. En estudios de irradiación en organismos completos, el número de CD34+ presentes en sangre periférica después de una irradiación suele utilizarse como marcador del número de células residuales presentes en la médula ósea y de la regeneración de la misma [WAG95] Junto con esto, los niveles de apoptosis se ven aumentados cuando las células se ven sometidas a estrés antes o durante el cultivo. De nuevo, no se encuentran trabajos acerca de la influencia que la radiación de alta LET tiene sobre la apoptosis en esta línea celular.

Para estudiar los efectos que las bajas dosis de radiación α tienen sobre las células del sistema hematopoyético hemos irradiado células precursoras CD34+. Este sistema está integrado por gran variedad de tipos celulares que pueden agruparse en tres compartimentos en función de su capacidad proliferativa y de su diferenciación [LAJ79]. En los cultivos irradiados se encuentran inicialmente células madre CD34+, con gran capacidad proliferativa y de diferenciación hacia todos los linajes hematopoyéticos. En el transcurso de los experimentos aparecen nuevos tipos celulares como células en maduración y progenitores comprometidos. Este grupo heterogéneo está constituido por células con capacidad de diferenciación restringida hacia alguna

línea celular concreta. Cada una de éstas dará lugar a células maduras y completamente diferenciadas que constituyen el último eslabón del sistema hematopoyético

Las células precursoras hematopoyéticas CD34+ empleadas han sido obtenidas de placenta humana. Las células se mantienen congeladas hasta el momento de inicio del experimento. Una vez descongeladas las células son suspendidas en medio Dulbecco Iscove modificado (IMDM; GIBCO Laboratories, Grand Island, NY) suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS; GIBCO Laboratories) y factores de crecimiento hematopoyéticos (HGF's como citoquinas de tipo TPO, FL, SCF, IL3, IL6) en viales de cristal de 5 ml herméticamente cerrados. Para analizar la capacidad proliferativa de los progenitores se incuban un número de células irradiadas durante 24 o 48h, en medio semisólido formado por IMDM suplementado con 25% suero equino (HS; GIBCO Laboratories) y 10% medio condicionado Wehi-3b mezclado con Bactoagar (0.3% concentración final, Difco Laboratories Detroit MI). Posteriormente, al cabo de 14 días se realiza el recuento de colonias formadas.

La exposición al ^{222}Rn se realiza justo después de descongeladas, ya que se observa que a medida que transcurre el tiempo de cultivo las células pierden sus propiedades de "stem" y se pretende analizar su respuesta a la radiación en su estado más pluripotente. El sistema de irradiación y la medida de la actividad de radón en equilibrio con sus descendientes, son los mismo que en el caso de las células tumorales MCF-7. La hermeticidad de los tubos en los que se realiza el cultivo garantiza la presencia del radón durante todo el experimento, siendo este y sus descendientes emisores alfa (^{214}Po y ^{218}Po) los responsables principales de la dosis absorbida por las células. Las emisiones beta y gamma no depositan apenas energía en las reducidas dimensiones de los tubos de cultivo y no son tenidas en cuenta para las consideraciones dosimétricas.

La dosis absorbida por los cultivos durante el periodo de irradiación puede ser calculada como:

$$D = \int_0^t C(t) \cdot \dot{D}(t) \cdot dt$$

donde

$C(t)$: Concentración de radón en el instante t

\dot{D} : tasa de dosis para un Bq/l en equilibrio

t : duración del experimento

Debido a que la duración de los experimentos realizados es pequeña con respecto a la vida media del radón (3.8 d), la concentración de equilibrio de éste con sus descendientes se mantiene prácticamente constante. De igual manera, la concentración permanece prácticamente constante en la duración de los experimentos. Así la dosis absorbida durante el experimento viene dada por:

$$D = C \cdot \dot{D} \cdot t$$

Las dosis absorbidas en los experimentos se encuentran entre 0.3 y 0.6 Gy. Después de la disolución y medida de la cantidad de radón presente en el medio de cultivo, las células son inyectadas junto con factores de crecimiento (citoquinas) y analizadas tras diferentes tiempos de exposición. La actividad proliferativa de este tipo de células llamadas también “unidades formadoras de colonias” o CFU-X, (donde X es el linaje de diferenciación para el cual están comprometidas) ha sido también analizada por su capacidad para formar in vitro colonias de células maduras. El esquema de realización de estas experiencias se muestra en la Figura 5.1.

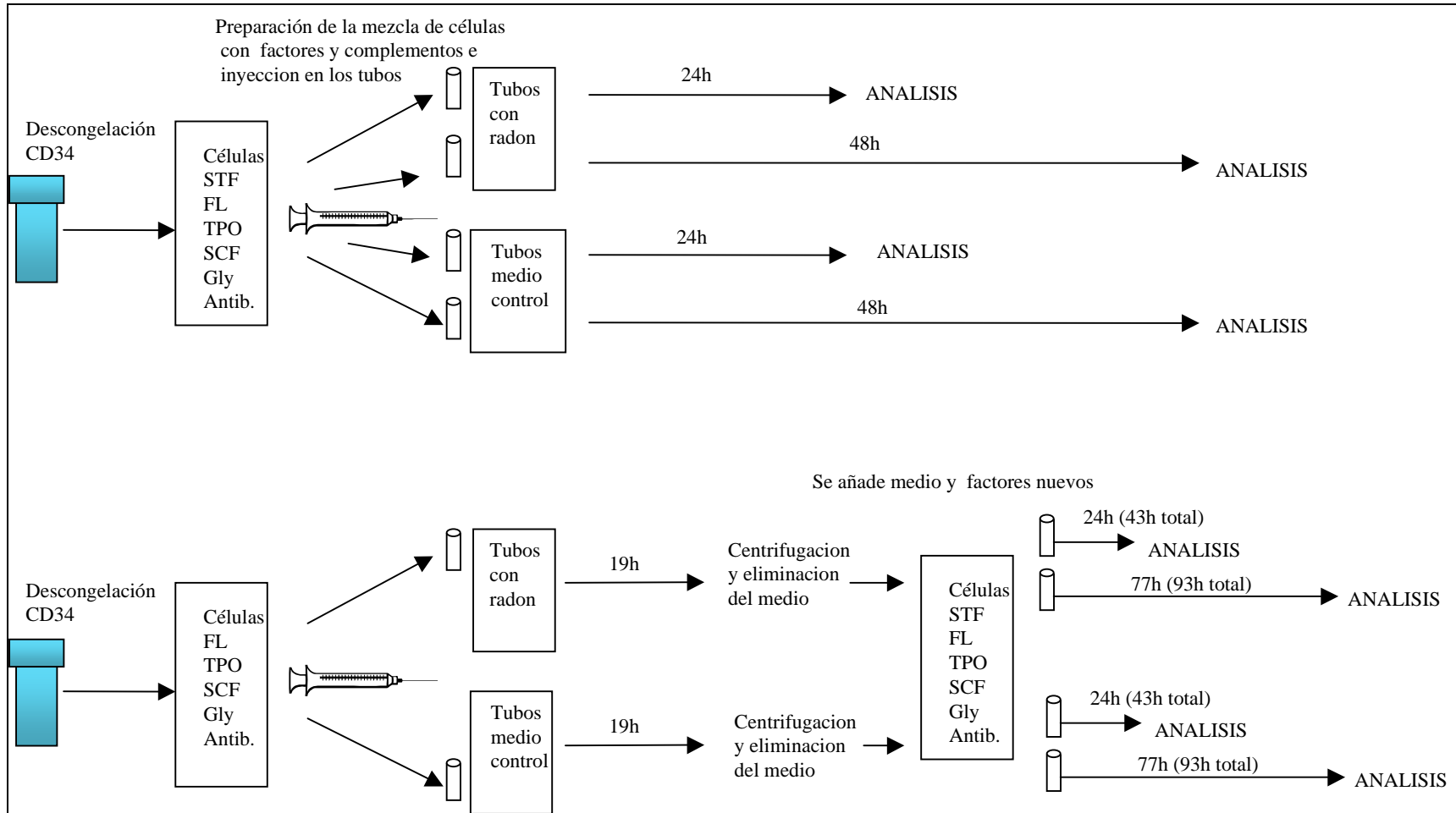


Fig. 5.1: Esquema de los experimentos de irradiación de CD34+

2.- Proliferación

Se ha estudiado el efecto producido por dosis moderadamente bajas (0.3-0.6 Gy) de radiación alfa debida al radón y sus descendientes, sobre el crecimiento celular y su capacidad para formar colonias in vitro en las células CD34+.

En la primera de las dos experiencias, la población inicial de células se dividió en dos partes. Una se irradió durante 24 horas, siendo la dosis total absorbida de 0.3 Gy. En la otra, el tiempo de exposición fue de 48 horas, y la dosis total recibida de 0.6 Gy. Las células en el medio con radón mantuvieron su población inicial tanto a las 24 como a las 48 h. Por el contrario, en el cultivo de control disminuyó el porcentaje de células presentes desde el 100 % inicial hasta valores próximos al 60 % (a las 24 h) llegando hasta valores entorno al 30 % (a las 48 h). (Tabla 5.1, Fig. 5.2)

Tiempo irradiación	Control (%)	Irradiado (%)	Desv. estándar
0 h	100	100	2
24 h	62	99*	2
48 h	30	102*	2

Tabla 5.1: Porcentaje de CD34+ presentes tras 24 y 48 h de irradiación

(* significativamente diferentes del control, $p < 0.001$)

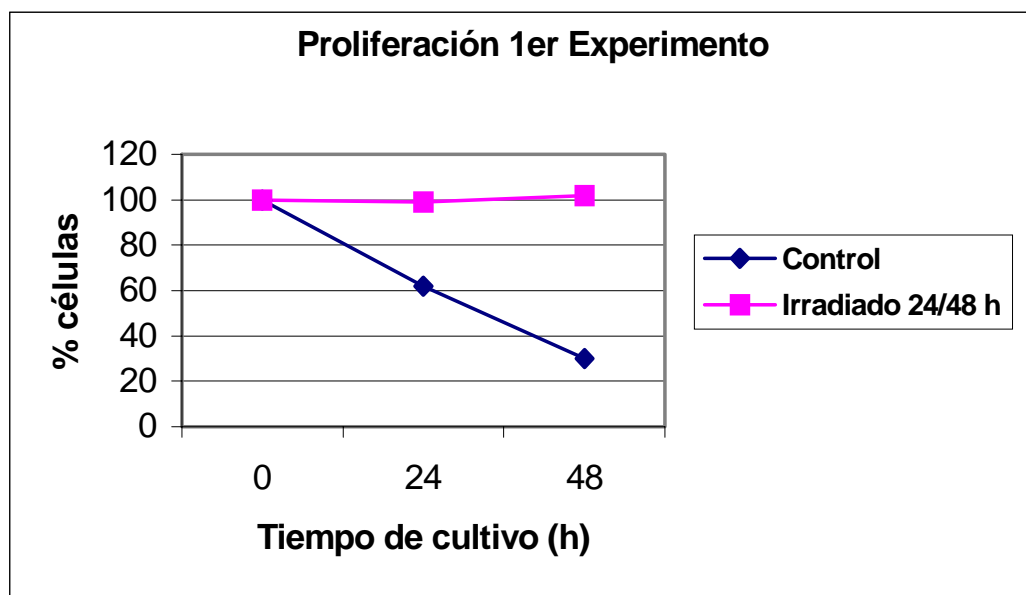


Fig. 5.2: Proliferación celular tras 24 y 48 horas de irradiación

En un segundo experimento las células fueron irradiadas durante 19 h, recibiendo en este periodo una dosis de 0.275 Gy. Después de este tiempo, el cultivo fue centrifugado, se eliminó el medio con radón disuelto y el de control, y se añadió medio y factores de crecimiento nuevos. Posteriormente, se separó el cultivo en dos partes. En una de ellas se esperaron 24 h antes del análisis, y en la otra 77 h. Con respecto al crecimiento, se observa en el control una disminución hasta el 41 % a las 43 h. En el medio irradiado durante 19 h la proliferación se mantuvo en torno al 100 % durante este periodo. En las siguientes 53 h se produjo una recuperación en el control (no irradiado previamente) así como una disminución en el crecimiento del cultivo irradiado, llegando ambos a valores próximos al 70 % al final del experimento. (Fig. 5.3 ,Tabla 5.2)

Tiempo cultivo	Control (%)	Irradiado (%)	Desv. estándar
0 h	100	100	2
24h post irradiación	41	107*	2
77h post irradiación	67	70	2

Tabla 5.2: Porcentaje de CD34+ presentes tras 24 y 77 h de irradiación

(* significativamente diferentes del control, $p < 0.001$)

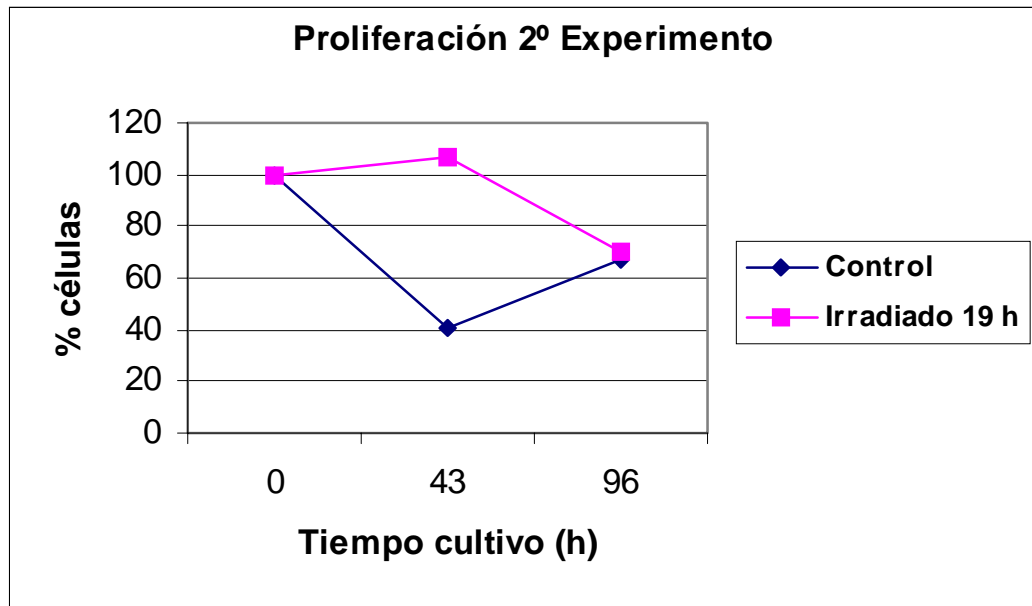


Fig.5.3: Proliferación celular 24 y 77 h después del periodo de irradiación

Formación de colonias

Para evaluar la capacidad proliferativa de las células madre y los progenitores comprometidos se utiliza su capacidad para formar colonias de células maduras in vitro (por eso son también denominadas “unidades formadoras de colonias, o CFU-X, donde X es el linaje de diferenciación para el cual están comprometidas).

En la Fig 5.4 se muestran los resultados obtenidos de la formación de colonias, llevada a cabo en el primer experimento. Los valores en ordenadas representan el número de unidades formadoras de colonias (CFU) por cada 1000 células. Tanto en las células irradiadas 24 h, como en las irradiadas 48 h se observan diferencias significativas con los controles. En los cultivos irradiados se llegan a formar casi 40 unidades, mientras que en los controles no llegan a 5. En el cultivo irradiado 48 h la diferencia es aún mayor llegando a 50, habiéndose formado en el control solamente 2. (Tabla 5.3)

Tiempo irradiación (h)	CFU's/1000 cel (control)	CFU's/1000 cel (irradiado)
0	34	0
24	5	39*
48	2	48*

Tabla 5.3.- Valores de actividad proliferativa tras el cultivo en medio semisólido. (* significativamente diferente del control, $p < 0.05$)

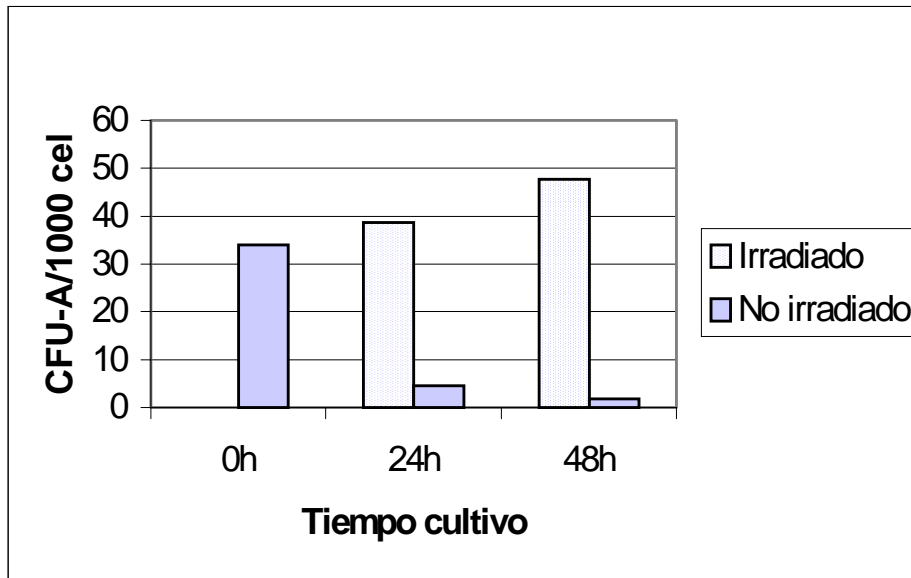


Fig. 5.4: Resultados en la experiencia de formación de colonias

3.- Apoptosis y muerte celular total

Los niveles de apoptosis fueron medidos por citometría de flujo usando Anexina V, y la muerte celular total se midió con la misma técnica utilizando como fluorocromo el Ioduro de Propidio.

En el primer experimento, las medidas de apoptosis con Anexina V dieron resultados concordantes con los valores de proliferación. En el cultivo de control el nivel de apoptosis pasó del 38 % inicial al 44% tras 24 h, alcanzando el 56% después de 48 h. (Tabla 5.4). Sin embargo, en el cultivo irradiado, partiendo del mismo porcentaje inicial de apoptosis, éste se redujo hasta un 13 % a las 24 h, manteniéndose cercano a este valor a las 48 h. (Fig. 5.5)

Los valores de apoptosis en el segundo experimento también resultaron coherentes con las variaciones en la población encontradas. En el cultivo no irradiado el nivel de apoptosis aumentó desde el 15 hasta el 30 % en las primeras 19 h. Esta tendencia se mantuvo al cambiar el medio de cultivo, alcanzándose un valor del 50%, 24 horas después (Tabla 5.5). Sin embargo, tras las 53 horas siguientes, la población celular se recuperó, reduciéndose el nivel de apoptosis hasta el 7 %. (Fig. 5.6)

En el cultivo irradiado durante 19 h, el nivel de apoptosis se redujo desde el 15% inicial hasta un 10%, 24 horas después del periodo de irradiación, manteniéndose este valor hasta igualarse con el obtenido en el control en las 53 h siguientes.

Con respecto a la muerte celular total se apreciaron diferencias crecientes entre los cultivos irradiados y los de control en ambos experimentos. En el primero de ellos se observó un incremento desde el 9 % inicial hasta el 44 % tras 24 h y el 56 % tras 48 h en el cultivo control (Tabla 5.4). Por el contrario, en el cultivo irradiado el valor inicial aumentó ligeramente hasta un 13 % a las 24 h, reduciéndose tras 48 h hasta el 8 %. En este experimento la concordancia entre los valores de crecimiento, muerte y apoptosis mostraron a este último mecanismo como principal responsable de las variaciones poblacionales anteriormente observadas. (Fig. 5.7)

En el segundo experimento, los valores medios de muerte celular total resultaron ser más difíciles de interpretar atendiendo a las medidas de proliferación y apoptosis (Tabla 5.5). En el cultivo de control los niveles de apoptosis aumentaron hasta el 76 % 24 h después de la irradiación, alcanzando un 87% 53 horas después. Sin embargo, en el cultivo irradiado, tras el 25 % encontrado 24 h después de la irradiación, el porcentaje de células muertas cayó hasta un 8% en las 53 horas siguientes.

Tras las primeras 19 h (periodo de irradiación), en el control, el valor de muerte celular total (entorno al 40%) comparado con alrededor del 35 % de apoptosis y un 65 % de supervivencia indicó una preponderancia de la apoptosis como mecanismo de reducción de la población. En el cultivo irradiado, esta concordancia fue similar, teniendo en cuenta la comparación ente estos parámetros. (Fig. 5.8).

Tras este periodo, transcurridas 24h, esta comparación indicó que entorno al 30 % de las células murieron por necrosis en el cultivo de control, mientras que el 10 % murió de esta forma en el cultivo previamente irradiado.

Por fin, los valores de muerte celular en la última etapa (53 horas después de la irradiación) no resultaron coherentes con los valores de supervivencia y apoptosis en ningún caso. Probablemente, esto fue debido a la aparición de otros tipos celulares procedentes de la diferenciación de las CD34+ contabilizados en el recuento final.

EXPERIMENTO I	Control (%)	Irradiado (%)	Desv. estándar
Apoptosis			
0 h	38	38	2
24 h	44	13*	2
48 h	56	7*	2
Muerte Total			
0 h	9	9	2
24 h	44	13*	2
48 h	56	8*	2

Tabla 5.4: Niveles de apoptosis y muerte celular total tras 24/48 h de irradiación.

(* significativamente diferente del control, $p < 0.001$)

EXPERIMENTO II	Control (%)	Irradiado (%)	Desv. estándar
Apoptosis			
0 h	15	15	2
24h post irradiación	50	10*	2
77h post irradiación	7	8	2
Muerte Total			
0 h	2	2	2
24h post irradiación	76	25*	2
77h post irradiación	87	8*	2

Tabla 5.5: Niveles de apoptosis y muerte celular total tras 24/77 h después de la irradiación.

(* significativamente diferente del control, $p < 0.001$)

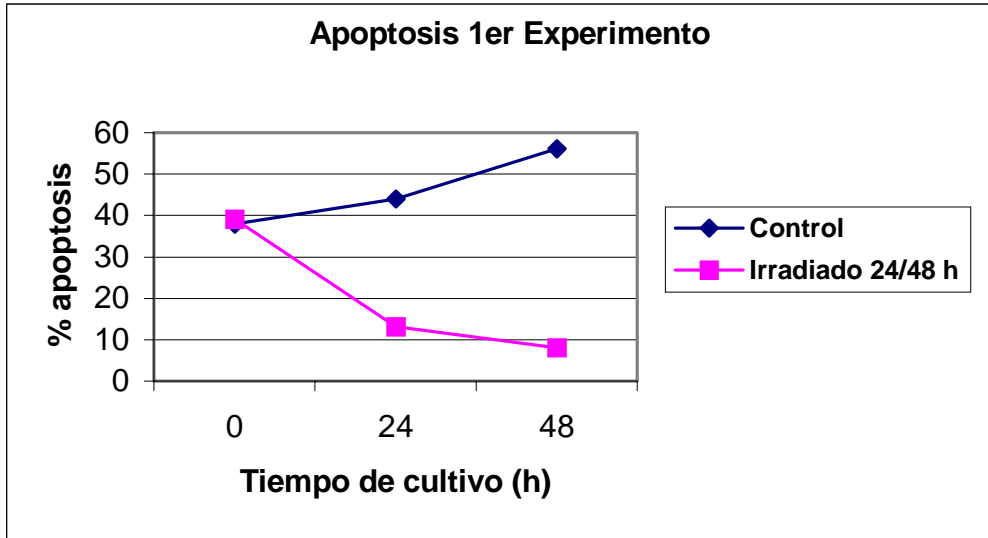


Fig. 5.5: Porcentaje de células apoptóticas tras 24/48 h de irradiación

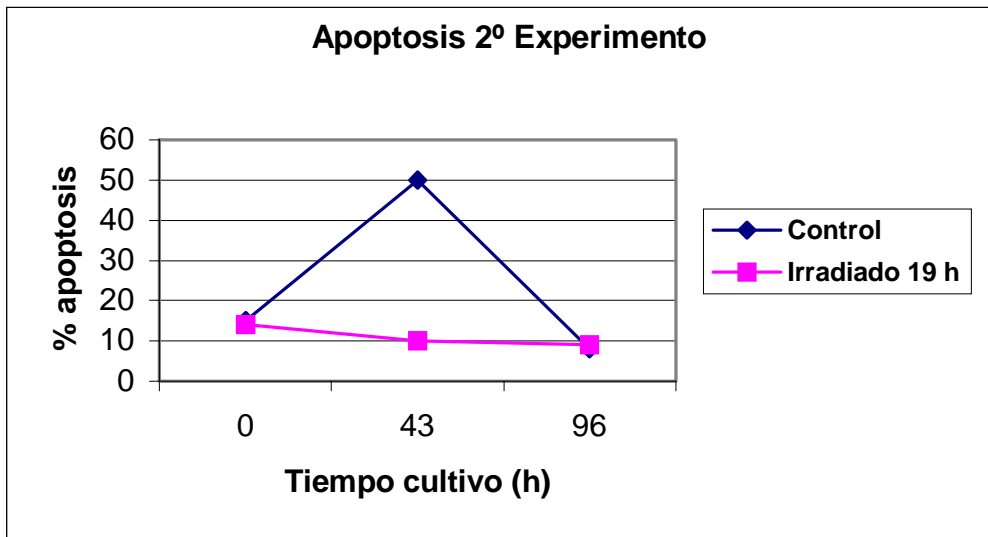


Fig. 5.6: Porcentaje de células apoptóticas tras periodos de cultivo de 24/77 h tras la irradiación

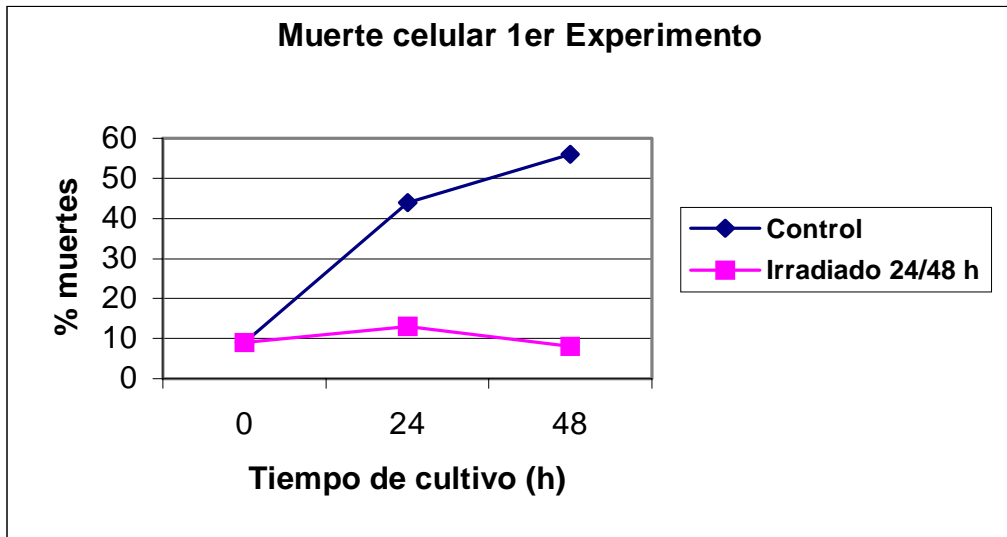


Fig. 5.7: Muerte celular total tras 24/48 h de irradiación

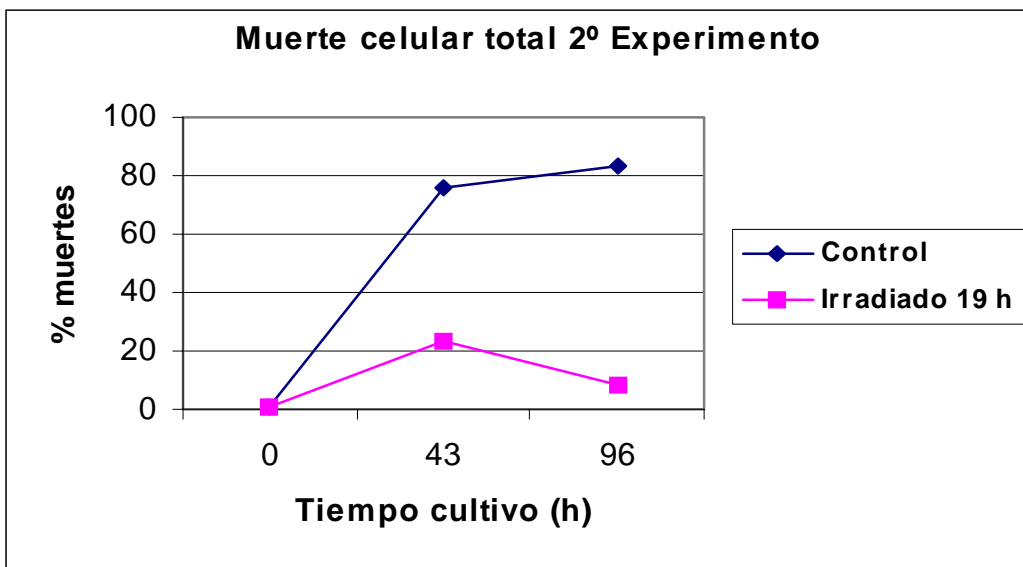


Fig. 5.8: Muerte celular total tras 24/77 h de cultivo después de la irradiación

4.- Discusión

Los experimentos descritos, realizados en células hematopoyéticas CD34+ muestran diferencias significativas entre los grupos irradiados y los de control. Estas diferencias en todos los casos, son máximas en torno a las 48 h de cultivo. Teniendo en cuenta que se reducen en los experimentos de mayor duración, parece que el efecto inducido por la radiación es temporal.

En cuanto a la experiencia de formación de colonias también se observan notables diferencias entre las células irradiadas y las no irradiadas. Algunos estudios han puesto de manifiesto la gran sensibilidad de las CFU a la radiación [HEN83] y los resultados muestran un estímulo en la formación de colonias por la radiación que es máximo en las células irradiadas 48 h.

De nuevo en estos experimentos se observaron diferencias significativas entre los cultivos irradiados y los de control. Dichas diferencias son máximas en torno a las 48 horas de cultivo. Los altos niveles de apoptosis encontrados en los cultivos control, indican que probablemente el principal efecto de la radiación es reducir este mecanismo de muerte celular

Los resultados sobre la muerte celular total son más difíciles de explicar. De la comparación entre las curvas y los niveles de apoptosis puede deducirse que un porcentaje muy bajo de células mueren por necrosis en el primer experimento. En el segundo, este porcentaje aumenta a las 48 h y se hace máximo a las 96 h mostrando la preponderancia de este mecanismo sobre la apoptosis.

El efecto observado puede resumirse en un aumento general de la supervivencia en los cultivos en la primera etapa de los mismos (hasta 48 h). Fundamentalmente en esta etapa, el mayor estrés al que se ven sometidas las células ha sido la descongelación sufrida inicialmente, que provoca en los cultivos control una significativa presencia de

apoptosis principalmente, y también necrosis que dan lugar a reducciones grandes de la población.

Resulta necesario considerar algunos aspectos de las CD34+ y su cultivo para entender las respuestas a la radiación encontradas. Durante el cultivo las células parten de un estado pluripotente indiferenciado (stem) perdiendo progresivamente esta cualidad. Esto hace que su sensibilidad a la radiación también se modifique siendo mayor al principio. Esto puede explicar la desaparición del efecto al cabo de un periodo relativamente largo como se observa en el segundo grupo de experiencias.

Los mecanismos por los que la radiación atenúa sensiblemente esta respuesta pueden ser variados. La disminución de apoptosis parece estar vinculada a la expresión de genes de la familia bcl-2, modificable por la radiación [SOT97]. El cambio en el balance de la expresión de genes inhibidores/inductores de apoptosis de esta familia puede explicar en parte las respuestas obtenidas.

También resulta conocida la detención del ciclo celular antes de la mitosis en respuesta a la radiación. Al impedir que las células entren en mitosis se evita el desencadenamiento de apoptosis a consecuencia de los daños producidos por la descongelación. No ocurre así con la necrosis por la que mueren células que han sufrido daños más severos como puede observarse en las curvas de muerte total. Si el daño previo resulta reparable, esta detención del ciclo inducida por la radiación favorece la síntesis y actuación de enzimas reparadoras. En este sentido, las tasas de dosis empleadas son lo suficientemente bajas como para permitir la actuación eficiente de dichos mecanismos.

Estos mecanismos mencionados son genéricos para cualquier tipo de radiación ionizante. Cuando se analizan efectos debidos a radiación de alta LET, resulta necesario hacer algunas consideraciones particulares. Por su corto alcance, la gran mayoría de partículas alfa emitidas se frenarán en el medio intercelular, siendo el porcentaje de células directamente afectadas muy bajo. De nuevo, los bajos porcentajes de interacciones directas estimados en la simulación Montecarlo junto con la observación de efectos en todo el cultivo indican la existencia de lesiones diferentes al daño directo sobre el DNA, es decir, de dianas extranucleares [DES96, LIT00]. Este efecto bystander

explicado anteriormente puede ser la clave para interpretar estos resultados. La acción mediada por los radicales libres puede resultar menos traumática que las acciones directas sobre el ADN, dando posibilidad a los mecanismos de reparación enzimática de actuar con mayor eficacia.

Por fin, en este caso tampoco cabe considerar el mecanismo de transmisión del efecto a través de las uniones tipo “GAP” o conexiones intercelulares, ya que las células se encuentran en suspensión alejadas unas de otras.