

Tesi Doctoral

Facultat de Medicina



**EFFECTES ANTIINFLAMATORIS DE LA RADIOTERÀPIA A
DOSIS BAIXES EN UN MODEL EXPERIMENTAL
D'INFLAMACIÓ SISTÈMICA**

**Tesi presentada per Meritxell Arenas i Prat per optar al grau de
Doctor en Medicina**

Directors: Julián Panés Díaz i Albert Biete Solà

Barcelona, 2008

AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI

Julián Panés Díaz....., codirector de la tesi doctoral de Meritxell Arenas i Prat.....que porta com a títol *Efectes antiinflamatoris de la radioteràpia a dosis baixes en un model experimental d'inflamació sistèmica*.....autoritza la seva presentació i defensa davant el Tribunal que se li ha assignat.

Signatura,

Barcelona, 18 de desembre de 2008

AUTORITZACIÓ DEL DIRECTOR DE TESI

Albert Biete Solà....., codirector de la tesi doctoral de Meritxell Arenas i Prat.....que porta com a títol *Efectes antiinflamatoris de la radioteràpia a dosis baixes en un model experimental d'inflamació sistèmica*.....autoritza la seva presentació i defensa davant el Tribunal que se li ha assignat.

Signatura,

Barcelona, 18 de desembre de 2008

DEDICAT A:

Al Josep M i als meus fills Meritxell i Ferran

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Vull agrair de manera molt sincera a totes les persones que han fet possible que la meva tesi fos una realitat.

A en **Dr. Julià Panés**, codirector de la meva tesi, per tot el temps i esforç que m'ha dedicat. Perquè és la combinació que sempre he cregut ideal en un metge: un excel·lent i reconegut científic que sap contagiar la seva energia als del seu voltant i un excel·lent metge que sap tractar amb cura els seus pacients. Des del primer dia va manifestar-me la seva confiança i ha valorat tot l'esforç personal que aquest treball ha comportat, animant-me, en tot moment, a mantenir la il·lusió en el projecte i fent-me saber que aquesta tesi tiraria endavant. Gràcies de debò.

A en **Dr. Albert Biete**, codirector de la meva tesi, per tot el que he après amb ell durant la meva formació com especialista en el seu servei, per ser un excel·lent docent i tenir un gran rigor professional clínic i científic. Sempre ha confiat en mi i m'ha sabut guiar quan ho he necessitat, oferint-me tot el seu suport i ajuda. Gràcies per haver entès el que em passava i haver-me estès la mà. Ho recordaré sempre.

A en **Fèlix Gil**, per la seva immensa paciència, per tot el que m'ha ajudat en la part metodològica de la tesi, pel seu optimisme constant, per tots els cafès que hem pres junts. Ha estat un plaer haver treballat plegats.

A la Dra. Meritxell Gironella, per ser tan positiva i per la seva constant predisposició.

A tota la resta de companys del laboratori per la seva col·laboració i fàcil accessibilitat, a en Jeroni, la Míriam, la Sandra Angulo, la Dra. Sandra Jorcano, la Dra. Meritxell Mollà, i molt especialment a tots els que em van ajudar en l'última embranzida. Gràcies.

Als Drs. Sebastià Sabater i Víctor Hernández, per totes les seves aportacions, idees i suggeriments i, com no, per la nostra amistat.

A Sagrament Torné, per la dedicació en la correcció pulcre de tota la tesi. Gràcies per dir-me que ho faries encantada.

A tot el Servei d'Oncologia Radioteràpica de l'Hospital Clínic, pel seu suport i per les constants empentes d'optimisme que m'han donat.

A tots els meus companys de l'Àrea d'Oncologia de l'Hospital Sant Joan de Reus on durant aquests 8 anys he crescut a nivell professional; a tots els que m'heu demostrat que sou amics de debò, als presents i als antics companys, per tot el que hem compartit junts.

A tots els meus pacients que estimo i que m'estimen, amb qui mai no deixo d'aprendre coses i fan que mai em peneixi de l'especialitat en què m'he format. Ells fan que el dia a dia sigui gratificant i el visqui amb il·lusió, ple de reptes i amb ganes de superar-me.

A tota la meva extensa família i amics.

Als meus sis germans i catorze nebots, als meus tiets de Lleida. Als meus sogres, per tot el que m'han ajudat.

Als meus parens Joan M i Maria, per haver-me ensenyat els valors del treball, la constància i l'esforç que desitjo saber transmetre als meus fills d'igual manera.

I finalment moltíssimes gràcies a tu Josep M. perquè sempre m'has recolzat, m'has transmès il·lusió i m'has demostrat que et sents orgullós de mi. Per tot el que hem viscut, per tot el camí que ens queda per recórrer i per tot el que d'ara en endavant viurem plegats.

I als meus fills Meritxell i Ferran, per l'alegria que saben transmetre, per les estones que hem compartit jugant i treballant plegats, perquè són la il·lusió del passat, present i futur.

ÍNDEX

1. Abreviatures utilitzades.....	10
2. Articles inclosos	11
3. Justificació i objectius de la tesi	12-17
3.1. Justificació general	
3.2. Estudi 1	
3.3. Estudi 2	
4. Antecedents i estat actual.....	18-71
4.1. Paper de la radioteràpia en malalties benignes	
4.1.1. Introducció	
4.1.2. Indicacions acceptades	
4.1.3. Consideracions radiobiològiques	
4.1.4. Recomanacions	
4.2. Efectes de la radioteràpia sobre la integritat de la cèl·lula	
4.3. Limitacions de l'aplicabilitat de la radioteràpia en malalties benignes: Efectes tardans en teixits sans i carcinogènesi. Estudis epidemiològics	
4.4. Mecanismes de la resposta inflamatòria	
4.5. Mecanismes de l'acció antiinflamatòria de la radioteràpia a dosis baixes	
4.5.1. Estudis <i>in vitro</i>	
4.5.2. Estudis <i>in vivo</i>	
5. Metodologia experimental.....	72-84
6. Articles originals	85-103
7. Comunicacions a congressos i premis.....	104-106
8. Discussió	107-114
9. Conclusions	115-116
10. Bibliografia	117-129

1. ABREVIATURES UTILITZADES

RT	radioteràpia
RT - DB	radioteràpia a dosis baixes
LPS	lipopolisacàrid
IL	interleucina
TGF- β_1	factor de creixement transformant β_1
NO	òxid nítric
iNOS	inducció enzim NO-sintetasa
RIO	reactius intermediaris de l'oxigen
CAM	molècula d'adhesió cel·lular
ICAM-1	molècula d'adhesió intercel·lular 1
VCAM-1	molècula d'adhesió cel·lular vascular 1
MAdCAM-1	molècula d'adhesió cel·lular mucosa adressina 1
TNF- α	factor de necrosi tumoral α
IFN- γ	interferó γ
NF-kB	factor nuclear-Kappa B
MII	malaltia inflamatòria intestinal
HO-1	hemoxigenasa 1

2. ARTICLES INCLOSOS

El treball discutit en la present tesi es basa en les següents publicacions:

- **Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice.**

Meritxell Arenas, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Víctor Hernández, Sandra Jorcano, Albert Biete, Josep M. Piqué, Julián Panés.

Int J Rad Oncol Biol Phys, 66(2): 560-7, 2006

- **Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: correlation with TGF- β_1 expression.**

Meritxell Arenas, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Víctor Hernández, Albert Biete, Josep M. Piqué, Julián Panés.

Rad Oncol, 86(3): 399-406, 2008

3. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS DE LA TESI

Justificació general

La radioteràpia (RT) administrada a dosis altes induïx la producció de citocines proinflamatòries en cèl·lules immunes i en cèl·lules endotelials. Paradoxalment, la radioteràpia a dosis baixes (RT-DB) actua sobre cèl·lules que participen en la resposta inflamatòria, produint un efecte antiinflamatori ^{1,2}.

En estudis clínics en pacients amb malalties cròniques inflamatòries s'ha vist un efecte beneficiós de la RT-DB. Estudis *in vitro* suggereixen que hi ha una disminució de l'adhesió dels leucòcits a les cèl·lules endotelials. Actualment, però, es disposa de poca informació sobre els mecanismes pels que la RT-DB pot modular les diferents fases de les interaccions leucòcit-endoteli, i el possible efecte de la RT-DB sobre la resposta inflamatòria *in vivo*.

Tenint en compte el potencial efecte antiinflamatori de la RT-DB, s'ha dissenyat un estudi *in vivo* amb ratolins, en el qual s'ha avaluat els possibles mecanismes implicats en els efectes antiinflamatoris de les dosis baixes d'irradiació en un model d'inflamació sistèmica mitjançant l'administració d'un lipopolisacàrid (LPS). Després d'un primer estudi per caracteritzar la dosi-resposta, s'ha iniciat un segon estudi per veure el temps-resposta en el que es manté aquest efecte antiinflamatori i optimitzar així el disseny de tractament en estudis clínics.

Estudi 1:

Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice.

Meritxell Arenas, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Víctor Hernández, Sandra Jorcano, Albert Biete, Josep M. Piqué, Julián Panés.

Int J Rad Oncol Biol Phys, 66(2): 560-7, 2006.

La RT-DB és efectiva en el tractament de diferents malalties degeneratives òssies i inflamatòries com l'artrosi, l'epicondilitis i la bursitis ^{1, 2}. Malgrat la seva eficàcia clínica, existeix poca informació sobre la dosi òptima i el fraccionament de RT; no disposem d'estudis dosis-resposta en humans, i existeixen dos estudis experimentals en artritis en rates on s'objectiva una eficàcia igual o superior amb dosi de 0,5 Gy respecte 1 Gy ^{3, 4}, però no s'han avaluat dosis més baixes. D'altra banda, també existeix poca informació sobre els mecanismes radiobiològics implicats en l'acció terapèutica de la RT-DB en les diferents malalties benignes en què s'ha usat; disposem d'estudis *in vitro* on s'ha vist que la RT-DB produeix una disminució de l'adhesió de polimorfonuclears a la cèl·lula endotelial, un augment de l'expressió de citocines antiinflamatòries com la interleucina-10 (IL-10) o el factor de creixement transformant β_1 (transforming growth factor [TGF- β_1]), un augment de l'apoptosi, un augment de l' E-selectina i/o L-selectina i una disminució de l'òxid nítric (NO).

Tenint en compte la poca informació de què es disposa, ens hem plantejat iniciar un estudi per avaluar l'eficàcia de la RT-DB en un model experimental d'inflamació aguda amb LPS en ratolins, en els que s'ha irradiat la regió abdominal amb dosi única de 0,1 Gy, 0,3 Gy, 0,6 Gy, i s'han estudiat les interaccions leucòcit-endoteli. Posteriorment, s'ha determinat l'expressió de la molècula d'adhesió intercel·lular 1 (ICAM-1) i la producció de TGF- β_1 .

Els objectius del primer estudi són:

1. Investigar *in vivo* els efectes de diferents dosis baixes d'irradiació abdominal.
2. Trobar la dosi de RT efectiva més baixa en aquest model.
3. Determinar el paper de l'expressió de la molècula d'adhesió ICAM-1, i/o la producció de citocines antiinflamatòries com el TGF- β_1 en la modulació de la resposta inflamatòria aguda.

Estudi 2

Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: correlation with TGF- β_1 expression.

Meritxell Arenas, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Víctor Hernández, Albert Biete, Josep M. Piqué, Julián Panés.

Rad Oncol, 86(3): 399-406, 2008.

La RT-DB té un potent efecte antiinflamatori a través de la modulació de les interaccions leucòcit-endoteli, sent el TGF- β_1 un potencial mediador d'aquest efecte.

Les dosis i el fraccionament de RT usades en la pràctica clínica pel tractament de malalties cròniques degeneratives òssies i articulars, són de l'ordre de 5-6 sessions x 0,5-1 Gy, 2 o 3 vegades per setmana ⁵. Existeixen estudis *in vitro* on s'objectiva que la disminució de l'adhesió de leucòcits a cèl·lules endotelials perdura fins 48 h després de la RT ⁶⁻⁸. Els efectes antiinflamatoris de la RT-DB en la disminució de lesions inflamatòries han estat evidenciats en estudis experimentals *in vivo* on es demostra una millora en la histologia de l'artritis després de 30 dies d'haver finalitzat la RT, administrada durant 5 dies consecutius ⁴. D'altra banda, però, els efectes de la RT-DB sobre les interaccions leucòcit-endoteli en el temps no han estat caracteritzats, i aquesta informació és crucial per dissenyar l'esquema de tractament de RT més eficaç.

En el primer estudi on s'ha demostrat l'eficàcia de la RT-DB (0,1 Gy, 0,3 Gy, 0,6 Gy) en un model experimental d'inflamació aguda amb LPS en ratolins, també s'ha vist que la RT-DB causa una disminució de l'adhesió de leucòcits i que la dosi amb màxim efecte inhibitori és de 0,3 Gy; la immunoneutralització del TGF- β_1 mostra que aquesta citocina juga un paper clau en la inhibició de les interaccions leucòcit-endoteli després de la RT-DB.

En aquest segon estudi ens hem plantejat caracteritzar l'efecte de la RT-DB en el temps, i investigar la relació amb els nivells del TGF- β_1 i la inhibició de la resposta inflamatòria en diferents temps després de la RT-DB en el mateix model experimental.

Els objectius del segon estudi són:

1. Caracteritzar els efectes antiinflamatoris de la RT-DB en el temps.
2. Investigar la correlació que existeix amb els nivells del TGF- β_1 en diferents temps després de la RT-DB i la inhibició del reclutament de leucòcits en resposta a un estímul inflamatori.

4. ANTECEDENTS I ESTAT ACTUAL

4.1. PAPER DE LA RT EN MALALTIES BENIGNES

4.1.1. Introducció

La RT constitueix un dels pilars fonamentals en el tractament del càncer, juntament amb la cirurgia, quimioteràpia i hormonoteràpia.

Aproximadament, un 60% dels pacients amb càncer necessitaran d'aquest tractament en el curs de la seva malaltia, ja sigui amb intenció radical o curativa, pre o postoperatòria, o amb intenció pal·liativa. La dosi total de RT, en aquest context, varia en funció de la intenció, sent habitualment 46-50 Gy quan és amb intenció pre o postoperatòria, 20-30 Gy amb intenció pal·liativa, i fins 76-78 Gy amb intenció radical. La dosi total s'administra en diferents sessions; la relació entre la dosi total i el nombre de sessions es coneix com fraccionament. El fraccionament convencional és de 5 sessions/setmana (fins 5-7 setmanes de tractament) amb dosi per sessió de 1,8-2 Gy, però també existeixen altres modalitats de fraccionament, com són l'hipofraccionament on la dosi per sessió és més alta (4-5 Gy), o l'hiperfraccionament on la dosi per sessió és menor, amb dues o més sessions per dia.

Existeix un altre camp d'acció de la RT, desconegut en amplis sectors mèdics i que fins i tot no s'anomena en diferents textos de medicina, que és l'ús en el tractament de malalties benignes. El terme de malaltia benigne engloba una sèrie de malalties que no són neoplàsies malignes, però que poden tenir efectes negatius sobre la qualitat de vida.

Històricament, la RT s'ha usat en nombroses malalties benignes, com són la hiperplàsia tímica, d'amígdales, d'adenoides, l'acné, l'èczema, la tinea capitis, la mastitis postpart, i l'hipertiroidisme, entre d'altres. L'any 1970 es va recomanar no emprar-la més en aquestes indicacions per haver-se documentat una elevada incidència de neoplàsies radioinduides, especialment de tiroides en nens ⁹.

Tot i això, per algunes d'aquestes malalties persisteix la seva indicació en l'actualitat, ja que diferents publicacions han demostrat la seva eficàcia en un subgrup de pacients, on els beneficis terapèutics de la RT superen el seus riscos potencials; reservant el seu ús, bàsicament, en aquells casos que no responen a les progressives línies de tractament convencional, o aquelles malalties que, tot i ser benignes, comporten una amenaça per a la vida i no tenen l'opció de ser tractades mèdicament o quirúrgicament. És per això que se segueix utilitzant i han aparegut noves indicacions.

Les dosis totals i fraccionament de dosi recomanades per les diferents indicacions oscil·len des de dosis similars a les administrades en el tractament del càncer fins a dosis inferiors a l'1% d'aquestes dosis amb fraccionament de dosis inferiors a 1 Gy/sessió. Segons la Sociedad Española de Física Mèdica (SEFM) es considera dosis baixes per sota 1 Gy. Aquest grup que es tracta amb dosis baixes inclou, bàsicament, malalties inflamatòries agudes i cròniques i trastorns degeneratius ossis dolorosos.

Existeix un efecte divergent de la RT dosi-depenent, a dosis altes produeix efectes inflamatoris, sent un factor limitant de la dosi a administrar, en canvi a dosis baixes té un efecte antiinflamatori, sent un fenomen encara sense explicar.

Els efectes antiinflamatoris de la RT-DB s'observen ja en els processos inicials de la inflamació caracteritzats per l'aparició de fenòmens de vasodilatació (eritema), augment de la permeabilitat vascular (edema) i infiltració leucocitària, disminuint el dolor, l'eritema i l'edema.

4.1.2. Indicacions acceptades

Existeixen nombroses publicacions que han confirmat la utilitat de l'ús de la RT en algunes malalties benignes. No obstant, la seva utilització no està ben establerta i fins i tot ha estat considerada amb escepticisme en molts països, excepte a Alemanya i altres països de l'Est d'Europa, on històricament l'han usat amb bons resultats ^{1, 2, 10}, recomanant el seu ús com a alternativa en pacients refractaris o amb contraindicacions al tractament convencional. Però, la majoria d'estudis es basen en observacions de tipus retrospectiu. Hi ha pocs estudis prospectius comparant RT versus no tractament o versus tractament estàndard.

La principal causa de la escassa acceptació de la RT pel tractament de malalties benignes ha estat el temor a l'aparició de tumors radioinduits i la manca d'estudis randomitzats.

Els pocs assaigs clínics publicats sobre l'ús de la RT en malalties benignes, s'han realitzat bàsicament en 4 patologies: prevenció de l'ossificació heterotòpica, profilaxi de la reestenosi, malaltia de Graves, i malalties degeneratives òssies o inflamatòries (epicondilitis humeral refractària, fascitis plantar, periartritis escapula-humeral i artrosi de diferents articulacions) ^{1, 2, 10-14}.

En els últims anys ha ressorgit el seu interès, reforçat per dues noves indicacions, la irradiació profilàctica de l'ossificació heterotòpica del maluc després del recanvi protètic, i la prevenció de la reestenosi vascular després d'una angioplàstia coronària o d'artèries perifèriques ^{11, 13}.

L'aparició de reestenosi vascular després de la col·locació d'una endopròtesi és una de les majors limitacions de les tècniques de revascularització; la seva incidència oscil·la entre el 30-60% de tots els procediments utilitzats ^{15, 16}. La fisiopatologia de la reestenosi després d'una angioplàstia inclou fenòmens de proliferació cel·lular. En aquest sentit, la RT inhibeix la proliferació cel·lular, retardant així l'aparició de reestenosi. Atesa la limitada experiència disponible, no existeix un consens definitiu sobre la dosi total a administrar o el punt de prescripció de la dosi. Habitualment es recomana dosi de 12-18 Gy, tant per a procediments coronaris com per al sistema vascular perifèric ¹⁷⁻¹⁹.

Seegenschmiedt *et al*, en un estudi realitzat en els diferents centres de RT alemanys, va constatar que es tractaven per malalties benignes 37.410 pacients anualment en aquell país, d'entre elles la indicació més freqüent era en un 63,5% malalties degeneratives osteoarticulares (periartritis escàpula-humeral, epicondilitis humeral, fascitis plantar-dorsal, artrosi de diferents articulacions), 1,3% malalties inflamatòries (hidrosadenitis axil·lar aguda o crònica, abscess cutani agut o crònic, infecció del llit unguial, parotiditis senil), 3,3% síndromes hiperproliferatives (malaltia de Dupuytren, Ledderhorse, Peyronie, queloides), i un 29,5% altres indicacions menys freqüents incloent: profilaxi de l'ossificació heterotòpica de maluc o altres

articulacions, degeneració macular senil, malformacions arteriovenoses, lesions cerebrals benignes (meningiomes, craneofaringiomes), prevenció de la hiperplàsia mamària o ginecomàstia, hiperhidrosi, hipertricosi, hemangiomes, pterygium, epistaxi senil i psoriasi ²⁰.

És per tot això que l'any 2002, el Grup Alemany de Treball sobre RT malalties benignes va publicar a la revista *Int J Rad Oncol Biol Phys* un consens amb les possibles indicacions de la RT ²¹. D'entre aquestes indicacions, el subgrup 2 és el que es recomana tractar amb dosis baixes:

1. Trastorns inflamatoris aguts i crònics: hidrosadenitis supurativa, furúncols, panadís periungual, altres infeccions que no responen al tractament amb antibiòtics.
2. Trastorns degeneratius dolorosos aguts i crònics: tendinitis i bursitis de diferents articulacions, esperó del calcani, artrosi.
3. Trastorns proliferatius de teixits tous: malaltia de Dupuytren /Ledderhose, malaltia de Peyronie, malaltia de Gorham-Stout, prevenció de la recaiguda postquirúrgica de pterigium o queloides.
4. Trastorns funcionals: oftalmopatia de Graves, malformacions arteriovenoses (MAV), degeneració macular senil, fístules limfàtiques persistents.
5. Trastorns dermatològics: basaliomes, psoriasi resistents al tractament amb PUVA.
6. Altres trastorns: profilaxi de l'ossificació heterotòpica de maluc o d'altres articulacions després de la col·locació de pròtesi, profilaxi de la

reestenosi vascular després de la dilatació i col·locació d'endopròtesi, hemangiomes, mastocitosi, síndrome Kasabach-Merrit.

Per tant, les dosis baixes en RT s'han emprat, bàsicament, en els trastorns degeneratius ossis dolorosos i inflamatoris aguts i crònics, que com s'ha comentat comprenen 2/3 parts dels 37.000 casos de la patologia benigne tractada anualment a Alemanya ²⁰. Dins d'aquest grup s'inclouen l'artrosi de diferents articulacions, l'epicondilitis humeral, la periartritis escàpula-humeral i la fascitis plantar-dorsal i altres ^{1, 2, 5, 14, 20, 22}.

La dosi de RT i els esquemes de fraccionament recomanats actualment són entre 0,3-1 Gy/sessió fins a una dosi total de 3- 5 Gy per patologia aguda (4-5 sessions/setmana), i fins a una dosi total de 6- 12 Gy per patologia crònica (2-3 sessions/setmana) ².

RT DELS TRASTORNS INFLAMATORIS/DEGENERATIUS OSTEOARTICULARS

- ARTROSI

És la degeneració del cartílag articular per envelliment i pèrdua dels condrocits, comportant un empitjorament de les propietats mecàniques de l'articulació i dolor.

En un estudi on s'analitzen els resultats de la RT-DB (0,35-1 Gy/sessió, 3-6 Gy dosi total) de 151 genolls afectes de gonoartrosi dolorosa, el 60% dels pacients van experimentar millora del dolor en acabar el tractament, i el 70% als tres mesos del tractament; una tercera part dels pacients va

augmentar la mobilitat del genoll i un 44% dels pacients mantenia el benefici a l'any de finalitzar la RT ²³.

Altres estudis han reportat entre un 50 i un 90% de millora del dolor depenent de l'articulació on es localitza i de la duració prèvia dels símptomes, amb respostes completes d'entre el 12 i el 25% ^{24, 25}.

- PERIARTRITIS

És un trastorn degeneratiu dels teixits tous periarticulars. L'eficàcia de la irradiació amb dosis baixes en la millora del dolor sembla estar relacionada amb els efectes de la RT-DB sobre el metabolisme del NO, com es comentarà més endavant. Els dos quadres característics són l'epicondilitis humeral (EH) lateral ("colze del tenista") o medial ("colze del golfista") i la periartrosis escàpula-humeral (PEH) o espatlla dolorosa. El quadre clínic comprèn signes flogòtics als teixits tous periarticulars, disminució de la mobilitat i dolor persistent.

S'ha reportat una millora completa del dolor en el 54% dels casos d'EH i 49% de PEH amb dosi total de 1,5-12 Gy (0,3-2 Gy/sessió, 2-3 sessions/setmana). La latència de la resposta pot ser perllongada i a vegades no s'obté resposta fins a 3-6 mesos d'haver acabat el tractament ¹⁴.

En altres estudis s'han reportat respostes completes a llarg termini d'entre el 47-100% en EH ^{26, 27}.

▪ ESPERÓ DEL CALCANI

La presència d'una exòstosi òssia a nivell de la inserció de la fàscia plantar i de la musculatura del taló afecta al 8-10% de la població, habitualment per sobre dels 40 anys. Es caracteritza per dolor al recolzament plantar que dificulta la deambulació. En la seva etiopatogènia s'han implicat microtraumatismes de repetició en la inserció de l'aponeurosi plantar com a conseqüència de l'exercici físic, obesitat o deformitats del peu. El dolor ocasiona una pèrdua d'elasticitat del cartílag d'inserció i una subsegüent invasió per cèl·lules mesenquimals, afavorint l'aparició d'un teixit cicatricial que lentament s'ossifica ocasionant l'esperó.

La RT es considera un tractament eficaç per millorar el dolor. La dosi total que es recomana és de 5 Gy amb fraccionament 0,5 Gy/sessió en 3 sessions/setmana, podent, ocasionalment, repetir el tractament en 4-6 setmanes; s'obtenen millores del dolor (parcial o complet) en el 84-89% dels pacients, sent un factor de mal pronòstic la durada de la simptomatologia per sobre de 6 mesos ^{10, 28, 29}.

4.1.3. Consideracions radiobiològiques

S'han descrit diferents mecanismes radiobiològics implicats en l'acció terapèutica de la RT en les diferents malalties benignes que s'ha emprat i que inclouen ^{30, 31}:

- Efecte antiproliferatiu: inhibint la proliferació de fibroblasts i d'altres cèl·lules no fibroblàstiques, aquest efecte és el que es busca en la

prevenció de l'ossificació heterotòpica o de la reestenosi, en els queloides i en la malaltia de Dupuytren. Els efectes que es produeixen a nivell cel·lular quan s'administra la RT són, en un primer moment, un retard en el cicle mitòtic que impedeix la proliferació cel·lular en el teixit irradiat durant un període de temps dosi-depenent. Les dosis recomanades són de 10 Gy o dosis superiors.

- Efecte immunomodulador: supressió del procés autoimmune local, per exemple en l'oftalmopatia de Graves i també per evitar el rebuig en òrgans trasplantats. Els efectes immunosupressors després d'una irradiació corporal total s'han caracteritzat en diferents estudis i inclouen una disminució dels limfòcits circulants que persisteix fins anys després. S'ha usat per prevenir el rebuig d'òrgans sòlids trasplantats, també en trasplantaments de moll d'os i en malalties autoimmunes, com la nefritis del lupus o l'esclerosi múltiple. Les dosis recomanades no estan ben establertes, però s'administren generalment dosis per sobre els 10 Gy.
- Efecte antiinflamatori: que comportarà un efecte analgèsic eficaç pel tractament de la sinovitis, l'artrosi, la periartritis i les malalties degeneratives, les quals s'acompanyen d'inflamació de la membrana sinovial, infiltració limfocitària, hiperplàsia leucocitària, i hipercel·lularitat. Les dosis recomanades oscil·len entre 2 i 6 Gy amb fraccionament de 0,5 Gy/sessió. Altres mecanismes pels que la RT-DB pot modular la resposta inflamatòria es comentaran en l'apartat 4.5 (pàgina 59).

Molt probablement, no existeixi només un únic mecanisme per si sol capaç d'explicar l'efecte de la RT en malalties benignes, sinó que sigui la combinació de diferents mecanismes el que justifiqui la seva utilitat.

4.1.4. Recomanacions

Tenint en compte totes les consideracions anteriors s'han fet unes recomanacions per a l'ús de la RT en malalties benignes ¹ que s'indiquen a continuació:

- Determinar les possibles conseqüències de no fer tractament i la història natural de la malaltia.
- Ús apropiat de fonts d'informació per referenciar possibles alternatives de tractament i determinar la relació individual risc/benefici de la RT i altres teràpies.
- Considerar la RT si altres tractaments convencionals no han estat exitosos. Si els riscos d'altres tractaments excedeixen els riscos de la RT i les conseqüències de no fer tractament són inacceptables, s'ha de considerar la RT.
- Determinar els riscos a llarg termini considerant la qualitat de la RT, la dosi total, el fraccionament, els òrgans de risc, les malalties que poden agreujar els efectes secundaris de la RT i l'edat del pacient.
- Si s'elegeix la RT, cal un consentiment informat on s'inclouï una explicació de la malaltia i la necessitat de RT, considerant a la vegada altres opcions de tractament i el benefici esperat de la RT i possibles riscos.

- Cal un full informatiu sobre els detalls de la RT incloent el volum a tractar, la dosi a administrar, la durada de cada sessió de tractament, el temps total de tractament i els riscos rellevants, efectes secundaris i/o possibles reaccions a causa del tractament.
- Seleccionar sempre, en la mesura del possible, el camp de tractament més petit i la dosi efectiva més baixa.
- Usar múltiples camps de tractament i incidències del feix, amb proteccions adequades.
- Planificar el tractament amb els mateixos criteris de qualitat i definició de volums usats en la RT externa del càncer (ICRU-50, ICRU-62).
- Cal un adequat seguiment per avaluar el resultat d'aquest tractament i efectes secundaris aguts i tardans.
- Es recomana una segona opinió abans d'iniciar el tractament si el pacient dubta de la decisió.

Altres recomanacions a tenir en compte inclourien evitar irradiar infants i nens, valorant molt bé els potencials riscos i els beneficis esperats. També és important evitar irradiar òrgans especialment radiosensibles com la tiroide, els ulls, les gònades, el moll d'os i la mama.

4.2. EFECTES DE LA RT SOBRE LA INTEGRITAT DE LA CÈL·LULA

Els mecanismes i efectes de la RT a dosis altes a nivell cel·lular són ben coneguts, però no els efectes a dosis baixes.

EFECTES GENERALS DE LA RT

Quan la radiació interacciona amb una cèl·lula, es produeixen ionitzacions i excitacions en les macromolècules, com són l'ADN, ARN, enzims i proteïnes, entre d'altres. L'acció de la RT pot ser directa, sobre les macromolècules, o indirecta, sobre el medi. La molècula més important de la cèl·lula és l'ADN, i les principals lesions produïdes per l'acció directa en el genoma poden ser la pèrdua o canvi de bases, la ruptura simple i les ruptures dobles. L'acció indirecta es produeix sobre el medi, atès que el principal component del medi és l'aigua es produeixen radicals lliures per la radiolisi de l'aigua.

Existeixen mecanismes de detecció i reparació dels danys molt eficaços, fet pel qual la majoria de modificacions que sofreix el genoma són corregides i no tenen conseqüències per a la cèl·lula. Però en determinades situacions no s'aconsegueix reparar el dany a l'ADN, cosa que comporta efectes cel·lulars com aberracions cromosòmiques, necrosi, apoptosi o iniciació de càncer.

CONCEPTE DE RADIOSENSIBILITAT. EFECTES A DOSIS BAIXES

La radiosensibilitat fa referència a la major o menor afectació cel·lular dels diferents teixits presents a l'organisme en ser irradiats. Aquesta radiosensibilitat depèn del tipus cel·lular i està molt relacionada amb l'activitat mitòtica. La radiosensibilitat de la cèl·lula varia en funció de la fase de divisió del cicle cel·lular en què es troba. Les cèl·lules en fase de mitosi i G2 són més radiosensibles, probablement perquè la cèl·lula no té temps de reparar el dany radio-induït, i les cèl·lules en fase S són més radioresistents, probablement per la conformació de l'ADN en aquell moment. Existeixen altres factors que influeixen en la radiosensibilitat de la cèl·lula com és la hipòxia. En condicions d'hipòxia la cèl·lula és més radioresistent a causa, entre altres factors, de la disminució en la formació de radicals lliures. És a dir, per un determinat tipus de cèl·lula, la resposta a la irradiació pot veure's modificada per factors biològics (fase del cicle cel·lular en la que es troba i eficàcia dels mecanismes de reparació).

En estudis *in vitro* s'han descrit fenòmens d'hipersensibilitat o radioresistència a dosis baixes, existint una hiperradiosensibilitat a dosis baixes per sota de 0,5 Gy, entre 0,5 i 1Gy existeix una relativa resistència, i per sobre 1 Gy existeix una radioresistència ³²⁻³⁴. A dosis molt baixes existeix un augment d'apoptosi que retorna a nivells basals quan augmenta la dosi de RT ^{35, 36}. Per tant, el fet de tenir més sensibilitat a dosis baixes no vol dir que tinguem més risc de càncer radioinduït, perquè a l'haver-hi més mort cel·lular no pot haver-hi mutacions, és a dir, la hiperradiosensibilitat protegeix d'una mutació cel·lular ³⁶.

En la tesi realitzada per Carlos Sainz Fernández en la Universidad de Cantabria s'analitza la influència de dosis baixes (entre 0,3 i 0,6 Gy) de radiació α (Rn ²²²) i s'objectiva una inducció de l'apoptosi en aquestes dosis ³⁷.

CORBES DOSI-RESPOSTA. EFECTES A DOSIS BAIXES

La radiosensibilitat cel·lular és una característica definida principalment a través de l'estudi de les corbes de supervivència, que representen el percentatge de cèl·lules supervivents en un cultiu després d'administrar una dosi de RT. Per interpretar els efectes de la RT sobre les cèl·lules a partir d'aquestes corbes experimentals de supervivència s'han proposat diferents models matemàtics.

Existeixen tres models matemàtics que expliquen aquesta relació dosi-efecte (Figura 1):

- Model lineal sense llindar: és la hipòtesi més acceptada i utilitzada per ser la que té en compte la situació més desfavorable, ja que suposa que qualsevol dosi d'irradiació, per baixa que sigui, pot resultar potencialment nociva per a l'organisme. La relació matemàtica entre la supervivència cel·lular i la dosi és del tipus lineal-quadràtic. L'argument per mantenir aquesta hipòtesi es basa en la consideració que una única traça de radiació capaç d'induir una mutació en l'ADN, pot provocar lesions que donin lloc a danys tardans greus com pot ser la carcinogènesi, com es comentarà en l'apartat següent.
- Model lineal amb llindar: un nombre creixent d'estudis apunten cap a una alta eficàcia dels mecanismes de reparació i defensa de l'organisme, fet que indica la baixa probabilitat que es produeixin efectes a dosis baixes ³⁸⁻⁴⁰.

- Hormesi: les dosis baixes de RT també poden donar lloc a fenòmens d'adaptació cel·lular a la irradiació. S'anomena resposta adaptativa al fenomen pel qual les cèl·lules sotmeses a una exposició a dosi molt baixa poden ser capaces de resistir una exposició posterior a dosis superiors ⁴¹. La resposta adaptativa constitueix un aspecte d'un fenomen més general anomenat hormesi, caracteritzat per l'aparició d'efectes qualitativament diferents dels esperats a partir dels produïts a dosis més altes ⁴². Aquest fenomen podria tenir conseqüències importants en el camp de la protecció radiològica, atès que els límits actuals de dosi establerts es deriven de càlculs realitzats a partir de les observacions dels efectes causats per la radiació a dosis moderades o altes; la possibilitat de respostes qualitativament diferents a dosis baixes implicaria una revisió dels conceptes i estimacions d'aquests límits de dosi. La possible existència d'un llindar de dosi, a partir del qual no existeixen efectes perjudicials i fins i tot s'observen efectes beneficiosos, suposaria un canvi fonamental en les premisses del sistema actual de protecció radiològica.

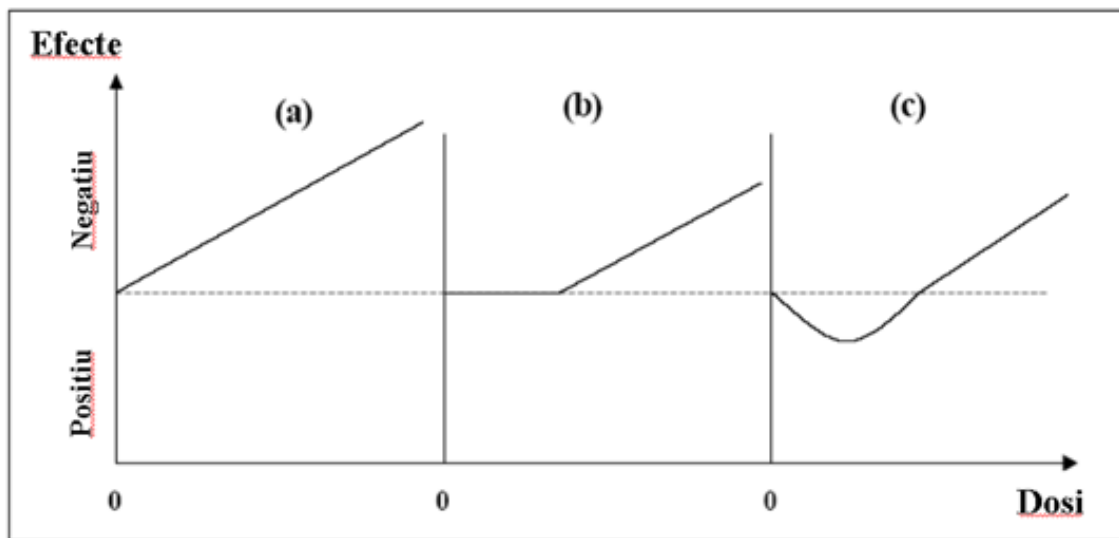


Figura 1. Corbes dosi-resposta segons les hipòtesis: a) Lineal sense llindar, b) Lineal amb llindar, c) Hormètica.

S'han observat també a dosis baixes i en relació a la resposta adaptativa, l'activació de nombrosos gens implicats en el control del cicle cel·lular i la reparació de l'ADN, és a dir, el tipus de gens expressats a dosis baixes per sota de 0,2 Gy poden variar dels que s'expressen a dosis més altes ⁴³. Alguns d'aquests gens són el DDI (DNA Damage Inducible), el GADD (Growth Arrest and DNA Damage), la família de la PKC (Protein Kinasa C) implicats en la regulació del creixement cel·lular, entre d'altres ⁴⁴.

Així mateix s'ha comprovat després d'una irradiació a dosis baixes l'augment d'activitat d'enzims antioxidants, com la superòxid dismutasa, l'alliberació de factors de creixement i l'activació de receptors de membrana que estimulen la proliferació cel·lular ⁴⁴⁻⁴⁷.

També s'ha observat la síntesi de grups específics de proteïnes en resposta a diferents factors d'estrès cel·lular com metalls pesats, agents oxidants,

augment de temperatura i radiacions, entre d'altres. Aquestes proteïnes juguen un paper essencial en la síntesi i el transport d'altres proteïnes directament relacionades amb els mecanismes de defensa de la cèl·lula. La síntesi d'aquests grups de "proteïnes induïdes per estrès" s'ha observat amb dosi de l'ordre de 50 mGy/dia ⁴¹.

S'observen també efectes "bystander", que fa referència que les cèl·lules poden respondre quan s'irradien cèl·lules veïnes ⁴⁸⁻⁵⁰.

4.3. LIMITACIONS DE L'APLICABILITAT DE LA RT EN MALALTIES BENIGNES: EFECTES TARDANS EN TEIXITS SANS I CARCINOGENÈSI. ESTUDIS EPIDEMIOLÒGICS

Els efectes produïts per la RT es classifiquen en estocàstics i en deterministes. Els efectes estocàstics són aquells pels quals la probabilitat que es produeixi un efecte augmenta amb la dosi rebuda, però no tenen un llindar de dosi per manifestar-se. Els efectes estocàstics es poden presentar en l'individu exposat (efectes estocàstics somàtics, com és el cas de la carcinogènesi), com també en la descendència (efectes estocàstics hereditaris). Els efectes deterministes o no estocàstics són aquells en què la severitat de l'efecte augmenta amb la dosi i es produeixen a partir d'una dosi llindar. Per dosis baixes (per sota el llindar) no es produiran efectes clínicament detectables, i en incrementar la dosi s'evidencien els efectes fins arribar a situacions de gravetat.

La protecció radiològica persegueix prevenir els efectes deterministes, no excedint els llindars definits en cada cas, i reduir els efectes estocàstics, mantenint la dosi el més baixa possible.

Clínicament, els efectes secundaris tardans de la RT es manifesten de dues maneres: com a efectes tardans en teixits sans (late effects on normal tissues (LENT)) i desenvolupant segones neoplàsies en teixits irradiats (development of radiation-induced second malignancies (RISM)).

Ambdós efectes secundaris han estat estudiats principalment amb dosis altes de RT. Els efectes tardans sobre teixits sans s'expliquen per un dany sobre l'endoteli vascular i sobre les cèl·lules mesenquimals, donant lloc a telangiectàsies, atròfia i fibrosi en el teixit connectiu.

Però, el principal efecte que impedeix la generalització de la RT com un tractament vàlid i acceptable en malalties diferents al càncer és el risc de carcinogènesi. Aquest aspecte és realment complex, ja que els estudis epidemiològics amb dosi o taxa de dosi baixa rarament poden detectar els efectes de la irradiació per limitacions metodològiques i estadístiques.

La dosi efectiva que s'usa en protecció radiològica contribueix a una estimació més acurada del risc de carcinogènesi i té en compte la radiosensibilitat de cada teixit o òrgan. S'obté multiplicant la dosi absorbida (que s'expressa en Gray) en un teixit o òrgan exposat per un factor de qualitat que varia segons el tipus de radiació (alfa, beta, gamma, X, neutrons) i la sensibilitat específica dels teixits o òrgans. Aquesta dosi efectiva es mesura en Sievert (Sv).

S'ha calculat la dosi efectiva administrada a diferents teixits en el curs de RT per malalties benignes (Taula 1). Si es considera un risc de carcinogènesi del 10% per Sv administrat, la incidència estimada de càncers radioinduïts variaria entre el 0,5 i el 40 per 1000 dels pacients tractats (0,05-4%).

Taula 1. Dosi efectiva de RT administrada als teixits per diferents malalties benignes.

	Dosi administrada (Gy)	Dosi efectiva (mSv)
Oftalmopatia de Graves	20	34-65
Prevenió de l'ossificació heterotòpica	7	174-388 (home) 214-433 (dona)
Omartrosi	12	185-197
Gonartrosi	6	13
Esperó del calcani	6	5

Els estudis epidemiològics han estat incapaços de detectar en humans un augment significatiu de la incidència de càncer amb dosis inferiors a 0,1 Sv. L'únic mètode per estimar els possibles riscos amb dosis baixes és l'extrapolació a partir dels efectes carcinogènics que s'han observat amb dosi entre 0,2 i 3 Sv. La manca d'evidència d'efecte carcinogènic amb la dosi esmentada per sota de 0,1 Sv en estudis humans i animals pot ser a causa que realment no existeixi aquest efecte, o que l'efecte sigui massa baix per detectar-se estadísticament.

Per tant, en la majoria d'estudis l'estimació del risc de càncer radioinduït s'extrapola a partir d'observacions dels efectes de l'exposició a dosis altes o

moderades, seguint l'hipotètic model lineal sense llindar que, com hem comentat, assumeix una relació lineal dosi-resposta entre la dosi de RT i el risc. La hipòtesi d'aquest model darrerament ha estat motiu de controvèrsia, existint grups que recolzen l'existència d'un llindar per sota el qual no es produeix cap efecte ^{39, 40} .

La Comissió Internacional de Protecció Radiològica (ICRP) proposa un límit de dosi, és a dir, una dosi màxima permisible en el personal professionalment exposat, que actualment és de 100 mSv/5 anys o bé de 50 mSv/any.

ESTUDIS EPIDEMIOLÒGICS

Alguns dels estudis epidemiològics on s'estudien els efectes produïts per exposicions agudes d'irradiació en humans inclouen:

- a) Seguiment de supervivents de l'explosió de la bomba atòmica a Japó (Hiroshima i Nagasaki) l'any 1945 ^{51, 52}.
- b) Seguiment de supervivents de l'accident de la central nuclear de Chernobyl a Ucraïna l'any 1986 ⁵³.
- c) Seguiment de pacients irradiats per espondilitis anquilopoiètica entre els anys 1935 i 1954 a Gran Bretanya ^{54, 55}.
- d) Estudi longitudinal de pacients amb tuberculosi que van rebre repetits exàmens fluoroscòpics entre els anys 1930 i 1954 a Canadà ⁵⁶.

L'observació d'aquests grups de població ha demostrat un augment de la incidència de càncer radioinduït i aquest augmenta amb els anys que passen des l'exposició ⁵¹. El factor, però, que s'ha associat més fortament amb la

carcinogènesi és l'edat en el moment de l'exposició; sent el risc de carcinogènesi major en joves (< 30anys). Quan la irradiació es realitza en pacients d'edat més avançada (≥ 60 anys) el risc es redueix per un factor aproximat de tres ^{32, 57}. Aquest fenomen també s'ha descrit en els pacients tractats amb RT per una malaltia de Hodgkin, on el risc d'una segona neoplàsia de mama augmenta quan s'ha irradiat durant la infantesa i adolescència ^{58, 59}.

En relació als estudis epidemiològics amb exposicions a dosis baixes i de manera continuada s'inclouen els estudis fets en poblacions exposades mediambientalment i en treballadors professionalment exposats. En aquests estudis s'ha mesurat la incidència de càncer radioinduït respecte la incidència de càncers esperats en aquella població d'estudi. S'ha de tenir present les limitacions abans esmentades d'aquests estudis: són necessàries poblacions en nombre suficientment gran, així com poblacions control comparables en condicions pràcticament idèntiques, també en aquests estudis s'ha de tenir en compte la susceptibilitat genètica individual a desenvolupar càncer, l'associació amb altres possibles agents carcinogènics associats a l'exposició, com podrien ser el tabac i l'alcohol, els hàbits alimentaris, les condicions sanitàries, els contaminants mediambientals i altres.

Els resultats dels estudis epidemiològics en poblacions exposades a nivells de radiació natural elevats, com són a determinades zones d'EEUU, Xina, Japó, Índia, Iran, Àustria i Regne Unit, han estat, en alguns, una disminució en la mortalitat i en la incidència de càncer en poblacions exposades ⁶⁰⁻⁶⁵. També s'han vist efectes positius com una menor freqüència d'aberracions

cromosòmiques per cèl·lula i una menor inducció d'anormalitats cromosòmiques després d'irradiar les cèl·lules de la població exposada a dosis altes en l'estudi fet a la població de Ramsa (Iran) ^{63, 64}.

La majoria dels estudis epidemiològics fets en treballadors de centrals nuclears que han estat exposats a dosis baixes de radiació no tenen un adequat poder estadístic per detectar efectes. Els resultats d'aquests estudis individuals són inconsistents, alguns han mostrat un excés de risc de càncer, i altres no han mostrat cap augment de risc ⁶⁶⁻⁶⁹. En aquests estudis és important tenir en compte que la lectura dosimètrica pot ser imprecisa. En alguns d'aquests estudis, fins i tot, s'ha observat una major esperança de vida en els treballadors de centrals nuclears, respecte a la població general, però aquest fet difícilment pot ser interpretat com a hormesi o resposta adaptativa, sinó que probablement sigui per un efecte derivat d'un major control sanitari preventiu.

Considerat globalment i tenint en compte les discrepàncies en els estudis epidemiològics, el potencial carcinogènic de la radiació a dosis baixes pot estimar-se com a baix, i a més és important contrastar aquest hipotètic risc, extrapolat bàsicament a partir d'estudis epidemiològics amb exposicions a dosis altes, amb el potencial benefici clínic de la RT-DB ⁷⁰.

4.4. MECANISMES DE LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA: PAPER DELS LEUCÒCITS I MOLÈCULES D'ADHESIÓ

La resposta inflamatòria és un procés finament regulat que inclou una seqüència d'interaccions leucòcit-endoteli, anomenades rodament, adhesió i migració a l'espai intersticial (Figura 2). Inicialment els leucòcits circulants entren en una interacció dèbil amb les cèl·lules endotelials mitjançant un moviment de rodament al llarg de la paret de les vècules. Aquest fenomen de rodament és transitori i reversible, però si es produeix una activació dels leucòcits per l'acció de mediadors inflamatoris locals, els leucòcits activats s'adheriran fermament a la cèl·lula endotelial, i finalment migraran a través de les unions entre les mateixes cèl·lules cap a l'espai intersticial ⁷¹. Cada una d'aquestes etapes està regulada per uns determinats receptors de membrana coneguts com molècules d'adhesió cel·lular (CAMs), que s'expressen a la superfície de la cèl·lula endotelial, del leucòcit i de les plaquetes ⁷¹.

La següent fase de la inflamació està caracteritzada per l'acumulació d'una varietat de cèl·lules immunocompetents al lloc de la inflamació com són limfòcits (B i T), granulòcits (neutròfils, eosinòfils i basòfils) i monòcits/macròfags. Els granulòcits tenen una vida mitjana curta i s'acumulen durant les primeres hores en el lloc de la inflamació, sent una primera línia de defensa immune; els monòcits tenen una vida llarga, a diferència dels granulòcits, i es poden diferenciar en cèl·lules dendrítiques i

macròfags ^{72, 73}. Posteriorment es produeixen funcions com la fagocitosi, la citotoxicitat, la presentació d'antígens, la secreció de citocines, l'alliberament de reactius intermediaris de l'oxigen (RIO) i l'expressió de la iNOS (inducció enzim NO-sintetasa) que resulta en la producció de NO. L'activació dels macròfags és un pas important en la inflamació, ja que una vegada activats produeixen citocines proinflamatòries i NO que són responsables del dolor, eritema i edema.

La cèl·lula endotelial té un paper decisiu en el procés inflamatori, per la seva capacitat a reclutar leucòcits i per la seva capacitat d'expressar diferents citocines i factors de creixement. La secreció de citocines és un pas clau en la regulació de la resposta inflamatòria. Mentre unes citocines tenen efecte proinflamatori, com són la IL-1, el factor necrosi tumoral- α (TNF- α), la IL-6, la IL-8, la IL-12; altres tenen efecte antiinflamatori, com són el TGF- β_1 , la IL-10 i la IL-4.

Les citocines proinflamatòries juguen un paper important en la inducció de l'expressió de molècules d'adhesió i altres mediadors inflamatoris com el NO. El TNF- α estimula macròfags, limfòcits i cèl·lules endotelials, amb la inducció posterior de molècules d'adhesió i efectes sistèmics (febre). El grup de citocines amb efecte antiinflamatori (TGF- β_1 , IL-10) regulen i limiten la reacció inflamatòria. El TGF- β_1 està produït per les cèl·lules endotelials activades i és capaç de disminuir la proliferació cel·lular endotelial, la migració i l'adhesió de limfòcits. La citocina IL-10 està produïda per limfòcits i monòcits i pot inhibir la producció de citocines proinflamatòries com el TNF- α .

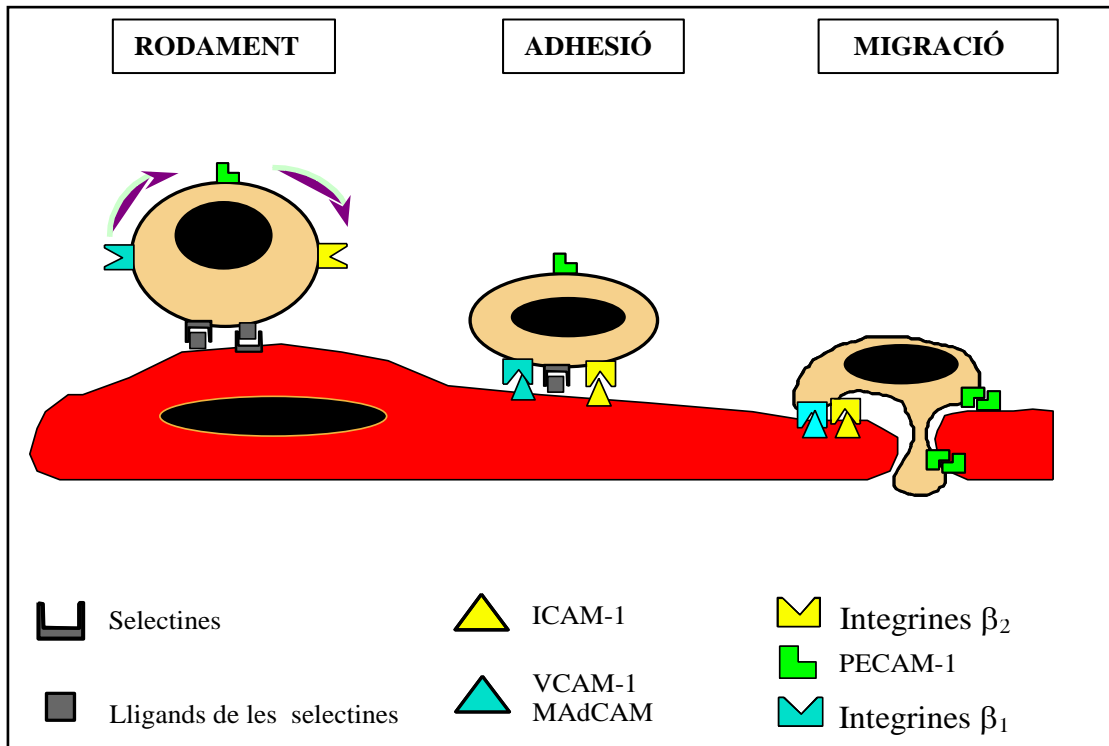


Figura 2. Esquema de les fases del reclutament de leucòcits circulants. Inicialment els leucòcits roden per la paret vascular en una interacció mediada per molècules d'adhesió de la família de les selectines (P-, E- i L-selectines) i els seus corresponents lligands. Posteriorment part dels leucòcits en rodament que són activats per senyals del microambient s'adhereixen i finalment migren, mitjançant l'acció de molècules de la superfamília de les immunoglobulines expressades a l'endoteli (ICAM-1, VCAM-1 i PECAM-1) i els seus contrareceptors, les integrines leucocitàries.

ICAM-1, molècula d'adhesió intercel·lular 1; VCAM-1, molècula d'adhesió cel·lular vascular 1; PECAM-1, molècula d'adhesió plaquetoendotelial-1

Les interaccions leucòcit-endoteli varen ser caracteritzades inicialment mitjançant estudis d'adhesió *in vitro*, però amb aquestes tècniques no és possible determinar correlacions espaials ni temporals de la resposta

inflamatòria. Per això, la tècnica d'elecció per caracteritzar aquests fenòmens és la microscopia intravital, que permet la visualització directa dels processos de la inflamació, juntament amb tècniques de fluorescència per avaluar l'efecte de la inflamació sobre la permeabilitat microvascular.

Principals molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries

Les diferents famílies de CAMs que participen en les interaccions leucòcit-endoteli inclouen les selectines i els seus lligands, la superfamília de les immunoglobulines i les integrines (Taula 2).

Taula 2. Molècules d'adhesió implicades en les interaccions leucòcit-endoteli.

Molècula d'adhesió	Localització	Expressió Constitutiva Induïble		Lligand	Funció
Família de les selectines					
P-selectina	Cèl·lules endotelials Plaquetes	Sí	Sí	L-selectina PSGL-1 CD24	Rodament
E-selectina	Cèl·lules endotelials	No	Sí	PSGL-1 ESL-1 L-selectina	Rodament
L-selectina	Tots els leucòcits	Sí	No	P-selectina E-selectina GlyCAM CD34 MAdCAM-1 PSGL-1 PCLP-1	Rodament
Superfamília de les immunoglobulines					
ICAM-1 (CD54)	Endoteli Monòcits	Sí	Sí	CD11a/CD18 CD11b/CD18	Adhesió Migració
ICAM-2 (CD102)	Endoteli	Sí	No	CD11a/CD18	Adhesió Migració
VCAM-1 (CD106)	Endoteli	Sí	Sí	$\alpha_4\beta_1$ $\alpha_4\beta_7$	Adhesió Migració
MAdCAM-1	Endoteli intestinal	Sí	Sí	$\alpha_4\beta_7$ L-selectina	Adhesió Migració
PECAM-1 (CD31)	Endoteli Leucòcits Plaquetes	Sí	No	PECAM-1 aVb3?	Adhesió Migració
Família de les integrines					
CD11a/CD18 (LFA-1, $\alpha_L\beta_2$)	Tots els leucòcits	Sí	No	ICAM-1 ICAM-2	Adhesió Migració
CD11b/CD18 (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$)	Granulòcits Monòcits	Sí	Sí	ICAM-1	Adhesió Migració
CD11c/CD18 ($\alpha_X\beta_2$)	Granulòcits Monòcits	Sí	Sí	Fibrinogen C3b	Activació Adhesió?
$\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	Limfòcits Monòcits Granulòcits activats	Sí	Sí	VCAM-1 Fibronectina	Adhesió
$\alpha_4\beta_7$	Limfòcits	Sí	No	MAdCAM-1 VCAM-1 Fibronectina	Rodament Adhesió

Selectines

Són les CAMs responsables dels fenòmens de “rodament” leucocitari. Diferenciem tres tipus de selectines en funció del lloc on s’expressin: P-selectina present a la cèl·lula endotelial i plaquetària, E-selectina que s’expressa únicament a la cèl·lula endotelial i la L-selectina que està present a la membrana leucocitària. Aquestes glicoproteïnes comparteixen una estructura comuna que consisteix en un domini lectina a l’extrem amino-terminal, un domini del tipus factor de creixement epidèrmic, una seqüència consens repetida entre 2 i 9 vegades, un domini transmembrana i una cua citoplasmàtica curta ⁷⁴ (Figura 3).

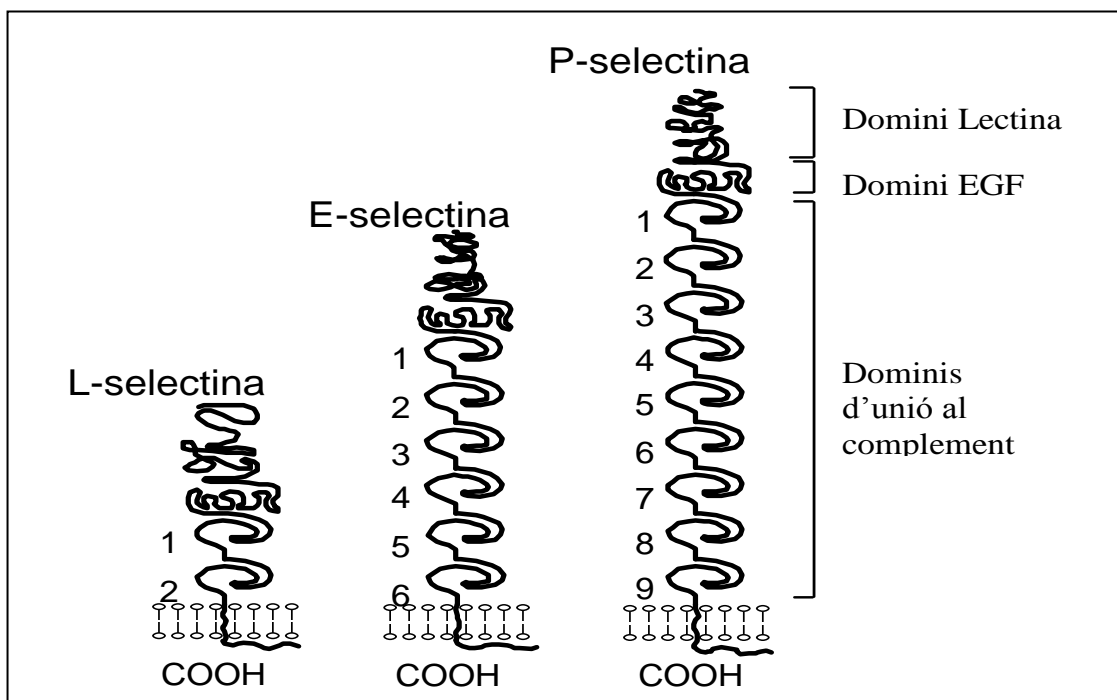


Figura 3. Estructura molecular de les selectines. Totes les selectines contenen un domini lectina, un domini *epidermal growth factor (EGF)-like* i diversos dominis d'unió al complement.

La molècula de P-selectina se sintetitza de forma constitutiva en cèl·lules endotelials i plaquetes i s'emmagatzema en els cossos de Weibel-Palade o en els grànuls alfa, respectivament ⁷⁵. En resposta a un estímul activador, com per exemple la histamina, trombina o els radicals de l'oxigen ⁷⁶, la P-selectina és mobilitzada cap a la membrana cel·lular i apareix expressada a la superfície de la cèl·lula pocs minuts després ⁷⁴. També pot ser regulada a nivell transcripcional en resposta a estímuls com l'endotoxina o el TNF- α . Posteriorment, la P-selectina pot ser altre cop dirigida cap a l'interior de la cèl·lula i reutilitzada, o bé pot desprendre's i ser alliberada al plasma, donant lloc a la P-selectina soluble ⁷⁶. Les cèl·lules endotelials, a més de mobilitzar cap a la seva superfície els dipòsits de P-selectina preformada, poden també sintetitzar de nou P-selectina en resposta a determinats estímuls com l'endotoxina o determinades citocines. Aquesta síntesi es tradueix en un segon pic d'expressió, que es detecta a la superfície de les cèl·lules, 4-5 hores després de l'estímul ^{77, 78}. En canvi, la E-selectina no es troba de forma constitutiva a la superfície de les cèl·lules endotelials, la seva expressió requereix la inducció de la seva síntesi. En no existir E-selectina preformada, la síntesi i l'expressió d'aquesta molècula estan totalment regulades a nivell transcripcional. S'ha demostrat que l'expressió d' E-selectina en les cèl·lules endotelials pot ser induïda per diversos estímuls, com la IL-1 o el TNF- α . L'expressió d'E-selectina pot ser detectada a la superfície de les cèl·lules a les 2 hores, disminuint novament 8 hores després de l'estímul ⁷⁹⁻⁸¹.

A diferència de les dues anteriors, la L-selectina és una CAM que s'expressa a la superfície dels leucòcits. Les interaccions entre la L-selectina i

l'endoteli no requereixen de l'activació del leucòcit, ja que la L-selectina s'expressa a la seva superfície de forma constitutiva. La L-selectina ha estat implicada en els fenòmens d'adhesió dels neutròfils a cèl·lules endotelials ja activades, però no a cèl·lules endotelials quiescents. Aquest fet fa suposar que el lligand de la L-selectina no es troba de forma constitutiva a la superfície endotelial i que, en canvi, s'hi expressa com a resultat de l'activació d'aquestes cèl·lules ⁸².

Contràriament al que succeeix amb la P- i la E-selectina, l'activació dels leucòcits per mitjà de citocines o d'altres agents pro-inflamatoris s'acompanya d'una disminució en l'expressió de L-selectina, com a resultat del seu alliberament de la membrana dels leucòcits ^{83, 84}.

Lligands de les selectines

Es tracta d'una família de CAMs, situades a la superfície de les cèl·lules endotelials i dels leucòcits, que pertany al grup de les sialomucines. Les sialomucines són proteïnes riques en serina i treonina, que posseeixen un alt grau de glicosilació de la seva molècula per carbohidrats sulfatats, els quals sembla que són els que possibiliten la interacció amb altres CAMs ⁷⁴. Aquestes proteïnes altament glicosilades contenen, entre d'altres, els tetrasacàrids sLex, sLea, o bé les seves formes sulfatades, que tenen la capacitat d'unir-se a les tres selectines ⁸⁵. A la superfície de les cèl·lules endotelials s'han descrit lligands específics per a la L-selectina ⁸⁶, i a la superfície leucocitària altres lligands específics per a la P-selectina ^{87, 88} o la E-selectina ⁸⁹. De les sialomucines identificades, aquelles que actuen de

Lligands de les selectines són: GlyCAM-1, CD34 i PCLP1 com a lligands de la L-selectina; ESL-1 (E-selectin ligand-1) i la mateixa L-selectina com a lligands de la E-selectina; CD24 i L-selectina com a lligands de la P-selectina i PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) que pot unir-se a les tres selectines, però la seva afinitat varia en funció de les glicosilacions dels seus residus ⁹⁰.

Superfamília de les immunoglobulines

Aquesta família de molècules intervé en la fase d'adhesió ferma dels leucòcits a les cèl·lules endotelials en diferents tipus de processos inflamatoris aguts i crònics ⁹¹⁻⁹³. S'expressen majoritàriament a la superfície endotelial. La característica estructural comuna a aquest conjunt de CAMs és l'existència de múltiples dominis tipus immunoglobulina a la seva estructura (Figura 4). Cinc d'aquestes molècules intervenen en les interaccions leucòcit-endoteli: molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1), molècula d'adhesió intercel·lular-2 (ICAM-2), molècula d'adhesió vascular-1 (VCAM-1), molècula d'adhesió mucosa addressina-1 (MAdCAM-1) i molècula d'adhesió plaquetoendotelial-1 (PECAM-1).

ICAM-1 s'expressa de forma constitutiva en cèl·lules endotelials, cèl·lules epitelials, leucòcits i fibroblasts ^{81, 94}. L'activació de l'endoteli per mitjà de citocines, LPS, o altres estímuls pro-inflamatoris, indueix un increment en l'expressió d'ICAM-1, la magnitud del qual varia de forma molt marcada d'un territori vascular a un altre ^{81, 94-96}.

ICAM-2 és una forma truncada de la molècula ICAM-1. A l'igual que aquesta, s'expressa de forma basal en les cèl·lules endotelials. No obstant, a diferència d'ICAM-1, la seva expressió no es modifica després de l'estimulació de l'endoteli ⁹⁷.

VCAM-1 és una CAM endotelial, l'expressió constitutiva de la qual és molt baixa. En canvi, la seva expressió es veu estimulada per citocines o LPS, amb una cinètica similar a la d'ICAM-1. VCAM-1 és un lligand de les integrines $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4) i $\alpha_4\beta_7$ ^{98, 99}, i té un paper important en el reclutament de limfòcits i monòcits, encara que també pot reclutar neutròfils.

L'adrossina mucosa MAdCAM-1 s'expressa fonamentalment a l'endoteli de les vècules de les plaques de Peyer, així com en altres vècules de l' intestí prim i gruixut ¹⁰⁰. Aquesta molècula pot actuar com a lligand tant de L-selectina com de la integrina $\alpha_4\beta_7$, i les interaccions de la MAdCAM-1 estan implicades en la recirculació fisiològica de limfòcits cap a les plaques de Peyer, així com en el reclutament de limfòcits cap al teixit intestinal en condicions d'inflamació ^{101, 102}.

Finalment, PECAM-1 és un mediador de l'adhesió de leucòcits i plaquetes a cèl·lules endotelials. A més, s'ha postulat que pot intervenir també en la migració dels leucòcits, a través de les cèl·lules endotelials, cap a l'espai intersticial ^{103, 104}. Aquesta CAM s'expressa a les plaquetes, leucòcits, i cèl·lules endotelials. A l'igual que ICAM-2, no es modifica de forma significativa el seu grau d'expressió després de l'estimulació amb citocines.

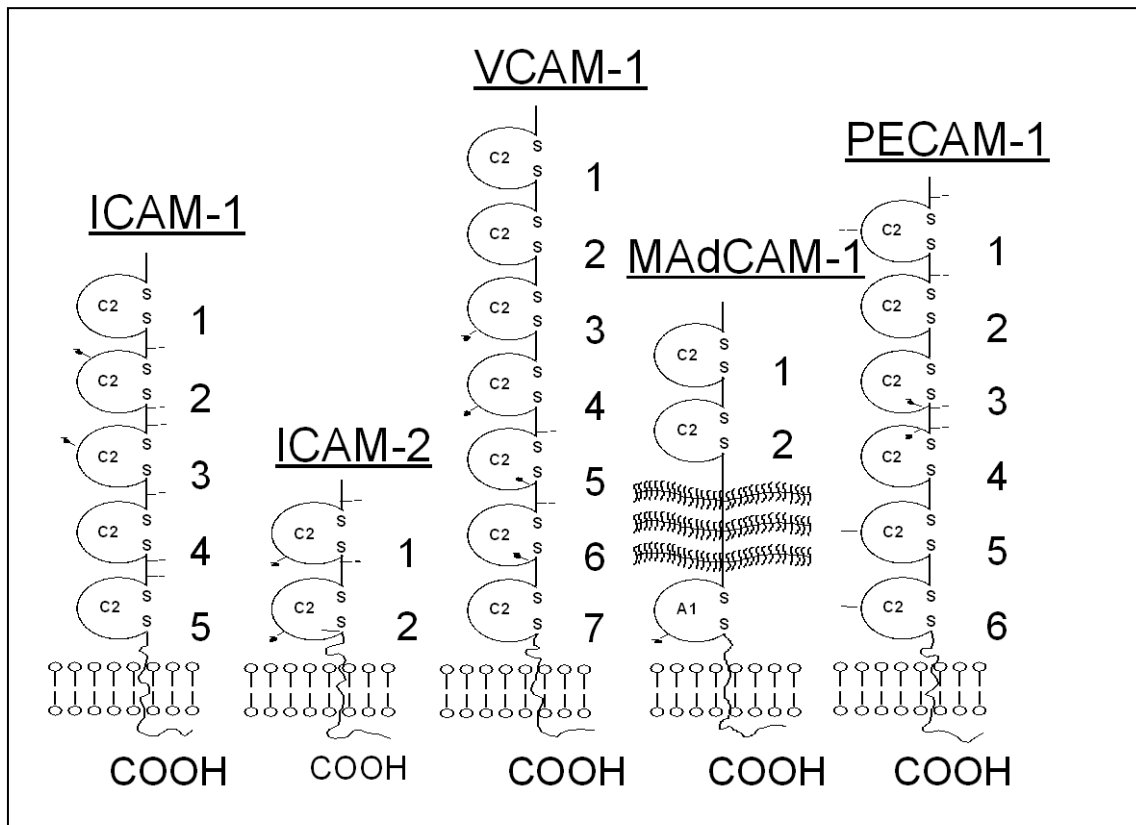


Figura 4. Estructura de les molècules d'adhesió de la família de les immunoglobulines.

Integrines

Les integrines són proteïnes amb una estructura heterodimèrica, resultant de la unió d'una subunitat α i una subunitat β (Figura 5). Els leucòcits poden expressar a la seva superfície 13 integrines diferents, totes elles pertanyents a les subfamílies β_1 , β_2 , i β_7 . Les integrines de la família β_2 estan formades per una subunitat β comuna (CD18), que s'uneix a una subunitat α , que pot ser CD11a, CD11b, o CD11c. Els limfòcits perifèrics expressen fonamentalment CD11a/CD18, mentre que els neutròfils, monòcits i cèl·lules natural killer poden expressar qualsevol de les tres integrines de la

subfamília β_2 ¹⁰⁵. CD11b/ CD18 s'expressa basalment a la superfície de la majoria de leucòcits on interacciona amb ICAM-1 o ICAM-2 per tal de promoure l'adhesió leucocitària. Per contra, la majoria de glicoproteïnes CD11b/CD18 i CD11c/CD18 estan emmagatzemades en grànuls que poden ser ràpidament mobilitzats a la superfície de monòcits i neutròfils activats per fusió de la membrana dels grànuls amb la membrana plasmàtica. CD11b/CD18 interacciona amb ICAM-1 de les cèl·lules endotelials i els lligands per CD11c/CD18 inclouen fibrinogen i iC3b ¹⁰⁶.

Una segona subfamília d'integrines resulta de la combinació de la subunitat β_1 amb diverses subunitats α . Així, la integrina $\alpha_4\beta_1$ interacciona amb VCAM-1 i intervé en l'adhesió ferma de limfòcits, monòcits, eosinòfils i cèl·lules natural killer a les cèl·lules endotelials activades ^{107, 108}. També s'ha vist que, en certes condicions inflamatòries, s'indueix l'expressió de α_4 en neutròfils, els quals poden adherir-se a l'endoteli també a través d'aquesta molècula ¹⁰⁹.

Finalment, la integrina $\alpha_4\beta_7$, que s'expressa selectivament en una subpoblació de limfòcits que colonitza el teixit limfoid associat a la mucosa de l'intestí, reconeix el lligand endotelial MAdCAM-1. Aquesta interacció és essencial per a la recirculació dels limfòcits a l'intestí, en condicions fisiològiques ^{110, 111}. A més de MAdCAM-1, $\alpha_4\beta_7$ pot també interaccionar amb VCAM-1, encara que amb una menor afinitat, i intervenir en el reclutament limfocitari en condicions d'inflamació ¹¹².

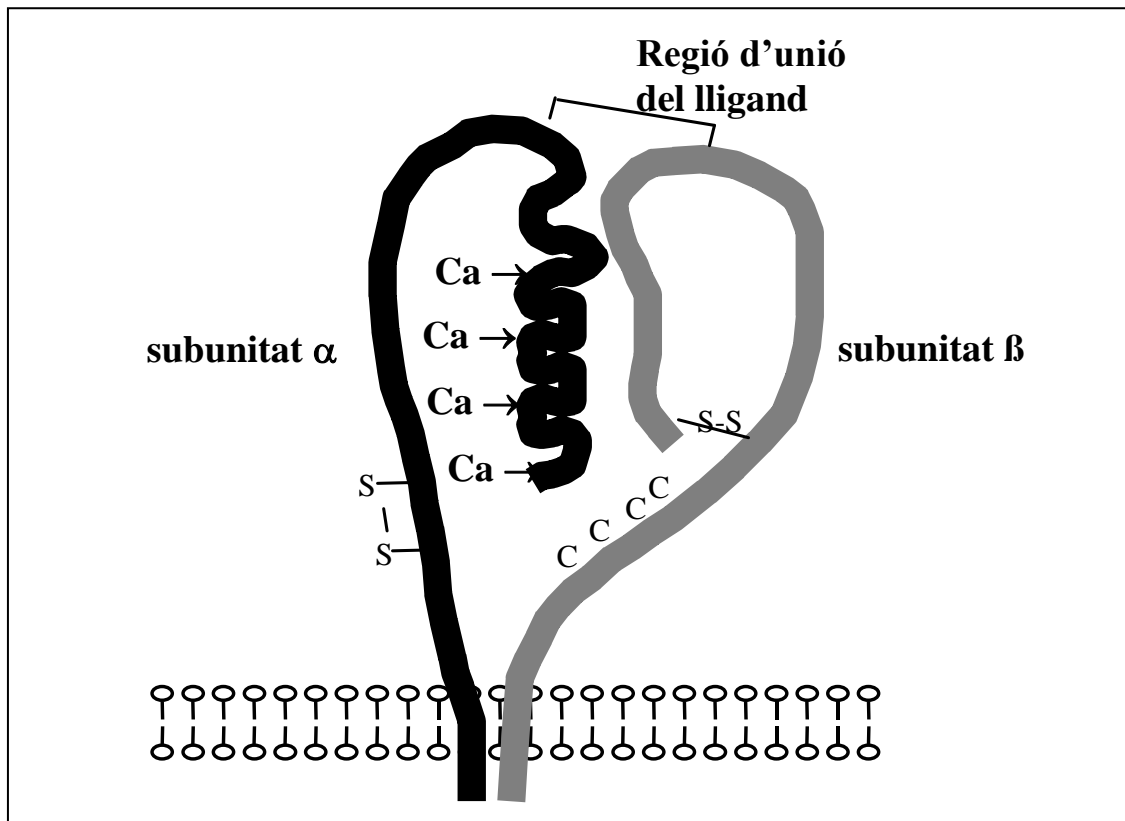


Figura 5. Estructura molecular de les integrines. Aquestes resulten de la unió no covalent de dues subunitats, α i β . L'esquema mostra la contribució d'ambdues subunitats per a constituir el lloc d'unió al seu lligand.

REGULACIÓ EN L'EXPRESSIÓ DE MOLÈCULES D'ADHESIÓ ENDOTELIAL

La regulació de l'expressió de diverses molècules d'adhesió ve en part determinada per l'activació de factors de transcripció. S'han descrit molts factors de transcripció, dels quals el factor nuclear kappa B (NF- κ B) i la proteïna activadora (AP) -1 sembla que són particularment rellevants en la regulació de les molècules d'adhesió cel·lular ¹¹³⁻¹¹⁵. NF- κ B resideix

normalment en el citoplasma, des d'on pot ser translocat cap al nucli en resposta a diferents estímuls com patògens bacterians, vírics i citocines proinflamàtòries ^{116, 117}. S'han identificat llocs d'unió per NF- κ B les regions promotores dels gens de la E-selectina, VCAM-1, MAdCAM-1 i ICAM-1, en aquest últim també s'ha identificat un lloc d'unió per AP-1. El factor NF- κ B juga un paper molt important en la inducció d'aquests gens en resposta a citocines proinflamàtòries ¹¹⁸ (Figura 6). El factor de transcripció NF- κ B s'ha trobat activat de manera uniforme en diversos models animals de malaltia inflamatòria intestinal (MII) ¹¹⁹⁻¹²¹. Aquesta activació es restringeix a les àrees amb inflamació activa, i té lloc tant en les cèl·lules mononuclears de la làmina pròpia com en les cèl·lules epitelials intestinals ^{121, 122}.

Per tant, el NF- κ B pot ser activat per senyals que inclouen les citocines (com IL-1 i TNF- α), endotoxines bacterianes i estímuls pro-apoptòtics i necròtics com els radicals lliures i les radiacions ionitzants ¹²³. Estudis *in vitro* en cèl·lules aïllades han objectivat una activació del NF- κ B en resposta a la irradiació a dosis altes ^{124, 125}. La radiació provoca una sobreexpressió d'ICAM-1 dependent de la unió de NF- κ B al promotor d'ICAM-1 ¹²⁶.

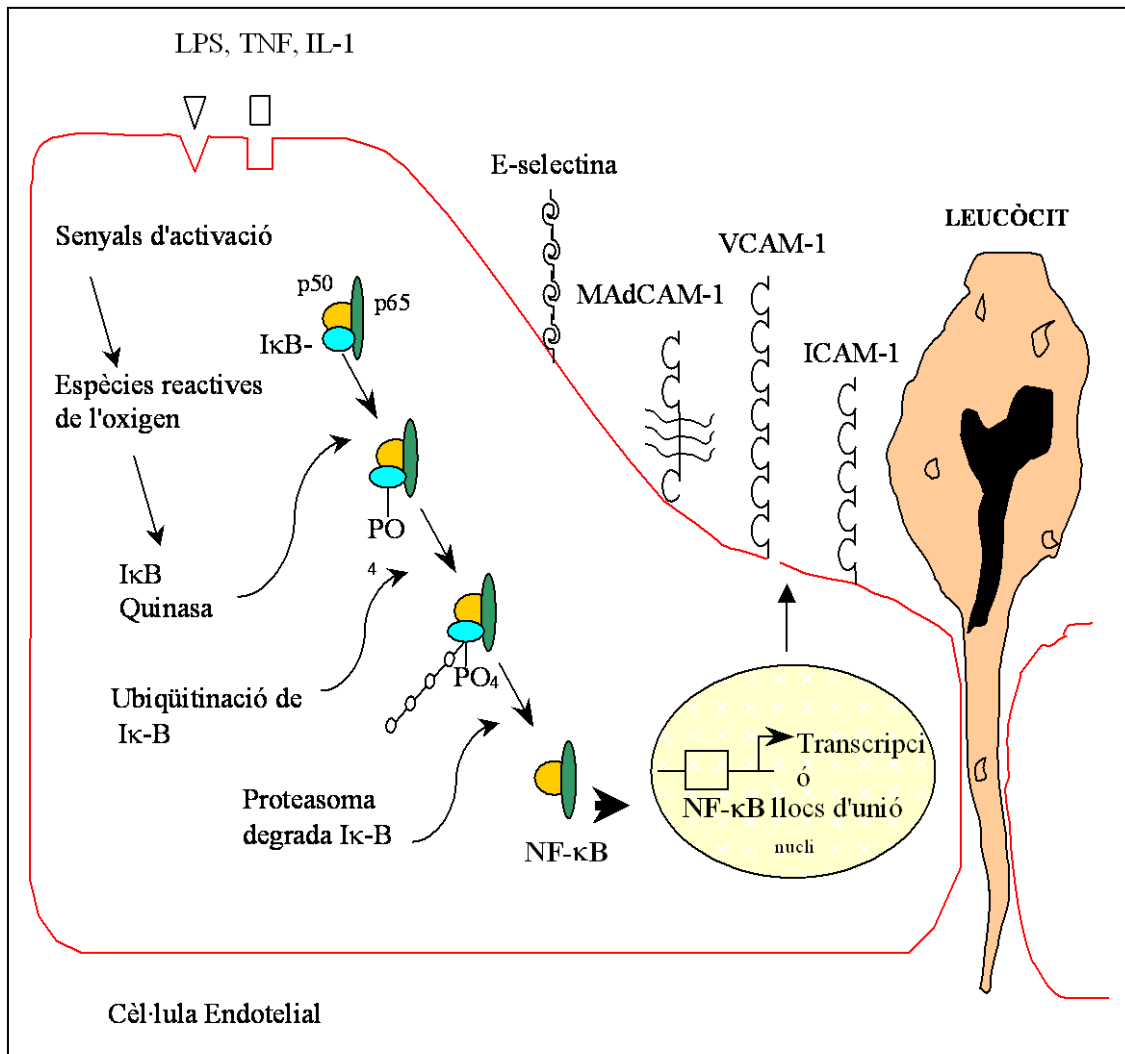


Figura 6. Esquema d'activació de NF-κB a les cèl·lules endotelials i estimulació de la síntesi de glicoproteïnes d'adhesió en resposta a estímuls pro-inflamatoris.

MECANISMES INFLAMATORIS A L'INTESTÍ

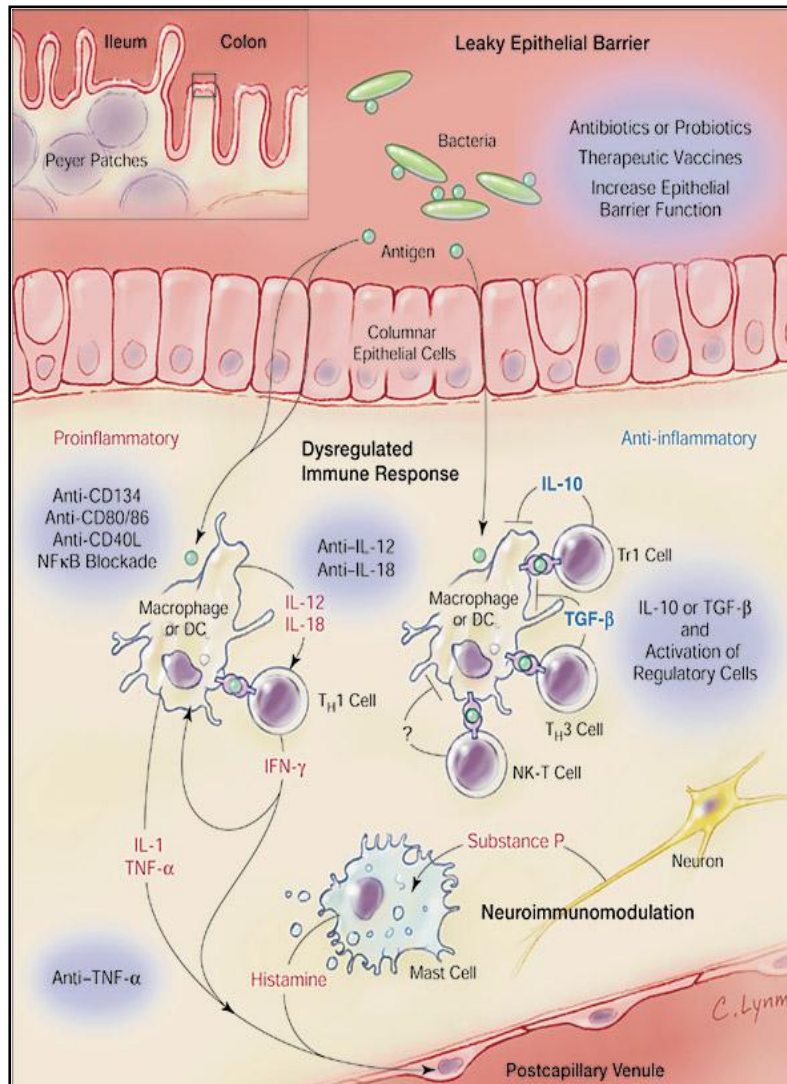
La inflamació “fisiològica” o “controlada” de l'intestí humà és un fenomen finament regulat on diverses cèl·lules i funcions estan implicades a mantenir

una resposta immunitària local apropiada, protectora i respectuosa amb l'estructura i funció de l'intestí. Els canvis en algun dels tipus o funcions cel·lulars, particularment en l'alliberament local de mediadors solubles, pot desencadenar una "inflamació descontrolada" amb dany tissular. En situació normal, els limfòcits T constitueixen una tercera part de les cèl·lules de la làmina pròpia de l'intestí i es troben permanentment en un estat potencial d'activació que els permet produir nivells alts de citocines, a diferència dels limfòcits T de sang perifèrica ¹²⁷. Malgrat això, l'intestí ha desenvolupat un mecanisme que prevé d'una reactivitat immunitària excessiva per tal d'evitar una inflamació desmesurada i dany tissular. Aquest mecanisme està associat a una producció local de molècules immunosupressores (com per exemple, IL-10, TGF- β_1), un alliberament baix de senyals coestimuladors i una producció reduïda, per part de la mucosa intestinal, de mediadors amb capacitats reductores, limitant així les capacitats proliferatives de les cèl·lules de la làmina pròpia ¹²⁸. Consistent amb aquestes observacions, la supressió dels gens de IL-10 o TGF- β_1 en ratolins provoca unes respostes molt similars a la MII humana ^{129, 130}. A més, una gran proporció de limfòcits T de la làmina pròpia expressen l'antigen Fas, una molècula que desencadena una sèrie d'esdeveniments que culminen en el procés fisiològic de suïcidi cel·lular, anomenat apoptosi. A diferència del limfòcits T de sang perifèrica no estimulats, els de la làmina pròpia intestinal presenten una predisposició endògena més alta a morir ¹³¹, fent que la mucosa intestinal sigui un entorn controlat on les respostes immunitàries no resultin en inflamacions patològiques.

D'altra banda, en comparació amb l'intestí humà normal, l'intestí de la MII mostra un nombre incrementat de cèl·lules immunocompetents (Figura 7). Una gran fracció de cèl·lules T són reclutades de la sang cap a la mucosa intestinal a causa d'una expressió augmentada de les molècules adhesió i de les citocines a l'intestí inflammat.

Mentre que les cèl·lules T normals mostren una elevada susceptibilitat a l'apoptosi mediada per Fas, la MII s'associa a una resistència de les cèl·lules T enfront diversos estímuls apoptòtics ^{132, 133}. Aquest fet fa augmentar la supervivència de les cèl·lules T a la mucosa intestinal, amb el consegüent augment de síntesi de citocines derivades d'aquestes cèl·lules i, per tant, l'agreujament de la inflamació.

La pèrdua de la tolerància a antígens de la pròpia flora intestinal sembla que és un altre factor important que contribueix a l'augment de l'activació i acumulació de cèl·lules T a la MII ¹³⁴. Aquesta desregulació és causada, en part, per un balanç alterat entre molècules proinflamatòries (IFN- γ , TNF- α , IL-6) i antiinflamatòries (IL-10, TGF- β_1) ¹³⁵.



Blumberg RS, JAMA 2001 ¹³⁶

Figura 7. Mecanismes inflamatoris en l'intestí de la malaltia inflamatòria intestinal. En un primer temps, els antígens bacterians travessen, de manera inapropiada, la barrera epitelial de la mucosa intestinal. Els macròfags tissulars i les cèl·lules dendrítiques (DC) presenten aquests antígens a les cèl·lules T residents i activen les cèl·lules T proinflamatòries més que a les cèl·lules T reguladores, fet que porta a un excés d'alliberació de citocines proinflamatòries (IL-1, TNF- α) per les diferents cèl·lules immunes.

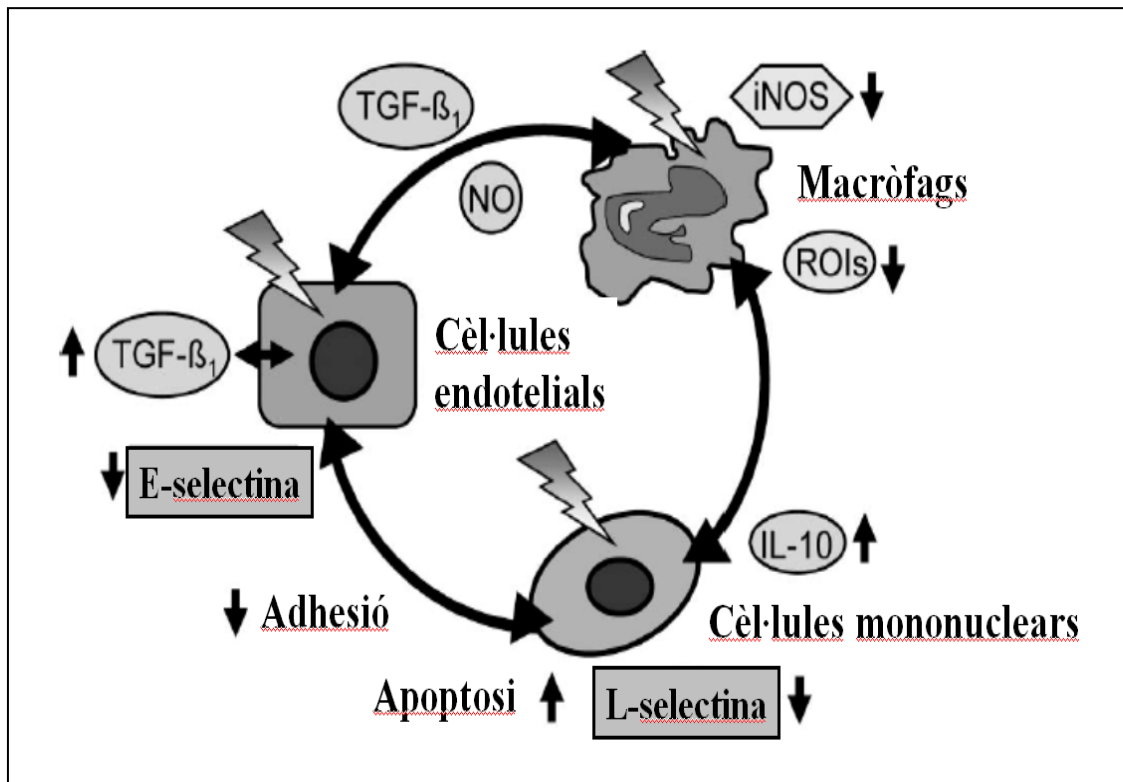
IL, interleucina; INF, interferó; NF-kB, factor nuclear Kappa B; TGF, factor de creixement transformant; Tr1, cèl·lula T reguladora

4.5. MECANISMES ANTIINFLAMATORIS DE LA RT-DB

Els efectes antiinflamatoris de la irradiació a dosis baixes han estat avaluats en estudis clínics i experimentals *in vivo* i *in vitro*. La RT-DB modula la funció d'una varietat de cèl·lules inflamatòries, incloent cèl·lules endotelials, leucòcits polimorfonuclears i macròfags. Existeixen diferents hipòtesis (Figura 8) que expliquen els mecanismes de la RT-DB, com són una disminució de l'adhesió de polimorfonuclears a cèl·lules endotelials i la inducció d'apoptosi (mort cel·lular programada)^{7, 137}, una disminució de l'expressió de molècules d'adhesió (Selectines (P-, L-, E-), ICAM, VCAM), una disminució de la producció de NO, un augment de l'activació de NF-κB i un augment de producció de citocines per la cèl·lula endotelial i cèl·lules immunes (IL-10, TGF-β₁)^{3, 6-8, 125, 137-145}.

Resum de les hipòtesis de l'acció antiinflamatòria de la RT-DB

- Disminució de l'adhesió de polimorfonuclears
- Disminució de la E i/o L-selectina
- Augment de l'apoptosi
- Disminució del NO, iNOS i RIO
- Augment del NF-κB
- Augment de l'expressió de citocines antiinflamatòries (IL-10, TGF-β₁)



Rodel F, *Int J Rad Biol* 2004 30, 143

Figura 8. Resum de les hipòtesis de l'acció antiinflamatòria de la RT-DB.

ROIs: Reactius intermediaris de l'oxigen; IL-10, interleucina 10; TGF- β_1 , factor de creixement transformant β_1 ; NO, òxid nítric; iNOS, inducció enzim NO-sintetasa

La majoria d'estudis *in vivo* han observat una millora en els paràmetres clínics en el model experimental usat, mentre que els estudis *in vitro* han estudiat els possibles mecanismes que expliquen aquests efectes antiinflamatoris de la RT-DB (Taula 3).

Taula 3. Resum dels mecanismes radiobiològics de la RT-DB.

<u>Mecanisme</u>	<u>Dosi assajades</u>
Superfamília de les immunoglobulines	- No es modifica l'expressió d' ICAM-1 ni VCAM-1 (dosi 0,1-1 Gy) ^{6, 7, 125, 141}
Selectines	- ↓ expressió L-selectina (mínima amb dosi de 0,3 Gy), no es modifica E-selectina ni P-selectina ⁷ - ↓ expressió E-selectina (mínima a dosi de 0,7 Gy) ^{6, 144} - ↑ expressió E-selectina (0,5 Gy) ^{125, 138}
INOS	- ↓ iNOS (≤ 1.25 Gy) ^{3, 140, 141}
RIO	- ↓ RIO (0,3 - 0,6 Gy) ^{145, 146}
NF-kB	- ↑ NF-kB (màxim a 0,5 Gy), ↓ a dosi de 0,6-0,8 Gy i de nou ↑ a 1-3 Gy ⁸
TGF- β_1	- ↑ TGF- β_1 (màxim a 0,5 Gy) ⁸

ICAM-1, molècula d'adhesió intercel·lular 1; VCAM-1, molècula d'adhesió cel·lular vascular 1; iNOS, inducció enzim NO-sintetasa; RIO, reactius intermediaris de l'oxigen; NF-kB, factor nuclear Kappa B; TGF- β_1 , factor de creixement transformant β_1

4.5.1. Estudis *in vitro* (Taula 4)

Estudis *in vitro*, suggereixen que dosis molt baixes $\leq 0,7$ Gy modulen l'expressió de determinades molècules d'adhesió i la producció de citocines, resultant en una disminució de l'adhesió de leucòcits a la cèl·lula endotelial ^{3, 6-8, 138-146}. En aquests estudis, s'ha analitzat el paper de la RT-DB en els diferents passos de la resposta inflamatòria (Taula 4).

Taula 4. Resum dels estudis *in vitro* de la RT-DB.

<u>Autor</u>	<u>Dosi</u>	<u>Resultats</u>
Kern 1999, 2000 ^{7, 142}	0,1-10 Gy	0,1-0,5 Gy: ↓ adhesió 70%, ↓ expressió L-selectina (mínima a 0,3 Gy) No es modifica l'expressió d'ICAM-1 ni VCAM-1 amb dosis 0,1-1 Gy No es modifica l'expressió d' E-selectina, P-selectina ↑ apoptosi (màxima entre 0,3-0,7 Gy)
Roedel 2002, 2004 ^{8, 144}	0,3-10 Gy	0,3-0,7 Gy: ↓ adhesió, ↓ E-selectina , ↑ TGF- β_1 i ↑ IL-6, ↑ NF-kB
Hildebrandt 1998, 2002, 2003 ^{3, 6, 141}	0,3-10 Gy	0,3-0,6 Gy: ↓ adhesió, ↓ expressió d'E-selectina, no es modifica ICAM-1 ≤1.25 Gy: ↓ iNOS
Schae 2002 ¹⁴⁵	0,3-10 Gy	0,3-0,6 Gy: ↓ estrès oxidatiu
Mirzaie-Joniani 2002 ^{137, 147}	0,5-10 Gy	<2 Gy i baixa taxa de dosi : ↑ apoptosi
Hallahan 1995, 1996, 1997 ^{125, 138, 148}	0,5-50 Gy	↑ expressió d'E-selectina (s'observa amb dosi de 0,5 Gy) ICAM-1 no es modifica amb dosi <5 Gy
Hertveldt 1997 ¹⁴⁹	0,1-5 Gy	<1 Gy: ↑ apoptosi
Prasad 1994 ¹⁵⁰	0,25-50 Gy	↑ NF-kB (màxim a 0,5 Gy)

ICAM-1, molècula d'adhesió intercel·lular 1; VCAM-1, molècula d'adhesió cel·lular vascular 1; TGF- β_1 , factor de creixement transformant β_1 ; IL-6, interleucina; NF-kB, factor nuclear Kappa B; iNOS, inducció enzim NO-sintetasa

Alguns d'aquests estudis *in vitro* han estudiat el temps en el qual es manté la resposta antiinflamatòria de la RT-DB; s'hi objectiva una disminució de l'adhesió a les 4, 24 i 48 h després de la RT, en dos d'ells s'hi observa un augment d'adhesió de leucòcits a la cèl·lula endotelial a les 12 h de la irradiació, presentant una correlació inversa amb les concentracions de TGF- β_1 i l'activació de NF- κ B^{6, 8}.

4.5.1.1. Molècules d'adhesió (CAMs, selectines)

S'han observat resultats homogenis quan a l'efecte de la RT-DB sobre l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1, quedant clar que no juguen cap paper en els efectes antiinflamatoris de la RT-DB amb dosi ≤ 1 Gy en tres estudis^{6, 7, 138}.

Quan al paper de les selectines, s'observa una disminució de l'expressió de la L-selectina, però en canvi els efectes de la RT-DB sobre l'expressió de l'E-selectina són contradictoris, ja que mentre en dos estudis s'observa una disminució d'E-selectina^{6, 144}; existeix un altre estudi on s'observa un augment d'E-selectina¹³⁸.

4.5.1.2. Apoptosi

Existeixen diferents estudis on es demostra que la RT-DB augmenta l'apoptosi, la mort cel·lular programada, sent aquesta un dels mecanismes pels quals la RT causa inhibició del creixement¹³⁷. L'augment d'apoptosi

dels limfòcits després de la RT s'ha vist que és màxim amb dosi entre 0,3 i 1 Gy, i en quan al temps s'ha observat que és màxim entre les 12 i 48 h des la RT ^{149, 151}.

L'apoptosi disminueix la producció de citocines proinflamatòries com el TNF i IL-1 i en canvi augmenta l'alliberament al mitjà de IL-10 (efecte antiinflamatori) amb dosi entre 0,3 i 0,5 Gy. Les cèl·lules apoptòtiques són capaces de donar resposta immunosupressora.

En l'estudi de Kern *et al*, la RT-DB indueix un màxim d'apoptosi dels polimorfonuclears amb dosi entre 0,3 i 0,7 Gy, i els autors proposen que l'apoptosi és el mecanisme que contribueix a la disminució de l'adhesió observada en el seu estudi *in vitro* i que contribueix a l'efecte antiinflamatori observat clínicament ¹⁴².

4.5.1.3. Macròfags. Òxid nítric

El macròfag és un component important en la reacció inflamatòria local; una de les seves funcions és l'expressió d'iNOS, el qual, a través de l'increment de la síntesi de NO, té un important paper durant la resposta inflamatòria.

Estudis *in vitro* i *in vivo*, usant macròfags activats amb LPS o IFN- γ , demostren que la RT-DB (0,6 a 1.25 Gy) modula la producció de NO en els macròfags disminuint l'expressió d'iNOS ³. Baixes concentracions de NO disminueixen el grau de vasodilatació, permeabilitat vascular i dolor local. D'altra banda, dosis per sobre de 2 Gy indueixen els efectes oposats. Aquests efectes podrien explicar l'eficàcia de la dosi baixa de RT pel tractament de la sinovitis, osteoartritis, peritendinitis i malalties

degeneratives que s'acompanyen d'inflamació de la membrana sinovial, infiltració limfocitària, infiltració leucocitària i hiperplàntia. El NO s'ha vist implicat en la patogènesi de l'artritis reumatoide, estant els nivells elevats en líquid sinovial de la malaltia.

Els macròfags són importants en l'alliberació de RIO durant la resposta inflamatòria (estrès oxidatiu). La RT-DB (0,3-0,6 Gy) disminueix l'estrès oxidatiu i en particular la producció de superòxid ¹⁴⁵, conclouent en aquest estudi que una disminució de l'alliberació de RIO podria contribuir als efectes terapèutics locals de la RT-DB ¹⁴⁵.

4.5.1.4. Factor Nuclear-Kappa B

Es coneixen més de 150 estímuls que poden activar el factor de transcripció NF-kB, incloent la RT, el TNF- α i el LPS. Existeix evidència de la implicació del NF-kB en la resposta inflamatòria provocada per la RT. D'altra banda, també s'ha vist que el NF-kB intervé en la RT-DB i en les seves propietats antiinflamatòries. Estudis previs mostren que l'activació de NF-kB és màxima amb dosi de 0,5 Gy en cèl·lules humanes ^{150, 152}. Existeix un estudi *in vitro* on es demostra que la RT-DB augmenta l'activació de NF-kB (màxima amb dosi de 0,5 Gy), en aquest estudi s'analitza els efectes de la RT-DB en el temps observant una disminució de l'adhesió a les 4 i 24 h i un augment a les 12 h, existint una correlació inversa amb l'activació de NF-kB, sent màxima a les 4 i 24 h i mínima a les 12 h ⁸. Existeix també un segon estudi *in vitro* on s'analitza l'activació de NF-kB en el temps, sent màxima a les 8, 24 i 36 h, i mínima a les 16 h ¹⁵⁰.

4.5.1.5. TGF- β_1

Un altre possible mecanisme que pot contribuir a l'efecte antiinflamatori de la RT-DB és l'augment de citocines antiinflamatòries, com el TGF- β_1 .

El TGF- β és una superfamília de polipèptids (TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3) multifuncionals que controlen el creixement i la diferenciació cel·lular ¹⁵³.

La citocina TGF- β_1 té efectes locals i sistèmics, pel qual la majoria de cèl·lules tenen receptors ¹⁵⁴. En teixits normals, l'efecte predominant del TGF- β_1 és una potent inhibició del creixement epitelial ^{155, 156}. D'altra banda, en resposta a un dany, aquest estimula la migració de fibroblasts, la proliferació i la producció de colagen, sent un factor clau en el desenvolupament de fibrosi i possiblement altres efectes de la RT ^{157, 158}. També té propietats immunosupressores ¹⁵⁹.

Diferents estudis evidencien el fet que el TGF- β pot tenir a la vegada efectes inhibitoris i estimulants sobre el sistema immune; s'ha vist que nivells augmentats de TGF- β pot ser beneficiós en diferents malalties autoimmunes o en trasplantament d'òrgans, aquest fet suposa que el TGF- β podria ser eficaç en el tractament o en la prevenció de determinades malalties ¹⁶⁰. En alguns casos, la forma activa del TGF- β promou efectes oposats en les mateixes cèl·lules, sent els mecanismes d'aquest efecte paradoxal encara desconeguts ¹⁶¹. Per exemple, *in vivo*, el TGF- β_1 aplicat localment promou l'adhesió, la infiltració i l'activació leucocitària, a través de la regulació i síntesi de receptors per integrines com la fibronectina i laminina ¹⁶². D'altra banda, el TGF- β_1 administrat sistèmicament té un

efecte oposat, inhibint l'adhesió i el reclutament leucocitari als llocs de la inflamació ¹⁶³ .

L'efecte modulador de TGF- β_1 sobre els fenòmens d'adhesió leucocitària ha estat establert tant per estudis *in vitro* com en animals d'experimentació.

En estudis *in vitro* s'ha observat que el TGF- β_1 inhibeix l'adhesió dels neutròfils i limfòcits a l'endoteli tant en condicions basals com després de l'estimulació amb TNF- α i IL-1, i reforça el concepte que el TGF- β perivascular té un paper antiinflamatori ^{164, 165} . Estudis posteriors dels mateixos autors, han suggerit que la inhibició de l'adhesió produïda per el TGF- β era a causa d'una disminució de l'expressió d'E-selectina, mentre que TGF- β no modificaria l'expressió de ICAM-1 ni VCAM-1 ¹⁶³ . En el context dels estudis d'aquesta tesi, aquest pot ser un efecte especialment rellevant ja que s'ha suggerit que la RT pot activar la forma latent del TGF- β_1 a la forma madura ¹⁶⁶ .

La importància funcional d'aquesta citocina en la disminució de l'adhesió s'ha demostrat bloquejant el TGF- β_1 amb anticossos neutralizants. Un estudi *in vitro* amb macròfags activats mostra que un augment d'expressió de TGF- β_1 contribueix a una disminució de l'adhesió de polimorfonuclears a les cèl·lules endotelials, sent aquest augment màxim amb dosi de 0,5 Gy; en aquest estudi el tractament amb anti-TGF- β_1 restaura l'adhesió ¹⁴⁴ . En un estudi *in vitro* que va tenir per objectiu caracteritzar l'efecte inhibidor de la RT-DB en el temps, es va observar una disminució de l'adhesió a les 4 i 24 h i un augment a les 12 h, existint una correlació inversa amb els nivells de TGF- β_1 que són mínims a les 12 h; la neutralització del TGF- β_1 va restaurar l'adhesió a les 4 i 24 h de la RT-DB, però no a les 12 h, i els autors van

concloure que l'augment d'adhesió objectivat a les 12 h no estava regulat pel TGF- β_1 ⁸.

4.5.2. Estudis *in vivo* (Taula 5)

Estudis experimentals *in vivo* usant models animals d'artritis (conills, rates) han observat una reducció en els paràmetres clínics de gravetat de l'artritis, i en alguns també en els canvis histològics inflamatoris amb dosi entre 0,5-1.5 Gy ^{4, 140, 167-169}.

El primer estudi realitzat valora l'efecte de la RT-DB sobre l'osteoartritis de genoll de conills induïda per electrocoagulació, en aquest estudi s'objectiva una millora dels símptomes clínics, dels signes inflamatoris i del dolor ¹⁷⁰⁻¹⁷².

En un altre estudi en què s'indueix una artritis de genoll en conills mitjançant una injecció intraarticular de granugenol, la RT-DB produeix una disminució de la proliferació inflamatòria de cèl·lules sinovials, també de la síntesi de fluid sinovial i de la tumefacció de l'articulació; la dosi de RT administrada era de 5 sessions setmanals de 1,5 Gy que s'iniciaven immediatament després de la inducció de l'artritis o 6 i 12 setmanes després, l'estudi es va realitzar a les 16 setmanes ¹⁶⁷.

L'efecte antiinflamatori de la RT-DB es confirma en un altre estudi experimental en el que s'indueix una artritis aguda en rates mitjançant una injecció intraarticular de mycobacterium tuberculosis o de zymosan. En aquest estudi l'administració de 4 sessions diàries de 1 Gy disminueix significativament els signes inflamatoris, la pèrdua òssia i la degradació del cartílag ^{5, 169}.

També en un model d'artritis de genoll en conills induïda mitjançant la injecció intraarticular de papaïna, l'administració de 1 Gy en 5 sessions diàries administrades després d'induir l'artritis produeix una disminució de la tumefacció i del volum de fluid articular ¹⁶⁸.

Dels estudis publicats no es poden extreure conclusions sobre la dosi total i el fraccionament més òptim. Amb la finalitat d'explorar la dosi mínima efectiva, el temps òptim i el millor esquema de fraccionament, en alguns d'aquests estudis *in vivo* s'analitza el temps d'eficàcia antiinflamatòria de la RT i es comparen diferents esquemes de tractament, on es veu una disminució dels paràmetres clínics d'artritis fins 15-19 dies després de la màxima resposta inflamatòria ⁴. També s'han caracteritzat els canvis histològics en el temps. Aquests estudis es basen en models animals on s'indueix una artritis, i s'administra RT-DB amb 5 sessions de 0,5 o 1 Gy durant la fase aguda de la inflamació (dies 15-19 després de la inducció). En aquests estudis es demostra una disminució dels signes inflamatoris i una millora en la histologia als 10-30 dies de la irradiació ^{4, 140}.

Un estudi en el qual s'irradiava l'extremitat inferior esquerra de conills amb RX (diferents energies de 90-400 kV) amb dosi que oscil·la de 0,1 a 10 Gy; va mesurar l'activitat fagocítica d'Estafilococ Aureus en les cèl·lules de sang perifèrica, objectivant-se un augment significatiu de l'activitat fagocítica 48 h després de 1 Gy (140 kV) i una disminució a dosis més altes, indicant que existeix un efecte sistèmic de la irradiació local sobre l'activitat cel·lular de sang perifèrica ¹⁷³.

En un altre estudi *in vivo* usant un model de malaltia granulomatosa, l'efecte antiinflamatori amb dosi de RT de 0,5 Gy es correlaciona amb la

disminució de l'activitat de iNOS i un augment de l'expressió d'hemoxygenasa-1 (HO-1) ¹³⁹. Aquesta relació recíproca de iNOS i HO-1 s'ha observat també en teixits d'artritis en rates després de la irradiació ¹⁴⁰.

Els resultats d'un estudi recent amb ratolins usant un estímul proinflamatori amb carragenina (model de càmera aèria dorsal superficial) mostra que la RT-DB (0,5-2 Gy) administrada a les 6 h de l'estímul, indueix un augment dels nivells de TGF- β_1 , sent màxim a les 24 h de la irradiació i disminueix progressivament fins a nivells basals a les 72 h; també indueix una disminució de citocines proinflamatòries com el TNF- α i interleucina-1 beta (IL-1 β) i de iNOS a les 24 i 48 h i un augment dels nivells de l'expressió d'HO-1 i *heat shock protein 70 induïble* (HSP70) ^{145, 174, 175}.

Per tant, els estudis *in vivo* confirmen el potencial efecte antiinflamatori de la RT-DB i alguns donen informació sobre la relació dosi-resposta i sobre els mecanismes moleculars que intervenen en aquest efecte. Els efectes antiinflamatoris no depenen de l'origen i tipus d'inflamació, això suggereix que la RT-DB afecta en els mecanismes inflamatoris bàsics i comuns a diversos processos inflamatoris ^{30, 143, 174}.

D'altra banda, no hi ha cap estudi *in vivo* en el qual s'estudii els efectes de la RT-DB en el procés inflamatori en el temps.

Taula 5. Resum dels estudis experimentals de la RT-DB

<u>Autor</u>	<u>Model experimental</u>	<u>Dosi/ Temps RT</u>	<u>Resultats</u>
Van Pannewitz 1933, 1970 ^{170, 172}	Artritis genoll conills (electrocoagulació)	1 Gy Diferent	↓ símptomes inflamació
Glenn 1946 ¹⁷³	Cama conills sans	0,1 a 10 Gy (90-400 kV) 24 h - 2 setmanes abans estudi	↑ índex fagocític a 1 Gy ↓ índex fagocític a dosi > 1 Gy
Budras 1986 ¹⁶⁷	Artritis genoll conill (injecció intraarticular granugenol)	1.5 Gy x 5, immediatament, 6 o 12 setmanes després injecció	↓ inflamació (↓ proliferació cel·lular a la membrana sinovial, ↓ fluid sinovial)
Trott 1995 ¹⁶⁹	Artritis genoll rates (injecció intraarticular de <i>Mycobacterium TBC</i>)	1 Gy x 4 (diari) / 5 Gy x 1 3 h després injecció	↓ inflamació (1 Gy x 4) (↓ tumefacció articular, ↓ destrucció cartílag i os)
Fischer 1994, 1998 ¹⁶⁸	Artritis genoll conill (injecció intraarticular de papaïna)	1 Gy x 5 (diari) 1 dia postinjecció	↓ inflamació (també en la histologia) (↓ diàmetre articular, ↓ gruix membrana sinovial, ↓ cèl·lules membrana sinovial)
Hildebrandt 1998 ¹³⁹	Malaltia granulomatosa ratolí	2 Gy dia 2 2 Gy dia 6 0,5 Gy x 5 des de dia 2 a dia 6	↓ inflamació (també en la histologia) ↓ iNOS i ↑ HO-1
Hildebrandt 2000, 2003 ^{140, 141}	Artritis genoll rates (<i>Mycobacterium TBC</i>)	1 Gy x 5, 0,5 Gy x 5 15-19 dies postinducció	↓ inflamació (també en la histologia) ↓ iNOS i ↑ HO-1
Liebmann 2004 ⁴	Artritis cama rates (<i>Mycobacterium TBC</i>)	1 Gy x 5 / 0,5 Gy x 5 10-26 dies postinducció	↓ inflamació (més efectiu 1 Gy x 5)
Schäue 2005 ¹⁷⁵	Model de càmera aèria dorsal superficial ratolí	0 a 5 Gy 6 h després inducció	↓ iNOS, ↑ HSP-70 i ↑ HO-1

iNOS, inducció enzim NO-sintetasa; HO-1, hemoxigenasa-1; HSP70, heat shock protein 70 induïble

5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Model experimental:

La metodologia experimental utilitzada en la realització d'aquesta tesi s'explica en els dos articles publicats, creient necessari ampliar les explicacions de la mateixa per facilitar-ne la comprensió.

Els animals d'experimentació utilitzats són ratolins de la soca C57BL/6 de 24-28 g.

Tècnica d'irradiació:

En els 2 estudis inclosos s'ha utilitzat la mateixa tècnica. Prèviament a la irradiació, els animals s'anestesien amb ketamina (Ketolar, Parke-Davis, Morris Plains, NJ) (150 mg/kg) i xilacina (Sigma Chemical, St Louis, MO) (7,5 mg/kg) subcutània. S'irradien 2 animals simultàniament col·locats en decúbit supí sobre una superfície plana de polimetilmetacrilat de 10 cm de gruix. Els límits de camp d'irradiació són el xifoides i les gònades. S'utilitza una superfície de 2 cm de poliestirè col·locada sobre els animals a fi i efecte d'aconseguir les condicions més aproximades a l'equilibri electrònic i homogeneïtzar la dosi d'irradiació. L'aparell d'irradiació és un accelerador lineal que produeix fotons de 6 MV amb una taxa de dosi de 2 Gy/min. La distància focus-superfície (DFS) és de 100 cm sobre el poliestirè (Figura 9). Les unitats de monitor a administrar s'han calculat mesurant una microcàmera de ionització (RX Scanditronix) col·locada dins d'un maniquí de poliestirè que té la mida d'un ratolí de 3 cm de gruix.

Quatre hores abans de l'estudi s'injecta als ratolins intraperitonealment 0,25 µg de lipopolisacàrid (LPS) de *Salmonella abortus equi* (Sigma Chemical, St

Louis, MO). En el primer estudi dosi-resposta s'han avaluat 3 dosis úniques: 0,1 Gy, 0,3 Gy, 0,6 Gy; l'estudi es realitza les 5 h de la irradiació. Després de determinar que la dosi amb més efecte antiinflamatori és de 0,3 Gy, la resta d'experiments d'aquest primer estudi es van fer amb aquesta dosi.

En el segon estudi de temps-resposta els animals s'han estudiat a les 5, 24, 48 i 72 h després de la RT (Figura 10).

El nombre d'animals per grup ha estat de sis a vuit.



Figura 9. Model experimental: tècnica d' irradiació abdominal.

Accelerador lineal: fotons de 6 MV

Taxa de dosi: 200 cGy/min

Dosi única: 0,1 Gy, 0,3 Gy, 0,6 Gy

Bolus de poliestirè: 2 cm

DFS: 100 cm

Camp: abdomen

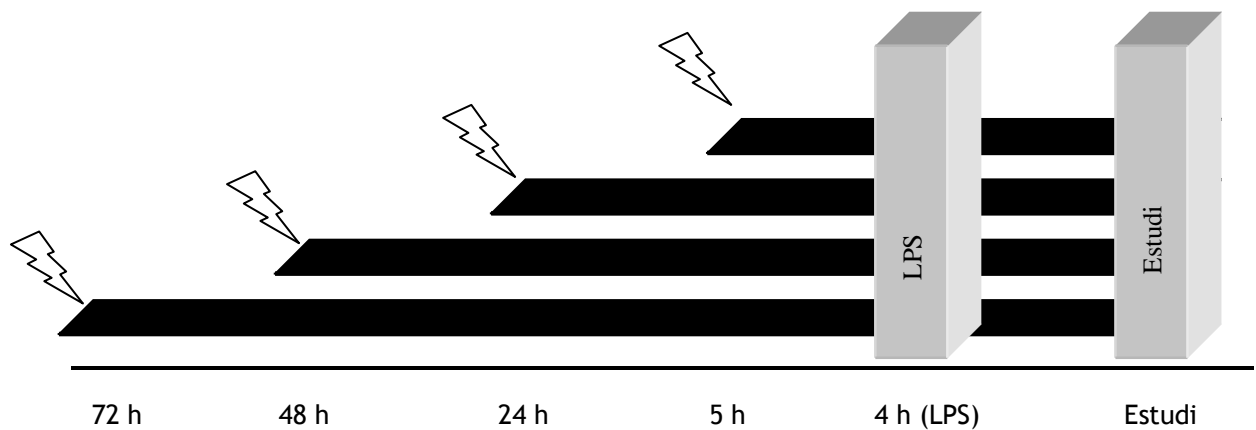


Figura 10. Els ratolins són irradiats amb dosi 0,3 Gy i s'estudien en els diferents temps. En tots els grups s'administra lipopolisacàrid (LPS) 4 h abans de l'estudi. S'estudien de sis a vuit animals per grup.

Microscopia intravital: avaluació de les interaccions leucòcit-endoteli a la microcirculació colònica *in vivo*

Una de les tècniques clau que s'utilitza en els estudis d'aquesta tesi és la microscopia intravital. Aquesta tècnica ens ha permès estudiar *in vivo* les interaccions leucòcit-endoteli (fonamentalment els fenòmens de rodament i adhesió leucocitària a l'endoteli) que es produeixen a la microcirculació colònica. La tècnica consisteix a practicar una incisió abdominal als ratolins prèviament anestesiats i exterioritzar el fragment de còlon que serà examinat en un microscopi invertit de fluorescència (Figura 11).

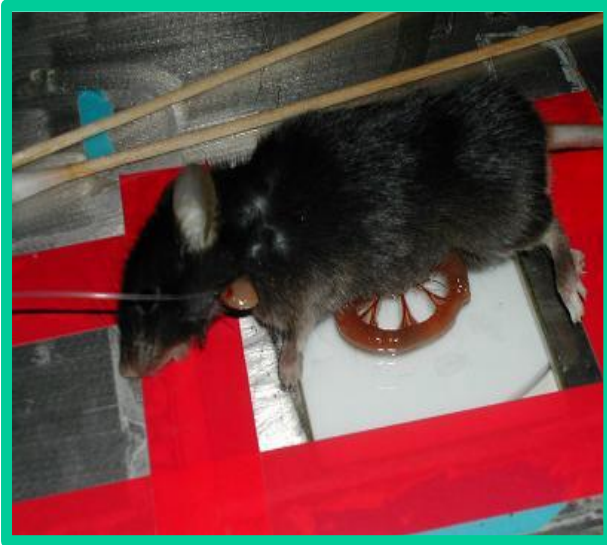


Figura 11. Ratolí anestesià amb el còlon exterioritzat. Preparació utilitzada en els experiments de microscopia intravital.

Es col·loca l'animal sobre una plataforma que s'ajusti al microscopi invertit, de manera que el fragment de còlon exterioritzat queda sobre una placa transparent, cosa que ens permetrà observar una àrea de 2 cm². Durant l'experiment, es controla la temperatura corporal de l'animal la qual es manté mitjançant una làmpada de llum infraroja entre 37.0 i 37.5 ° C. Atès que el gruix de la paret del còlon no permet l'estudi de la microcirculació colònica per transil·luminació, s'utilitza un microscopi de fluorescència i es marquen els leucòcits administrant a l'animal el fluorocrom rodamina 6G per via subcutània¹⁷⁶. Per visualitzar les imatges es fa a través d'una lent de 40x i d'una video-càmera acoblada al microscopi, la qual projecta les imatges en un monitor. Aquestes imatges es graven per ser analitzades posteriorment (Figures 12 i 13).

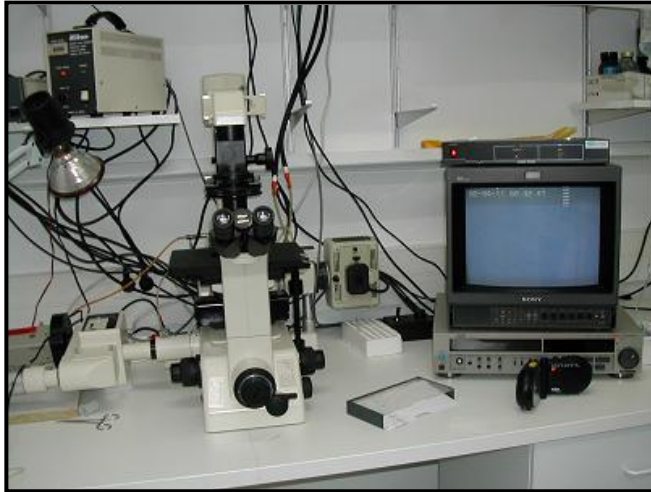


Figura 12. Microscopi invertit, càmera i projecció d'imatges al monitor.

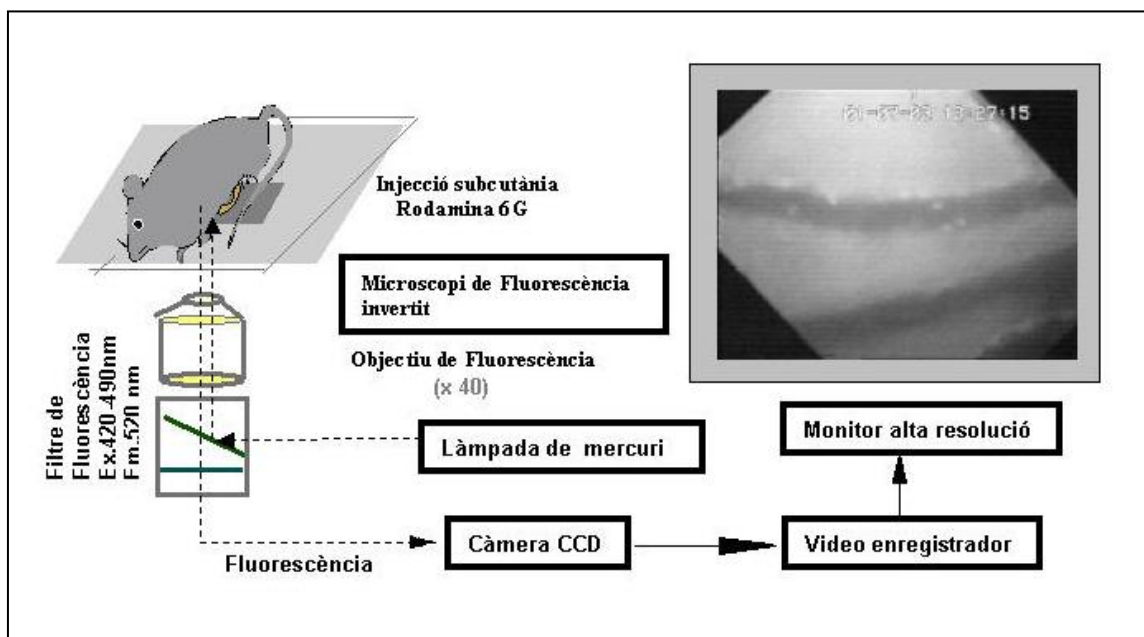


Figura 13. Gràfic representatiu de la tècnica de microscopia intravital del còlon.

A cada experiment es trien de 4 a 6 vènules de la submucosa i de la làmina pròpia del còlon amb un diàmetre intern de 25-40 μm i se'n determinen diferents paràmetres (Figura 14), els més rellevants són: el *nombre de leucòcits adherits* a l'endoteli (nombre de leucòcits immòbils durant més de

30 segons, en una porció de 100 µm de vènula); el *flux de leucòcits en rodament* (nombre de leucòcits que es mouen pel vas amb una velocitat reduïda respecte la resta del flux sanguini que travessen un punt determinat de la vènula, per minut); el *nombre de leucòcits en rodament* (estimació del nombre de cèl·lules amb fenòmens de rodament en un determinat moment); la *velocitat de rodament* (es calcula cronometrant el temps que triga un leucòcit en rodament en avançar 100 µm); la *velocitat mitjana venular* (es calcula aplicant la relació empírica $V_v = ffv/1,6$; sent ffv la velocitat mitjana dels leucòcits que es mouen lliurement a la velocitat del flux sanguini)¹⁷⁷, i el "*shear rate*" (o "*forces de dispersió*"), concepte que indica l'oposició que efectua el flux sanguini a les interaccions leucòcit-endoteli, i que està relacionat amb el diàmetre del vas i la velocitat mitjana venular; es calcula assumint la geometria cilíndrica del vas a través de la relació Newtoniana $\gamma = 8(V_v / d)$ ¹⁷⁸.

En el primer estudi, s'han estudiat mitjançant microscopia intravital les interaccions leucòcit-endoteli en els següents grups: 1) Basal; 2) LPS; 3) RT amb 0,1 Gy; 4) RT amb 0,3 Gy; 5) RT amb 0,6 Gy; 6) RT amb 0,1 Gy i LPS; 7) RT amb 0,3 Gy i LPS; 8) RT amb 0,6 Gy i LPS. En tots els grups l'estudi s'ha fet a les 5 h. El nombre d'animals per grup ha estat de 6 a 8.

En el segon estudi, s'ha estudiat els següents grups: 1) Basal; 2) LPS; 3) RT amb 0,3 Gy i estudiat a les 5 h després de la RT; 4) RT amb 0,3 Gy i estudiat a les 24 h; 5) RT amb 0,3 Gy i estudiat a les 48 h; 6) RT amb 0,3 Gy i estudiat a les 72 h; 7) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 5 h; 8) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 24 h; 9) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 48 h;

10) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 72 h. El nombre d'animals per grup ha estat de 6 a 8.

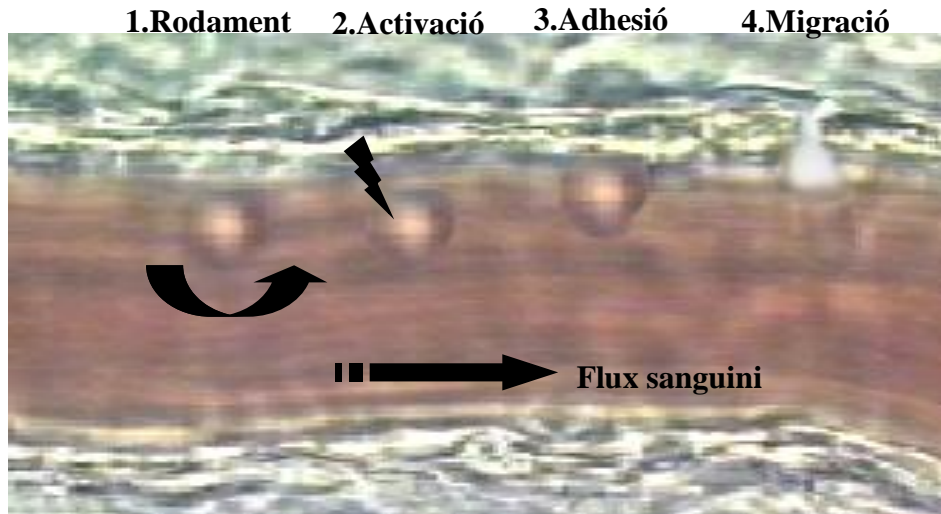


Figura 14. Imatge de microscopia intravital de fluorescència on es mostra la seqüència d'interaccions leucòcit-endoteli.

Quantificació de l'expressió endotelial de molècules d'adhesió *in vivo* amb la tècnica del doble anticòs marcat

L'estudi del grau d'expressió de CAMs a nivell de la superfície endotelial s'ha basat, fins fa pocs anys, en la realització d'estudis d'immunohistoquímica. No obstant, aquesta metodologia té diversos inconvenients. En primer lloc, no permet realitzar una quantificació precisa del grau d'expressió de les molècules i, en segon lloc, pot resultar poc sensible per apreciar variacions en l'expressió d'aquelles molècules que ja són presents a l'endoteli en condicions basals (expressió constitutiva), o bé de molècules l'expressió de les quals és relativament dèbil.

Amb l'objectiu de quantificar *in vivo* i de forma precisa l'expressió de molècules exposades a la superfície endotelial, el grup de recerca en el qual he realitzat aquesta tesi va desenvolupar la tècnica que coneixem com a "doble anticòs marcat" ⁹⁵. S'anestesia l'animal amb ketamina i xilacina subcutània. Es col·loca un catèter a la vena jugular interna on s'administra un anticòs monoclonal, dirigit contra la molècula a estudi ("binding"), marcat amb ¹²⁵I. Simultàniament, s'administra també un segon anticòs isotip, inert ("non-binding"), marcat amb ¹³¹I, que permetrà compensar el possible cúmul inespecífic d'anticòs, és a dir, per altres causes que no siguin la unió específica a la molècula d'interès incloent la difusió passiva o la unió a receptors Fc.

Cinc minuts després d'administrar ambdós anticòs, l'animal és exsanguinat (extracció de sang a través d'un catèter col·locat a l'artèria caròtida interna amb reposició simultània de volum a través de la vena jugular interna). A continuació es recullen els diferents òrgans i es pesen, i posteriorment es quantifica la radioactivitat acumulada (¹²⁵I i ¹³¹I) mitjançant una gammacàmera (Figura 15).

Aquesta tècnica s'ha utilitzat en el primer estudi per analitzar els efectes de la RT-DB en l'expressió de la molècula d'expressió ICAM-1, els grups d'estudi són els següents: 1) Basal; 2) LPS estudiat a les 4 h; 3) RT amb 0,3 Gy i estudiat a les 5 h; 4) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 5 h de la RT. El nombre d'animals per grup ha estat de 6.

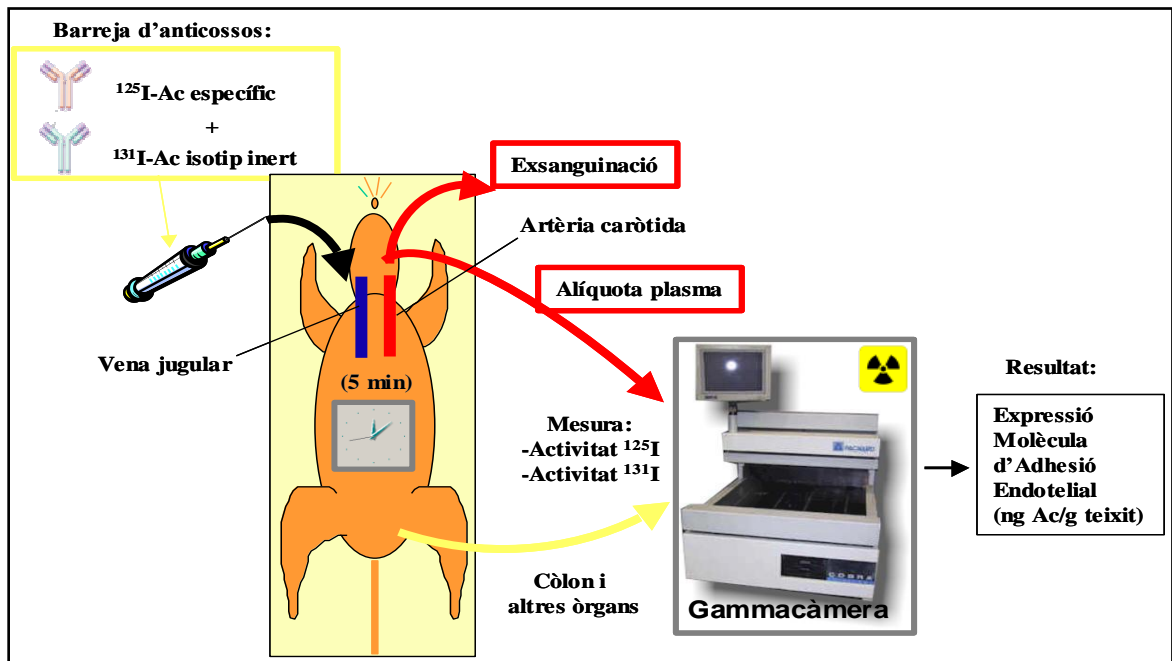


Figura 15. Gràfic representatiu del procediment seguit en la tècnica del doble anticòs marcat per tal de quantificar l'expressió de CAMs endotelials *in vivo*.

Finalment, l'expressió endotelial de l'anticòs monoclonal, expressat com ng d'anticòs per gram de teixit, s'obté utilitzant la següent fórmula:

Expressió d'una molècula d'adhesió endotelial (en ng d'anticòs / g teixit) =

$$\left[\frac{\text{cpm } ^{125}\text{I òrgan} / \text{g}}{\text{cpm } ^{125}\text{I injectat}} \times \frac{\text{cpm } ^{131}\text{I òrgan} / \text{g}}{\text{cpm } ^{131}\text{I injectat}} \times \frac{\text{cpm } ^{125}\text{I plasma}}{\text{cpm } ^{131}\text{I plasma}} \right] \times \text{ng Ac injectat}$$

De forma que:

cpm ^{125}I òrgan: Activitat del ^{125}I acumulat en un òrgan, quantificada en "comptes per minut" i mesurada mitjançant una gammacàmera.

cpm ^{131}I òrgan: Activitat del ^{131}I acumulat en un òrgan, quantificada en "comptes per minut" i mesurada mitjançant una gammacàmera.

cpm ^{125}I injectat: Activitat total del ^{125}I que es troba unit a l'anticòs específic que s'injecta per via endovenosa, quantificada en "comptes per minut" i mesurada mitjançant una gammacàmera (es calcula separant una alíquota de 3 μL de la barreja d'anticossos, abans que aquesta sigui injectada).

cpm ^{131}I injectat: Activitat total del ^{131}I que es troba unit a l'anticòs inespecífic o "non-binding" que s'injecta per via endovenosa, quantificada en "comptes per minut" i mesurada mitjançant una gammacàmera (es calcula separant una alíquota de 3 μL de la barreja d'anticossos, abans que aquesta sigui injectada).

cpm ^{125}I en plasma: Activitat ^{125}I residual que conté el plasma, un cop s'ha produït la unió de l'anticòs específic a la seva molècula diana (és a dir, 5 minuts després de l'administració endovenosa), quantificada en "comptes per minut" i mesurada mitjançant una gammacàmera (es calcula obtenint una mostra de 100 μL de plasma).

cpm ^{131}I en plasma: Activitat ^{131}I residual que conté el plasma 5 minuts després de l'administració endovenosa de l'anticòs inespecífic o "non-

binding", quantificada en "comptes per minut" i mesurada mitjançant una gammacàmera (es calcula obtenint una mostra de 100 µL de plasma).

ng Ac injectat: ng d'anticòs específic que s'injecten per via endovenosa.

Determinació nivells plasmàtics i producció intestinal de TGF- β_1

La determinació de nivells plasmàtics i a teixit intestinal de TGF- β_1 s'ha quantificat mitjançant ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) de R&D Systems. Els resultats s'expressen amb pg/mg de proteïna. Mitjançant punció cardíaca s'obté 1 mL de sang que es posa amb anticoagulant EDTA i se centrifuga 20 minuts a 1000 g. La determinació de la producció intestinal s'ha fet en 50 mg de teixit de còlon (proximal i distal) i s'ha cultivat a 37°C amb 5% CO₂ 24 h; posteriorment s'han recollit els sobrenadants i s'han congelat a -80°C per a l'anàlisi posterior.

En el primer estudi per a la determinació plasmàtica i en el segon estudi per valorar la producció intestinal de TGF- β_1 , els grups són els següents: 1) Basal; 2) LPS; 3) RT amb 0,3 Gy; 4) RT amb 0,3 Gy i LPS. En tots els grups s'han sacrificat els animals a les 5 h de la irradiació.

En el segon estudi per a la determinació plasmàtica, s'han estudiat els següents grups: 1) Basal; 2) LPS; 3) RT amb 0,3 Gy, estudiat a les 5 h ; 4) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 5 h; 5) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 24 h; 6) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 48 h; 7) RT amb 0,3 Gy i LPS, estudiat a les 72 h.

El nombre d'animals per grup ha estat de sis.

Immunoneutralització del TGF- β_1

Per poder determinar el possible rol del TGF- β_1 com a mediador dels efectes de la RT-DB en les interaccions leucòcit-endoteli, a un grup de ratolins s'ha administrat un anticòs bloquejant del TGF- β_1 1 h abans de la irradiació (0,3 Gy) i a les 5 h es realitza l'estudi mitjançant microscopia intravital.

Aquesta tècnica s'ha realitzat en el primer estudi amb els mateixos grups d'animals.

Recompte leucocitari

En tots els ratolins estudiats s'ha extret sang mitjançant punció cardíaca i s'ha fet el recompte leucocitari, de limfòcits i neutròfils mitjançant Sysmex SE-9000 hematocytometer (Toa Medical Electronics Co., Kobe, Japan).

El nombre de leucòcits s'ha expressat com a nombre absolut de cèl·lules ($\times 10^9$) per L de sang.

6. ARTICLES ORIGINALS

Article 1:

“Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice”.

Meritxell Arenas, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Víctor Hernández, Sandra

Jorcano, Albert Biete, Josep M. Piqué, Julián Panés.

Int J Rad Oncol Biol Phys, 66(2): 560-7, 2006.

BIOLOGY CONTRIBUTION

ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF LOW-DOSE RADIOTHERAPY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF SYSTEMIC INFLAMMATION IN MICE

MERITXELL ARENAS, M.D.,*[‡] FÈLIX GIL, B.A.,[†] MERITXELL GIRONELLA, PH.D.,[†]
VÍCTOR HERNÁNDEZ, M.D.,*[‡] SANDRA JORCANO, M.D.,* ALBERT BIETE, M.D.,*
JOSEP M. PIQUÉ, M.D.,[†] AND JULIÁN PANÉS, M.D.[†]

Departments of *Radiation Oncology and [†]Gastroenterology, Hospital Clínic de Barcelona, Institut de Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; and [‡]Department of Oncology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Tarragona, Spain

Purpose: The aim of this study was to determine the effects of low-dose radiotherapy (LD-RT) on the inflammatory response and to characterize the potential mechanisms underlying these effects.

Methods and Materials: Mice were irradiated with 0.1, 0.3, 0.6 Gy, or sham radiation before lipopolysaccharide (LPS) challenge. Leukocyte–endothelial cell interactions in intestinal venules were assessed using intravital microscopy. Intercellular adhesion molecule–1 (ICAM-1) expression was determined using radiolabeled antibodies 5 h after irradiation. Production of transforming growth factor– β_1 (TGF- β_1) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay and its *in vivo* functional relevance by immunoneutralization.

Results: Compared with vehicle treated animals, LPS induced a marked increase in leukocyte adhesion (0.13 ± 0.59 vs. 5.89 ± 1.03 , $p < 0.0001$) in intestinal venules. The number of adherent leukocytes was significantly reduced by the 3 doses of LD-RT tested; the highest inhibition was observed with 0.3 Gy (0.66 ± 1.96 , $p < 0.0001$). LPS-induced ICAM-1 upregulation was not modified by LD-RT. Circulating levels of TGF- β_1 were significantly increased in response to LD-RT in controls and LPS challenged animals. Neutralization of TGF- β_1 partially restored LPS-induced adhesion (4.83 ± 1.41 , $p < 0.05$).

Conclusions: LD-RT has a significant anti-inflammatory effect, inhibiting leukocyte recruitment, which is maximal at 0.3 Gy. This effect results in part from increased TGF- β_1 production and is not related to modulation of ICAM-1 expression. © 2006 Elsevier Inc.

Low-dose radiotherapy, Leukocyte, Endothelium, Adhesion molecules, Transforming growth factor– β_1 .

INTRODUCTION

Low-dose radiotherapy (LD-RT) has been applied to the treatment of a variety of human inflammatory conditions including Graves' ophthalmopathy, periarthropathia humeroscapularis, epicondylopathia humeri, painful refractory plantar heel spur, or osteoarthritis of various joints, as well as inflammation-related complications such as prevention of heterotopic ossification and prophylaxis of vascular restenosis (1–6). Although clinical efficacy of LD-RT in these circumstances has been shown in several studies, there is scarce information regarding the optimal treatment strategy to be used, and individual studies have applied doses that vary in a wide range from 0.3 to 4 Gy per session, with total doses ranging between 3 and 40 Gy (4, 7–10). No dose–response study to determine the optimal dose of LD-RT for treatment of inflammation has been undertaken in human beings so far. Two experimental studies comparing doses of

0.5 and 1 Gy for the treatment of arthritis in rats indicate that the dose of 0.5 is equal to (11) or more effective than (12) 1 Gy, but the effect of lower doses has not been evaluated. This may be especially relevant, considering that the main factor limiting the use of LD-RT for treatment of inflammatory conditions is its potential adverse events, which would be considerably reduced by using lower doses of radiotherapy.

Another factor that has restrained the application of LD-RT for treatment of inflammatory conditions in clinical practice is the scarce knowledge of its mechanisms of action. Experimentally, this aspect has only been approached by *in vitro* studies, which indicate that the process of leukocyte adhesion to endothelial cells may be affected by LD-RT (13–19). However, this has not been tested *in vivo*.

The development of an inflammatory response is a finely regulated process that involves sequential leukocyte–

Reprint requests to: Julián Panés, M.D., Gastroenterology Department, Hospital Clínic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel: (+34) 932275418; Fax: (+34) 932279387; E-mail: jpanes@clinic.ub.es

Supported by Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant

SAF2002-02211, and Grant C03/02 from the Instituto de Salud Carlos III.

Received March 8, 2006, and in revised form June 4, 2006. Accepted for publication June 6, 2006.

endothelial cell interactions (namely, leukocyte rolling, activation, firm adhesion, and emigration into the surrounding tissue) and that is governed by the action of inflammatory mediators and adhesion molecules. Previous studies indicated that intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) has a central role in the process of leukocyte recruitment into the intestine in response to variety of proinflammatory stimuli including ischemia-reperfusion and sepsis, as blockade of this adhesion molecule with antibodies or genetic ablation of ICAM-1 in mice has been shown to reduce markedly the inflammatory response and organ damage in these conditions (20). One of the endogenous factors with a potent effect on modulation of inflammation is transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). We have previously shown that endogenous production of TGF- β_1 is a main contributing factor to limit recruitment of immune cells in tumoral microvasculature (21). In addition, previous evidence from *in vitro* studies suggests that increased production of this cytokine in response to LD-RT may also reduce leukocyte adhesion to endothelial cells that is induced by interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (19, 22).

The main objectives of the current study were: (1) to characterize the dose-response effect of LD-RT *in vivo*; (2) to find the lowest effective dose of radiotherapy in this model, and (3) to determine its potential mechanisms of action, particularly in regard to whether the process of leukocyte recruitment is affected and whether it is dependent on modulation of adhesion molecule expression or production of anti-inflammatory cytokines.

METHODS AND MATERIALS

Animal model and radiation procedure

Male C57BL/6 mice weighing 24 to 28 g were obtained from Iffa Credo (Lyon, France). Principles of laboratory animal care (based on EC guideline 86/609/CEE), as well as the guidelines and procedures for animal experiments from the Generalitat de Catalunya, were followed.

Before irradiation, mice were anesthetized with subcutaneous (s.c.) ketamine 150 mg/kg (Ketolar, Parke-Davis, Morris Plains, NJ) and xylazine 7.5 mg/kg (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Abdominal irradiation was performed with a linear accelerator producing 6 MV photons at a focus-to-surface distance of 100 cm. Radiation was delivered at dose rate of 2.0 Gy/min. Tissue-equivalent bolus was placed on both sides of the irradiated tissue to ensure electronic build-up. One hour after irradiation, mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 0.25 μ g of lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella abortus equi* (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or vehicle. All studies were performed 5 h after irradiation. This time point was chosen based on previous evidence showing a maximal upregulation of ICAM-1 between 5 and 9 h after LPS challenge in most organs, including heart and intestine (23). In an initial dose-response study, 3 different radiation doses were tested: 0.1, 0.3, and 0.6 Gy. After determining that the dose with the highest anti-inflammatory effect was 0.3 Gy, the rest of the experiments were performed using this dose.

Intravital microscopy

Intravital microscopy was used to quantify adhesion and rolling of leukocytes to endothelial cells in colonic submucosal and lamina propria venules. Mice were anesthetized with s.c. ketamine (150 mg/kg) and xylazine (7.5 mg/kg). Throughout the experiments, rectal temperature was monitored using an electrothermometer and was maintained between 36.5° and 37.5°C with an infrared heat lamp. A midline abdominal incision was made to allow exteriorization of a segment of the colon to be chosen for microscopy examination and was covered with cotton gauze soaked with bicarbonate buffer.

Mice were then placed on an adjustable microscope stage, and the colon was extended over a nonautofluorescent coverslip that allows observation of a 2-cm² segment of tissue. An inverted microscope (Diaphot 300; Nikon, Tokyo, Japan) with a CF Fluor $\times 40$ objective lens (Nikon) was used. A charge-coupled device camera (model XC-77; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) with a C2400 charge-coupled device camera control unit and a C2400-68 intensifier head (Hamamatsu Photonics), which was mounted on the microscope, projected the image onto a color monitor (Trinitron KX-14CP1; Sony, Tokyo, Japan). Images were recorded using a videocassette recorder (SR-S368E; JVC, Tokyo, Japan) for off-line analysis. A video date-time generator (Panasonic Digital AV Mixer WJ-AVE55; Matsushita Communication Industrial, Tokyo, Japan) displays these parameters on recorded and live images. Leukocytes were labeled *in vivo* by s.c. injection of rhodamine-6G (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands) as previously described (24). Rhodamine-6G-associated fluorescence was visualized by epi-illumination at 510 to 560 nm using a 590-nm emission filter. Single unbranched submucosal and lamina propria venules with internal diameters (ID) ranging between 25 and 40 μ m were selected for observation. Venular ID was measured on-line using a video caliper (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, TX). The flux of rolling leukocytes, leukocyte rolling velocity, number of adherent leukocytes, venular blood flow, and venular wall shear rate were determined off-line during playback of videotaped images. A leukocyte was considered to be adherent to the vessel wall if it was stationary for >30 s and the results were expressed as the number of adherent cells per 100 μ m length of venule. Rolling leukocytes were defined as those white blood cells that move at a velocity less than that of free-flowing leukocytes in the same vessel. The flux of rolling leukocytes was measured as the number of rolling cells that passed a fixed point within a small (10- μ m) viewing area of the vessel in a 1-min period. Leukocyte rolling velocity was calculated as the mean of 10 rolling leukocyte velocities and expressed in μ m/s. Venular blood flow was estimated from the mean of the velocity of 3 free-flowing leukocytes, using the empiric relationship: Venular Blood Flow = Free-Flowing Leukocytes/1.6 (25). Venular wall shear rate was calculated assuming cylindrical geometry and using the Newtonian definition $\gamma = 8$ (Venular Blood Flow/Diameter) (26). In each mouse, 3 to 5 random venules were examined, and results were calculated as the mean of each parameter in all venules examined.

For intravital microscopy assessments the following groups of animals were studied: (1) nonirradiated treated with vehicle; (2) nonirradiated treated with LPS; (3) irradiated with 0.1 Gy treated with vehicle; (4) irradiated with 0.3 Gy treated with vehicle; (5) irradiated with 0.6 Gy treated with vehicle; (6) irradiated with 0.1 Gy treated with LPS; (7) irradiated with 0.3 Gy treated with LPS; (8) and irradiated with 0.6 Gy treated with LPS. Six animals per group were studied.

Quantification of ICAM-1

Mice were anesthetized with s.c. ketamine (150 mg/kg) and xylazine (7.5 mg/kg), and the right carotid artery and right jugular vein were cannulated. The mAb used for *in vivo* assessment of ICAM-1 expression was YN1/1.7.4 (scaled up and purified at Pharmacia/Upjohn Laboratories, Kalamazoo, MI), a murine IgG2b against murine ICAM-1 (27). The control immunoglobulin used was UPC-10, a nonbinding murine IgG2 (Sigma Química, Madrid, Spain). The binding mAb directed against ICAM-1 was labeled with ^{125}I , whereas the nonbinding mAb (UPC-10) was labeled with ^{131}I (Amersham Ibérica, Madrid, Spain) (28). Radioiodination of mAbs was performed by the iodogen method (24). Labeled mAbs were stored at 4°C and used within 3 weeks after the labeling procedure. The specific activity of labeled mAbs was approximately 0.5 mCi/mg.

To measure endothelial ICAM-1 expression, a mixture of 10 μg of ^{125}I -YN1/1.7.4 and 40 μg unlabeled YN1/1.7.4, and 10 μg of ^{131}I -UPC was given through the jugular vein catheter. The dose of anti-ICAM-1 has been shown to be saturating under stimulated conditions in previous assays (29). Blood samples were obtained through the carotid artery catheter 5 min after injection of the mAb mixture. Thereafter, the animals were heparinized (1 mg/kg sodium heparin i.v.) and rapidly exsanguinated. Entire organs were then harvested and weighted. ^{125}I (binding mAb) and ^{131}I (non-binding mAb) activities in each organ and in 100- μl aliquots of cell-free plasma were counted in a Cobra II γ -counter (Packard; Meriden, Canberra, Australia), with automatic correction for background activity and spillover. The injected activity in each experiment was calculated by counting a 5- μl sample of the mixture containing the radiolabeled mAb. The accumulated activity of mAb in an organ was expressed as nanograms of binding antibody per gram of tissue. The formula used to calculate ICAM-1 expression has been previously described (30).

For assessment of the effects of radiation on ICAM-1 expression the following groups of animals were studied: (1) nonirradiated treated with vehicle; (2) nonirradiated treated with LPS; (3) irradiated with 0.3 Gy treated with vehicle; and (4) irradiated with 0.3 Gy treated with LPS. Six animals per group were studied.

Peripheral blood leukocyte counts

Blood was collected using a syringe with anticoagulant. Blood samples were obtained from all groups of mice at the time of the study, and the total leukocyte count was determined in a Sysmex SE-9000 hemocytometer (Toa Medical Electronics Co., Kobe, Japan).

Measurement of TGF- β_1 production

Plasma levels of TGF- β_1 were quantified in protein extracts from blood by using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) supplied by R&D Systems (Minneapolis, MN). Results were expressed in picograms per milligram of protein. For that purpose, 1 ml of blood was obtained from each mouse by cardiac puncture. Results are expressed in picograms per milligram of serum.

The following groups of animals were included in this part of the study: (1) nonirradiated treated with vehicle; (2) nonirradiated treated with LPS; (3) irradiated with 0.3 Gy treated with vehicle; and (4) irradiated with 0.3 Gy treated with LPS. For each group six animals were studied. From each group, five to six animals were studied.

Effects of TGF- β_1 immunoneutralization

To determine the possible role of TGF- β_1 as a mediator of the effects of radiation on leukocyte-endothelial cell interactions, groups of animals were treated with a saturating dose of a blocking mAb against TGF- β_1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) (1 mg/kg i.p.) or a nonbinding control antibody. Treatment with the antibodies was administered 1 h before irradiation with 0.3 Gy, and 1 h after irradiation animals were administered LPS. Leukocyte-endothelial cell interactions were assessed by intravital videomicroscopy 5 h after irradiation.

Statistical analysis

All data were analyzed using analysis of variance with Bonferroni as a post-hoc multiple comparison test, and Student's paired or unpaired test where appropriate. All values are reported as mean \pm standard error of the mean. Statistical significance was set at values of $p < 0.05$.

RESULTS

Peripheral blood leukocyte counts

In this study, radiotherapy as well as administration of LPS modified peripheral blood leukocyte counts, causing leucopenia and lymphopenia. Compared with the nonirradiated, vehicle-treated group ($4.20 \pm 1.13 \times 10^9/\text{L}$), animals irradiated with 0.6 Gy induced a significant reduction in peripheral blood leukocyte counts ($1.63 \pm 0.22 \times 10^9/\text{L}$, $p < 0.05$), whereas lower doses of irradiation did not significantly alter the number of circulating leukocytes (0.1 Gy: $2.70 \pm 0.73 \times 10^9/\text{L}$; 0.3 Gy: $2.80 \pm 0.73 \times 10^9/\text{L}$; $p = ns$). Treatment with LPS also induced a significant reduction in peripheral leukocyte counts ($1.33 \pm 0.18 \times 10^9/\text{L}$; $p < 0.05$ vs. nonirradiated, vehicle-treated animals), which was not significantly influenced by previous treatment with irradiation (0.1 Gy: $2.06 \pm 0.49 \times 10^9/\text{L}$; 0.3 Gy: $2.64 \pm 0.29 \times 10^9/\text{L}$; 0.6 Gy: $1.13 \pm 0.18 \times 10^9/\text{L}$). As irradiation or treatment with LPS or both induced significant changes in the number of circulating leukocytes (which might potentially influence the number of cells recruited into an area of inflammation), results of intravital microscopy studies are corrected by the number of circulating cells.

Leukocyte-endothelial cell interactions in colonic venules after LD-RT

Leukocyte adhesion

Administration of LPS induced a significant increase in leukocyte adhesion compared with baseline conditions (Fig. 1a). Previous treatment with irradiation at the 3 doses tested resulted in a marked reduction in the number of adherent leukocytes in intestinal venules. The dose of 0.3 Gy was most effective, completely abrogating leukocyte adhesion in response to LPS, whereas doses of 0.1 Gy and 0.6 Gy significantly reduced the number of adherent leukocytes; but this number was still significantly higher than that of the non-LPS-challenged group of mice. Direct comparison of the number of adherent leukocytes between the different doses of irradiation in LPS-challenged mice demonstrated that

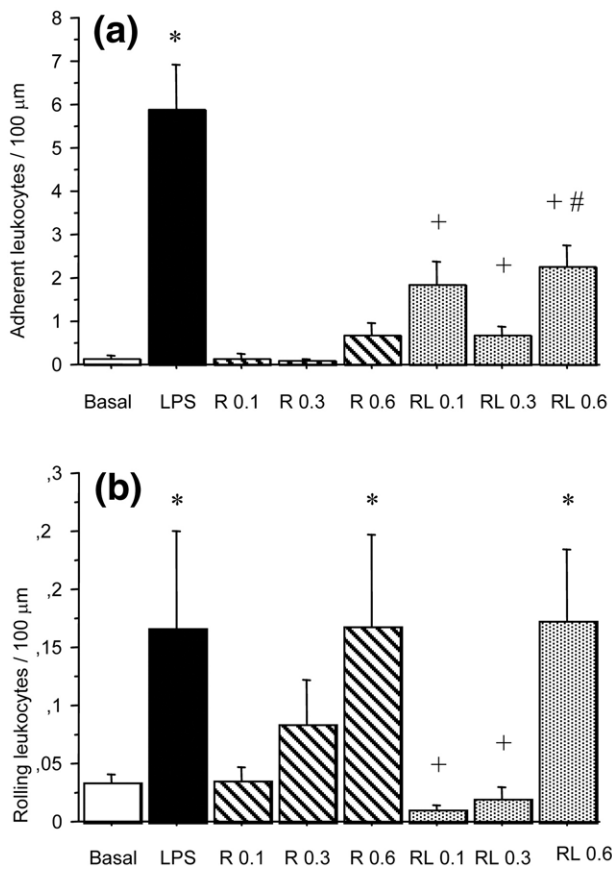


Fig. 1. Dose-response study of the effects of low-dose radiotherapy (LD-RT) on leukocyte-endothelial cell adhesion (a) and rolling interactions (b) in colonic venules. The following groups were studied: basal conditions, lipopolysaccharide (LPS) challenged, irradiated with 0.1, 0.3, 0.6 Gy (R 0.1, R 0.3, R 0.6), and irradiated mice challenged with LPS (RL 0.1, RL 0.3, RL 0.6) ($n = 6$ in each group). Radiation induced a decrease in LPS-induced leukocyte adhesion for all doses studied, and the maximum effect was observed with 0.3 Gy. Doses of 0.3 and 0.1 Gy induced also a decrease in the number of rolling leukocytes. $+p < 0.05$ vs. nonirradiated LPS, $*p < 0.05$ vs. control, $\#p < 0.05$ compared with irradiated with 0.3 Gy challenged with LPS.

irradiation with 0.3 Gy had an inhibitory effect that was significantly greater than with 0.6 Gy (Fig. 1a).

In the absence of LPS-challenge, radiation at the doses used in this study did not induce any change in the number of leukocytes adherent to the venular wall compared with baseline conditions (control: 0.13 ± 0.05 adherent leuko-

cytes/100 μm ; radiation 0.1 Gy: 0.14 ± 0.11 adherent leukocytes/100 μm ; radiation 0.3 Gy: 0.08 ± 0.03 adherent leukocytes/100 μm ; radiation 0.6 Gy: 0.66 ± 0.27 adherent leukocytes/100 μm).

Calculation of the adhesion response without correction for peripheral leukocyte count did not change any of these results (data not shown).

Leukocyte rolling and microhemodynamics in colonic venules

In non-LPS-challenged animals, irradiation with 0.1 Gy or 0.3 Gy did not induce significant changes in the number of rolling leukocytes, but irradiation with 0.6 Gy was associated with a significant increase in the number of rolling leukocytes (Fig. 1b).

Administration of LPS was followed by a significant increase in the number of rolling leukocytes in nonirradiated animals. The increment in the number of rolling leukocytes was completely abrogated by irradiation with 0.1 or 0.3 Gy before LPS challenge. In contrast, irradiation with 0.6 Gy did not have any effect on the increment in leukocyte rolling induced by LPS (Fig. 1b).

As detailed in Table 1, radiation with 0.3 Gy, but not with 0.1 Gy or 0.6 Gy, induced a significant increase in venular dispersal forces measured as shear rate, which was dependent on a significant increase in venular blood flow. In LPS-challenged animals, radiation with 0.3 Gy also produced a significant increase in shear rate and venular blood flow relative to that in nonirradiated animals.

Mechanistic studies on the anti-inflammatory effects of LD-RT on adhesion molecule expression

Upregulation of ICAM-1 is central to the process of leukocyte recruitment in response to LPS, and we studied whether the reduction of leukocyte adhesion in irradiated animals was related to changes in ICAM-1 expression. Because the dose of 0.3 Gy of irradiation had the maximal anti-inflammatory effect, the effects of irradiation on ICAM-1 expression were examined using this dose only. (See first section of Results and Fig. 1a).

Measurement of ICAM-1 expression in intact animals, using the radiolabeled antibody technique, demonstrated that LPS induced a marked upregulation of ICAM-1 expression. The increase in ICAM-1 expression induced by LPS was not significantly reduced by irradiation with 0.3 Gy

Table 1. Effects of irradiation and lipopolysaccharides (LPS) on venular blood flow ($\mu\text{m/s}$) and shear rate (s^{-1})

	Control	LPS	RT			RT + LPS		
			0.1 Gy	0.3 Gy	0.6 Gy	0.1 Gy	0.3 Gy	0.6 Gy
Venular blood flow ($\mu\text{m/s}$)	803 ± 77	635 ± 43	1041 ± 0	$1173 \pm 99^*$	904 ± 184	633 ± 97	$982 \pm 171^*$	647 ± 102
Shear rate (s^{-1})	268 ± 20	255 ± 20	395 ± 0	$471 \pm 52^{*\dagger}$	292 ± 58	232 ± 51	$363 \pm 53^*$	258 ± 29

Abbreviation: RT = radiation treatment.

* $p < 0.05$ vs LPS-challenged mice.

$\dagger p < 0.05$ vs control mice.

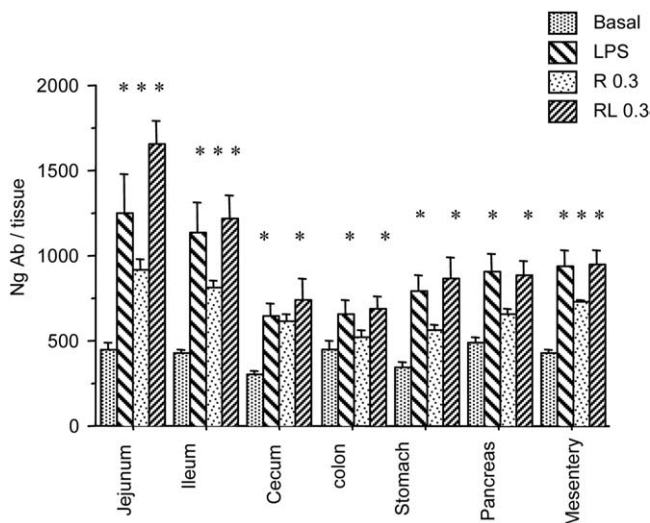


Fig. 2. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in splanchnic organs in mice. Upregulation of ICAM-1 expression induced by lipopolysaccharide (LPS) was not significantly altered by pre-treatment with radiation with 0.3 Gy (RL 0.3). In some organs, this low radiation dose induced an increase in ICAM-1 expression (R 0.3). Results are expressed as ng Ab/g tissue. * $p < 0.05$ vs. baseline.

before LPS challenge in any of the abdominal organs studied including jejunum, ileum, cecum, colon, stomach, pancreas, and mesentery (Fig. 2). In fact, radiation with 0.3 Gy in the absence of LPS induced a significant increase in ICAM-1 expression in jejunum, ileum, and mesentery, without modifying the expression of this adhesion molecule in cecum, colon, stomach, or pancreas (Fig. 2).

Role of TGF- β_1 production

Based on previous *in vitro* observations suggesting that TGF- β_1 may be involved in downregulation of the leukocyte recruitment in response to LD-RT, we determined whether radiation with 0.3 Gy induced changes in TGF- β_1 production. Interestingly, we observed that this dose of irradiation was associated with a significant 2.5-fold increase in circulating plasma levels of TGF- β_1 in mice, and that this marked increment in TGF- β_1 after irradiation also occurred in mice after challenge with LPS (Fig. 3).

To determine whether this increment in TGF- β_1 production is a mediator of the reduced leukocyte adhesion that occurs in irradiated animals after LPS challenge, additional groups of animals were studied after pretreatment with a blocking anti-TGF- β_1 antibody or a nonbinding control antibody. Immunoblockade of TGF- β_1 was followed by a significant 4.8-fold increment in the number of adherent leukocytes, although this number remained lower than in the nonirradiated group challenged with LPS (Fig. 4a). By contrast, treatment with a nonbinding control antibody had no effect on the reduction in leukocyte adhesion afforded by irradiation with 0.3 Gy.

The reduction in the number of rolling leukocytes associated with treatment with LD-RT before LPS was attenu-

ated by the anti-TGF- β_1 antibody. Although in animals treated with anti-TGF- β_1 this number increased fivefold relative to the nonbinding antibody-treated group, these differences did not reach statistical significance (Fig. 4b). Nonetheless, the number of rolling leukocytes in the group treated with anti-TGF- β_1 was no longer significantly reduced relative to nonirradiated animals challenged with LPS.

DISCUSSION

This study demonstrates for the first time in intact animals that LD-RT has a potent anti-inflammatory effect, and also provides novel information on the dose-response relationship and molecular mechanisms underlying this action.

The current study shows that radiation with doses of 0.1, 0.3, or 0.6 Gy significantly reduce LPS-induced leukocyte adhesion in intestinal venules, and that the dose with a more potent effect is 0.3 Gy. The reduction in leukocyte firm adhesion in response to irradiation with 0.1 and 0.3 Gy, may be at least in part related to the profound decrease in the number of rolling leukocytes in intestinal venules in animals pretreated with these doses of irradiation. However, irradiation with 0.6 Gy, which did not significantly reduce the number of rolling leukocytes in animals challenged with LPS, had also a significant effect reducing leukocyte adhesion, indicating that other mechanisms, in addition to reduced recruitment of rolling cells, are involved the modulation of an acute inflammatory response by radiation. Changes in dispersal forces in venules where leukocyte recruitment occurs are not likely to play a significant role in the reduction of leukocyte adhesion. Although irradiation with 0.3 Gy significantly increased shear rate, other doses of radiation also affording a significant anti-inflammatory effect did not modify shear rate. In any case, mean shear rate values in all studied groups remained $>250 \text{ s}^{-1}$, and at these levels artificial leukocyte adhesion does not occur (31).

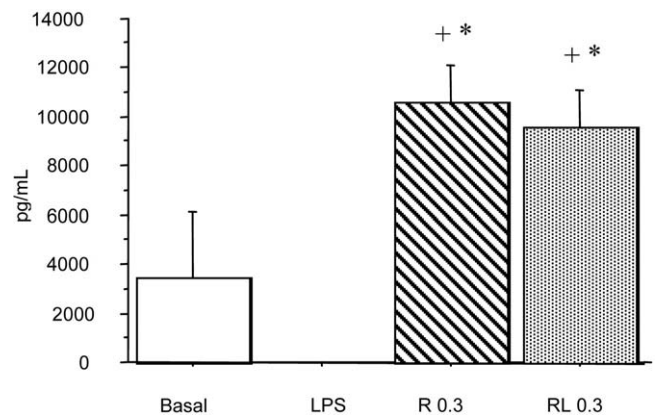


Fig. 3. Circulating levels of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in mice. Circulating TGF- β_1 , which was undetectable in most lipopolysaccharide (LPS) challenged animals, were significantly increased in response to treatment with radiation with 0.3 Gy, both in animals challenged later with LPS (RL 0.3) and those not given LPS (R 0.3). + $p < 0.05$ vs. nonirradiated LPS, * $p < 0.05$ vs. control.

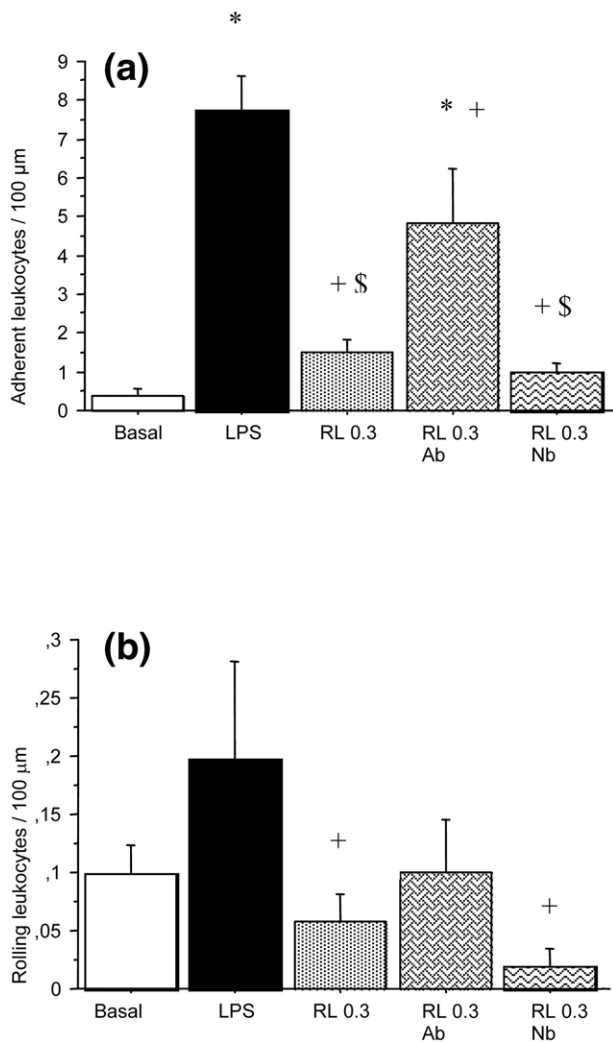


Fig. 4. Leukocyte adhesion (a) and rolling (b) in intestinal venules: effects of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) blockade. Increased leukocyte adhesion in response to lipopolysaccharide (LPS) is abrogated by treatment with 0.3 Gy radiation (RL 0.3). The adhesive response is partially restored treatment with an anti-TGF- β_1 antibody (RL 0.3 Ab), but is not affected by treatment with a control nonbinding antibody (RL 0.3 Nb). LPS-induced rolling interactions are also partially restored by treatment with an anti-TGF- β_1 antibody. + $p < 0.05$ vs. nonirradiated LPS, * $p < 0.05$ vs. control, \$ $p < 0.05$ vs. RL 0.3 Ab.

Reduction in the number of circulating leukocytes could also potentially affect the absolute number of leukocytes that adhere to a particular venule in response to inflammatory stimuli. In the conditions of the current study, only the dose of 0.6 Gy induced a significant reduction of circulating leukocytes. This effect has also been observed in human studies in which total body irradiation with 0.1 Gy, 2 to 3 times per week is administered (32). However the reduction in the number of circulating leukocytes does not seem to be the reason for the reduction in adhesion in our study because radiation doses of 0.1 and 0.3 Gy, which did not produce leucopenia, significantly reduced adhesion, and the reduction of leukocyte adhesion in response to radiation remained

significant when the results were corrected by the number of circulating leukocytes.

To explore further the mechanistic basis of the anti-inflammatory effect of LD-RT, we investigated the effect of radiation on ICAM-1 expression, as this is a key molecule mediating adhesion in response to LPS (33). As has been previously reported (23), we observed that LPS induces a significant increase in ICAM-1 expression, but upregulation of ICAM-1 was not affected by irradiation to any extent. This observation is in keeping with the results of *in vitro* studies in which IL-1-induced (17) or TNF- α -induced (14) leukocyte adhesion to cultured endothelial cells was significantly reduced by radiation 0.1 to 0.6 Gy without modifying the stimulated expression of ICAM-1. Other *in vitro* studies have reported a reduction in the expression of E-selectin (14) after treatment with LD-RT, which may have contributed to the reduced rolling of leukocytes associated with irradiation with 0.1 or 0.3 Gy in the current study.

A previous *in vitro* study suggested that TGF- β_1 is a key mediator of the anti-inflammatory effect of radiation (19, 22). Roedel *et al.* showed that an increased expression of TGF- β_1 contributed to reduce adhesion of peripheral blood mononuclear cells to cultured endothelial cells. The authors demonstrated that TGF- β_1 expression was maximally increased after irradiation with 0.5 Gy, and that this dose provided the highest inhibitory effect on cell adhesion. We have also previously shown the potential inhibitory role of TGF- β_1 on LPS induced leukocyte recruitment in an *in vivo* system (21). In the current study we demonstrate that production of TGF- β_1 increased in response to irradiation, and that this increment in TGF- β_1 after irradiation also occurred in mice after challenge with LPS. Compelling proof of the involvement of TGF- β_1 in inhibition of LPS-induced adhesion was provided by immunoblockade experiments, showing that treatment with an anti-TGF- β_1 antibody significantly attenuated the inhibitory effect of irradiation on leukocyte adhesion. However, restoration of the adhesion response was not complete after treatment with the anti-TGF- β_1 antibody, suggesting that other mechanisms may also participate in the anti-inflammatory effects of LD-RT. Among these, increased production of IL-10, reduction in iNOS upregulation, or enhanced apoptosis may play a role (16, 17, 34, 35).

An interesting observation of the current study, which is concordant with results of *in vitro* studies, is that the radiation dose with a more potent anti-inflammatory effect was 0.3 Gy, with 0.6 Gy having significantly lower effect in terms of reduction of leukocyte adhesion. This is in keeping with the results of *in vitro* studies showing a reduction in the inflammatory response with radiation doses of 0.1 to 0.5 Gy, but contrasts with the radiation doses used so far in human beings for treatment of osteoarthritis, which have been in the range of 0.3 to 1.5 Gy (total dose: 3–12 Gy).

Numerous studies have shown a close correlation between inhibition of leukocyte recruitment and attenuation of the inflammatory damage in various organs including the intestine (30), brain (36), and heart (37).

CONCLUSION

In conclusion, the results of this *in vivo* study, along with evidence from cellular studies, indicate that LD-RT may have a role in the treatment of inflammatory condi-

tions in human beings, and that adequately controlled clinical studies using lower doses of radiation (e.g., 0.1 or 0.3 Gy) are necessary, in an attempt both to maximize the anti-inflammatory effect and to minimize toxicity.

REFERENCES

- Crocker I. Radiation therapy to prevent coronary artery restenosis. *Semin Radiat Oncol* 1999;9:134–143.
- Lo TC. Radiation therapy for heterotopic ossification. *Semin Radiat Oncol* 1999;9:163–170.
- Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Martus P, *et al.* Prevention of heterotopic ossification about the hip: Final results of two randomized trials in 410 patients using either preoperative or postoperative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;39:161–171.
- Seegenschmiedt MH, Katalinic A, Makoski HB, *et al.* Radiotherapy of benign diseases: A pattern of care study in Germany. *Strahlenther Onkol* 1999;175:541–547.
- Seegenschmiedt MH, Katalinic A, Makoski H, *et al.* Radiation therapy for benign diseases: Patterns of care study in Germany. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:195–202.
- Tripuraneni P, Giap H, Jani S. Endovascular brachytherapy for peripheral vascular disease. *Semin Radiat Oncol* 1999;9:190–202.
- Micke O, Seegenschmiedt MH. Consensus guidelines for radiation therapy of benign diseases: A multicenter approach in Germany. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:496–513.
- Micke O, Seegenschmiedt MH. Radiotherapy in painful heel spurs (plantar fasciitis)—results of a national patterns of care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:828–843.
- Keilholz L, Seegenschmiedt MH, Kutzki D, *et al.* Periarthritis humeroscapularis (PHS). Indications, technique and outcome of radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 1995;171:379–384.
- Keilholz L, Seegenschmiedt H, Sauer R. Radiotherapy for painful degenerative joint disorders. Indications, technique and clinical results. *Strahlenther Onkol* 1998;174:243–250.
- Hildebrandt G, Radlingmayr A, Rosenthal S, *et al.* Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. *Int J Radiat Biol* 2003;79:993–1001.
- Liebmann A, Hindemith M, Jahns J, *et al.* Low-dose X-irradiation of adjuvant-induced arthritis in rats. Efficacy of different fractionation schedules. *Strahlenther Onkol* 2004;180:165–172.
- Hildebrandt G, Seed MP, Freemantle CN, *et al.* Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. *Int J Radiat Biol* 1998;74:367–378.
- Hildebrandt G, Maggiorella L, Rodel F, *et al.* Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 2002;78:315–325.
- Hildebrandt G, Loppnow G, Jahns J, *et al.* Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by low-dose X-irradiation in vitro. Is there a time dependence? *Strahlenther Onkol* 2003;179:158–166.
- Kern P, Keilholz L, Forster C, *et al.* In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *Int J Radiat Biol* 1999;75:995–1003.
- Kern PM, Keilholz L, Forster C, *et al.* Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro. *Radiother Oncol* 2000;54:273–282.
- Rodel F, Kamprad F, Sauer R, *et al.* Functional and molecular aspects of anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 2002;178:1–9.
- Rodel F, Schaller U, Schultze-Mosgau S, *et al.* The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation. *Strahlenther Onkol* 2004;180:194–200.
- Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066–1090.
- Bessa X, Elizalde JI, Mitjans F, *et al.* Leukocyte recruitment in colon cancer: Role of cell adhesion molecules, nitric oxide, and transforming growth factor beta₁. *Gastroenterology* 2002;122:1122–1132.
- Roedel F, Kley N, Beuscher HU, *et al.* Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta₁-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int J Radiat Biol* 2002;78:711–719.
- Panés J, Perry MA, Anderson DC, *et al.* Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 1995;269:1955–1964.
- Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramine. *Biochem Biophys Res Commu* 1978;80:849–856.
- Davis MJ. Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical Doppler velocimeter. *Microvasc Res* 1987;34:223–230.
- Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ Res* 1978;43:738–749.
- Kumasaka T, Quinlan WM, Doyle NA, *et al.* Role of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice. *J Clin Invest* 1996;97:2362–2369.
- Bickel U, Kang YS, Yoshikawa T, *et al.* In vivo demonstration of subcellular localization of anti-transferrin receptor monoclonal antibody-colloidal gold conjugate in brain capillary endothelium. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1493–1497.
- Gironella M, Molla M, Salas A, *et al.* The role of P-selectin in experimental colitis as determined by antibody immunoblockade and genetically deficient mice. *J Leukoc Biol* 2002;72:56–64.
- Sans M, Panés J, Ardite E, *et al.* VCAM-1 and ICAM-1 mediate leukocyte-endothelial cell adhesion in rat experimental colitis. *Gastroenterology* 1999;116:874–883.
- Perry MA, Granger DN. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *J Clin Invest* 1991;87:1798–1804.
- Durelli L, Ferrio MF, Urgesi A, *et al.* Total body irradiation for myasthenia gravis: A long-term follow-up. *Neurology* 1993;43:2215–2221.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, *et al.* Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9238–9242.

34. Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Sheikholvaezin A, *et al.* Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation. *Cancer* 2002;94:1210–1214.
35. Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Johansson A, *et al.* Apoptosis in HeLa Hep2 cells is induced by low-dose, low-dose-rate radiation. *Radiat Res* 2002;158:634–640.
36. Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, *et al.* Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 2006;113:2105–2112.
37. Kakkar AK, Lefer DJ. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:154–158.

Article 2:

“Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: correlation with TGF- β ₁ expression”.

Meritxell Arenas, Fèlix Gil, Meritxell Gironella, Víctor Hernández, Albert

Biete, Josep M. Piqué, Julián Panés.

Rad Oncol, 86: 399-406, 2008.

Radiation modified anti-inflammation

Time course of anti-inflammatory effect of low-dose radiotherapy: Correlation with TGF- β_1 expression

Meritxell Arenas^{a,d}, Fèlix Gil^b, Meritxell Gironella^b, Víctor Hernández^{a,d}, Albert Biete^a,
Josep M. Piqué^{b,c}, Julián Panés^{b,c,*}

^aDepartment of Radiation Oncology, and ^bDepartment of Gastroenterology, Hospital Clínic de Barcelona, University of Barcelona, Spain, ^cCIBER-EHD, and ^dDepartment of Oncology, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Tarragona, Spain

Abstract

Background and Purpose: Low-dose radiotherapy (LD-RT) has a potent anti-inflammatory effect, and transforming growth factor (TGF)- β_1 is a potential mediator of this effect. The objectives of this study were to characterize the *in vivo* effects of LD-RT on leukocyte recruitment over time, and its relationship with TGF- β_1 production.

Materials and methods: Mice were submitted to abdominal irradiation with a dose of 0.3 Gy, or to sham radiation and studied 5, 24, 48 or 72 h after irradiation. Four hours before the study a proinflammatory stimulus consisting of LPS or placebo was administered. Leukocyte–endothelial cell interactions in intestinal venules were assessed using intravital microscopy. Circulating levels and intestinal tissue production of TGF- β_1 were determined.

Results: Compared to non-irradiated LPS-challenged group, the number of adherent leukocytes was significantly reduced 5, 24 and 48 h, but not 72 h after irradiation in LPS-challenged mice. Rolling leukocytes were significantly decreased at all time points analyzed. Plasma TGF- β_1 levels were increased 5 and 24 h after irradiation. Increased intestinal production during this period was corroborated by *in vitro* culture experiments.

Conclusions: LD-RT has a sustained inhibitory effect on leukocyte recruitment for 48 h, which is initially associated with an increase in TGF- β_1 intestinal production.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. Radiotherapy and Oncology 86 (2008) 399–406.

Keywords: Low-dose radiotherapy; Time-course; Leukocyte; Endothelium; TGF- β_1

Low-dose radiotherapy (LD-RT) has been used in the clinical setting for the treatment of benign chronic inflammatory diseases and acute inflammatory disorders, the most common indication being painful degenerative joint disorders [1–5]. Radiation doses in clinical use are commonly in the range of 5–6 \times 0.5–1 Gy, two to three times a week, often applied as two series separated by an interval of 6–8 weeks [2].

Evidence for a prolonged inhibitory effect of LD-RT on components of the inflammatory response came first from cellular studies showing reduced leukocyte adhesion to endothelial cells for periods up to 48 h after irradiation [6–8]. The anti-inflammatory effects of LD-RT in terms of amelioration of inflammatory lesions seem also to be long-lasting as evidenced in *in vivo* experimental studies showing reduced histological severity of arthritis as long as 30 days after irradiation with LD-RT for 5 consecutive time days. However, the effects of LD-RT over time on the process of inflammatory cell recruitment have not been characterized,

and this information is crucial for the design of effective schedules of dose fractionation.

The development of an inflammatory response is a finely regulated process that involves sequential leukocyte–endothelial cell interactions, namely leukocyte rolling, activation, firm adhesion, and emigration into the surrounding tissue, and is governed by the action of inflammatory mediators and adhesion molecules. One of the endogenous factors with a potent effect on modulation of inflammation is transforming growth factor (TGF)- β_1 . We recently reported the efficacy of LD-RT (0.1, 0.3, 0.6 Gy) in experimental model of systemic inflammation in mice. LD-RT caused a significant reduction of leukocyte adhesion in this model and we found that the dose of radiotherapy with maximum inhibitory effect was 0.3 Gy. Immunoneutralization studies showed a key role of TGF- β_1 in the inhibition of leukocyte recruitment following LD-RT [9].

The main objectives of the current study were to characterize the time-dependent effect of LD-RT *in vivo*, and to

investigate the correlation with the levels of TGF- β_1 at different time points after irradiation in the same experimental model.

Methods and materials

Animal model and radiation procedure

Male C57BL/6 mice weighting 24–28 g were obtained from Iffa Credo (Lyon, France). Principles of laboratory animal care (EC guideline 86/609/CEE), as well as the guidelines and procedures for animal experiments from the Generalitat de Catalunya, were followed.

Before irradiation, mice were anesthetized with subcutaneous (s.c.) ketamine (Ketolar, Parke-Davis, Morris Plains, NJ) (150 mg/kg) and xylazine (Sigma Chemical, St. Louis, MO) (7.5 mg/kg). Abdominal irradiation was performed with a linear accelerator producing 6MV photons at a focus-to-surface distance of 100 cm. Radiation was delivered at dose rate of 2.0Gy/min. Tissue-equivalent bolus was placed on both sides of the irradiated tissue to ensure electronic build-up. A total single dose of 0.3Gy was delivered to the abdominal region, from the xyphoid to the pubis. Three animals were irradiated at a time, in the supine position, with a field size of 14 × 4 cm. Sham control animals were submitted to the same anesthesia and instrumentation but not irradiated. Radiation control animals were irradiated but not challenged with LPS. The study groups consisted of mice irradiated and injected intraperitoneally (i.p.) with 0.25 μ g of lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella abortus equi* (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), or vehicle 4 h before the study. Mice were studied 5, 24, 48 or 72 h after irradiation (Fig. 1).

Intravital microscopy

Intravital microscopy was used to quantify rolling and adhesion of leukocytes to endothelial cells in colonic submucosal and lamina propria venules. Mice were anesthetized with s.c. ketamine (150 mg/kg) and xylazine (7.5 mg/kg). Throughout the experiments, rectal temperature was monitored using an electrothermometer, and maintained between 36.5 and 37.5 °C with an infrared heat lamp. A midline abdominal incision was made to allow exteriorization of a segment of the colon to be chosen for microscopy

examination, and covered with a cotton gauze soaked with bicarbonate buffer.

Mice were then placed on an adjustable microscope stage, and the colon was extended over a non-autofluorescent coverslip that allows observation of a 2 cm² segment of tissue. An inverted microscope (Diaphot 300; Nikon, Tokyo, Japan) with a CF Fluor 40× objective lens (Nikon) was used. A charge-coupled device (CCD) camera (model XC-77; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) with a C2400 CCD camera control unit and a C2400-68 intensifier head (Hamamatsu Photonics), mounted on the microscope, projected the image onto a color monitor (Trinitron KX-14CP1; Sony, Tokyo, Japan), and the images were recorded using a videocassette recorder (SR-S368E; JVC, Tokyo, Japan) for off-line analysis. A video date-time generator (Panasonic Digital AV Mixer WJ-AVE55; Matsushita Communication Industrial, Tokyo, Japan) displays these parameters on recorded and live images. Leukocytes were *in vivo* labeled by s.c. injection of rhodamine-6G (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) as previously described [10]. Rhodamine-6G-associated fluorescence was visualized by epi-illumination at 510–560 nm, using a 590 nm emission filter. Single unbranched submucosal and lamina propria venules with internal diameters (ID) ranging between 25 and 40 μ m were selected for observation. Venular ID was measured on-line using a video caliper (Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, Texas). The flux of rolling leukocytes, leukocyte rolling velocity, number of adherent leukocytes, venular blood flow and venular wall shear rate were determined off-line during playback of videotaped images. A leukocyte was considered to be adherent to the vessel wall if it was stationary for more than 30 s and the results were expressed as the number of adherent cells per 100 μ m length of venule. Rolling leukocytes were defined as those white blood cells that move at a velocity less than that of free-flowing leukocytes in the same vessel. The flux of rolling leukocytes was measured as the number of rolling leukocytes that passed a fixed point within a small (10 μ m) viewing area of the vessel in a 1 min period. Leukocyte rolling velocity was calculated as the mean of 10 rolling leukocyte velocities and expressed in μ m/s. Venular blood flow was estimated from the mean of the velocity of 3 free-flowing leukocytes, using the empirical relationship: *Venular Blood Flow = Free-Flowing*

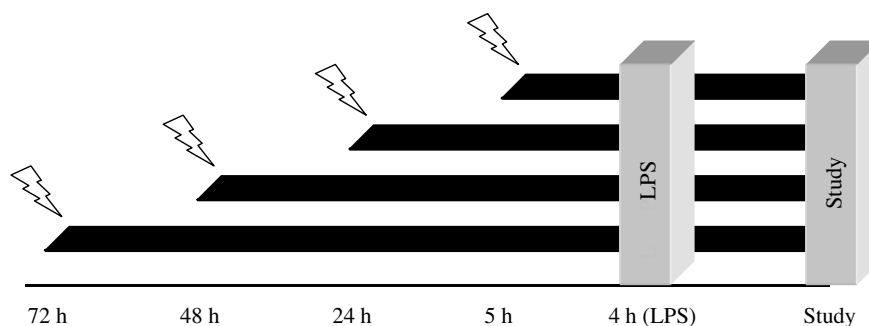


Fig. 1. Animals received irradiation with 0.3Gy or sham irradiation, and were studied at various time points after radiation. All groups were challenged with lipopolysaccharide (LPS) 4 h before being studied. Six animals per group were studied.

Leukocyte velocity/1.6 [11]. Venular wall shear rate was calculated assuming cylindrical geometry and using the Newtonian definition $\gamma = 8$ (*Venular Blood Flow/Diameter*) [12]. In each mouse, 3 to 5 random venules were examined, and results were calculated as means of each parameter in all venules examined.

For intravital microscopy assessments the following groups of animals were studied: (1) non-irradiated treated with vehicle; (2) non-irradiated treated with LPS; (3) irradiated with 0.3 Gy and studied 5 h after irradiation; (4) irradiated with 0.3 Gy and studied 24 h after irradiation; (5) irradiated with 0.3 Gy and studied 48 h after irradiation; (6) irradiated with 0.3 Gy and studied 72 h after irradiation; (7) irradiated with 0.3 Gy treated with LPS, and studied 5 h after irradiation; (8) irradiated with 0.3 Gy treated with LPS, and studied 24 h after irradiation; (9) irradiated with 0.3 Gy treated with LPS, and studied 48 h after irradiation; (10) irradiated with 0.3 Gy treated with LPS, and studied 72 h after irradiation. Six to eight animals per group were studied.

Peripheral blood leukocyte counts

Blood samples were obtained from all groups of mice at the time of the study, and the total leukocyte count and differential leukocyte counts were determined in a Sysmex SE-9000 hemocytometer (Toa Medical Electronics Co., Kobe, Japan). Differential distribution of leukocytes was expressed as absolute number of cells ($\times 10^9$ per L) of blood.

Measurement of plasma cytokine levels

Plasma levels and colon tissue levels of TGF- β_1 were quantified in protein extracts from blood or colon tissue by using commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) supplied by R&D Systems. For that purpose one mL of blood obtained by cardiac puncture was collected on ice using EDTA as anti-coagulant and centrifuged for 20 min at 1000g. An additional centrifugation of the supernatant was performed at 10,000g for 10 min at 4 °C for complete platelet removal. Samples were activated to the immunoreactive form by adding 40 μ L of 2.5 N acetic acid/10 M urea and incubated for 10 min at room temperature. The acidified sample was neutralized by adding 25 L of 2.7 N NaOH/1 M HEPES. Samples were stored at -20 °C until the time of the assay. Results were expressed in pg/mg of protein.

Intestinal production of TGF- β_1 in intestinal tissue

To directly assess intestinal production of TGF- β_1 in response to irradiation, groups of (1) non-irradiated mice treated with vehicle; (2) non-irradiated mice treated with LPS; (3) mice irradiated with 0.3 Gy and (4) mice irradiated with 0.3 Gy and treated with LPS following the schedules previously described were sacrificed 5 h after irradiation. Samples of colon weighing approximately 50 mg (proximal and distal) were cultured at 37 °C with 5% CO₂ for 24 h. At the end of the culture period, supernatants were recovered and frozen at -80 °C for later analysis.

The concentration of TGF- β_1 in culture supernatant was determined by sandwich ELISA following the manufacturer's directions (R&D Systems). Results are expressed as pg TGF- β_1 per mg of colonic tissue.

Statistical analysis

Multiple group comparisons were performed using the Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney test to assess inter-group differences, and Student's paired or unpaired test where appropriate. All values are reported as means \pm standard error of the mean. Statistical significance was set at *p* value less than 0.05.

Results

Peripheral blood leukocyte counts

As shown in Table 1, irradiation with 0.3 Gy induced a transient decrease in the number of total circulating leukocytes 24 h after irradiation in comparison with the vehicle-treated sham irradiated group, whereas at all other time points (5, 48 and 72 h after irradiation) this number was similar to that of the control group. Radiotherapy induced a transient reduction in the number of circulating lymphocytes at 24 h after irradiation. By contrast, the number of circulating neutrophils was significantly reduced across all time points of the study (Table 1). Administration of LPS in non-irradiated animals induced a significant reduction in peripheral leukocyte counts in respect to the control group, with reductions in both lymphocyte and neutrophil counts (Table 1).

Treatment with LD-RT 5 h before the study time point prevented the reduction in peripheral leukocyte counts induced by LPS, but did not attenuate the reduction in leukocyte counts when the period between irradiation and the study time point was prolonged beyond 5 h (Table 1). As TGF- β_1 , a key mediator of the anti-inflammatory effects of LD-RT, has been shown to exert differential effects on lymphocytes and neutrophils [13], we assessed the differential peripheral blood leukocyte counts in animals challenged with LPS pre-treated or not with LD-RT. LPS administration induced a significant reduction in the number of circulating neutrophils and lymphocytes. Pretreatment with radiation at any of the time points tested did not significantly alter LPS-induced reduction in the differential counts of these individual cell types (Table 1). Red blood cell and platelet counts were not significantly altered.

Leukocyte–endothelial cell interactions in colonic venules following LD-RT

Leukocyte adhesion

The number of adherent leukocytes under baseline conditions (0.11 ± 0.05 leukocytes/100 μ m) was not significantly modified by irradiation with 0.3 Gy at any of the time points of the study (5 h: 0.33 ± 0.13 ; 24 h: 0.06 ± 0.06 ; 48 h: 0.08 ± 0.05 ; or 72 h: 0.029 ± 0.02 leukocytes/100 μ m). Administration of LPS in sham irradiated animals induced a significant increase in the number of adherent leukocytes to intestinal venules (6.02 ± 0.79 leukocytes/100 μ m) compared to baseline conditions (Fig. 2). Irradiation with 0.3 Gy resulted in a significant inhibition of LPS-induced leukocyte adhesion for those groups of animals studied 5 h (1.06 ± 0.51 leukocytes/100 μ m, $p < 0.0001$), 24 h ($2.37 \pm$

Table 1
Effects of low-dose radiotherapy (0.3Gy) and lipopolysaccharide (LPS) on the number of peripheral blood leukocyte, lymphocyte and neutrophil counts

	Control			LPS			RT			RT + LPS		
	5 h	24 h	48 h	5 h	24 h	48 h	5 h	24 h	48 h	5 h	24 h	48 h
Leukocyte counts ($\times 10^9/L$)	3.78 \pm 1.06	1.33 \pm 0.13 ⁺	2.8 \pm 0.59	1.35 \pm 0.33 ⁺	3.43 \pm 0.67	2.7 \pm 0.47	2.37 \pm 0.36	0.70 \pm 0.084 ⁺	1.083 \pm 0.22 ⁺	1.11 \pm 0.14 ⁺		
Lymphocyte counts ($\times 10^9/L$)	2.93 \pm 1.02	0.46 \pm 0.07 ⁺	1.56 \pm 0.39	0.66 \pm 0.35 ⁺	2.34 \pm 0.56	1.8 \pm 0.44	1.24 \pm 0.27 ⁺	0.30 \pm 0.032 ⁺	0.46 \pm 0.08 ⁺	0.43 \pm 0.07 ⁺		
Neutrophil counts ($\times 10^9/L$)	0.25 \pm 0.13	0.067 \pm 0.02 ⁺	0.08 \pm 0.05 ⁺	0.05 \pm 0.02 ⁺	0.07 \pm 0.01 ⁺	0.04 \pm 0.02 ⁺	0.1 \pm 0.05 ⁺	0.02 \pm 0.02 ⁺	0.05 \pm 0.02 ⁺	0.03 \pm 0.02 ⁺		

Abbreviation: RT, radiotherapy.

⁺ $p < 0.05$ vs. control.

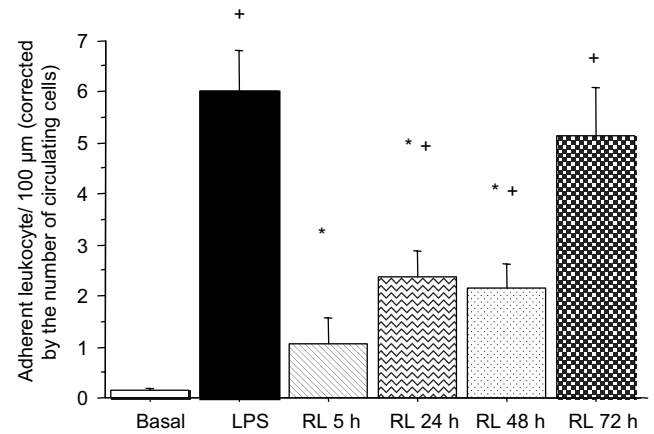


Fig. 2. Time-course of the effects of low-dose radiotherapy (LD-RT) on leukocyte–endothelial cell adhesion in colonic venules. The following groups were studied: non-irradiated control animals (Basal), lipopolysaccharide (LPS) challenged and irradiated mice (0.3Gy) challenged with LPS and studied 5, 24, 48 or 72 h after irradiation (RL) ($n = 6$ in each group). Radiation induced a decrease in LPS-induced leukocyte adhesion after 5, 24 and 48 h ($p < 0.05$). The values were corrected by the number of circulating cells. * $p < 0.05$ vs. non-irradiated LPS; ⁺ $p < 0.05$ vs. control.

0.51 leukocytes/100 μm , $p < 0.0001$) or 48 h (2.14 ± 0.47 leukocytes/100 μm , $p < 0.0001$) after irradiation. This inhibitory effect was lost in the group studied 72 h after irradiation (5.13 ± 0.96 leukocytes/100 μm , p : n.s.).

Since treatment with LPS induced significant changes in the number of circulating leukocytes, which might potentially influence the number of cells recruited into an inflamed area, results of intravital microscopy studies were calculated as absolute numbers and also as values corrected by the number of circulating cells. Even when the number of adherent leukocytes was corrected according to the number of circulating cells, the difference in number of adherent leukocytes between sham irradiated animals and those treated with 0.3Gy radiation was no longer significant at 72 h, whereas differences remained significant for the rest time points (Fig. 2).

Leukocyte rolling

The number of rolling leukocytes under baseline conditions (4.61 ± 0.97 leukocytes/100 μm) was not significantly modified by irradiation with 0.3Gy at any on the time points of the study (5 h: 7.6 ± 2 ; 24 h: 3.4 ± 1.1 ; 48 h: 2.2 ± 0.95 ; or 72 h: 5.34 ± 1.55 leukocytes/100 μm).

Administration of LPS was followed by a significant increase in the number of rolling leukocytes in non-irradiated animals. The increment in the absolute number of rolling leukocytes was completely abrogated after abdominal irradiation at all time points studied ($p < 0.05$); when the number of rolling leukocytes was corrected by the number of circulating leukocytes, the significant reduction of rolling leukocytes was maintained at all time points (Fig. 3).

Microhemodynamics in colonic venules

As detailed in Table 2, challenge with LPS did not significantly induce changes in venular blood flow, or venular

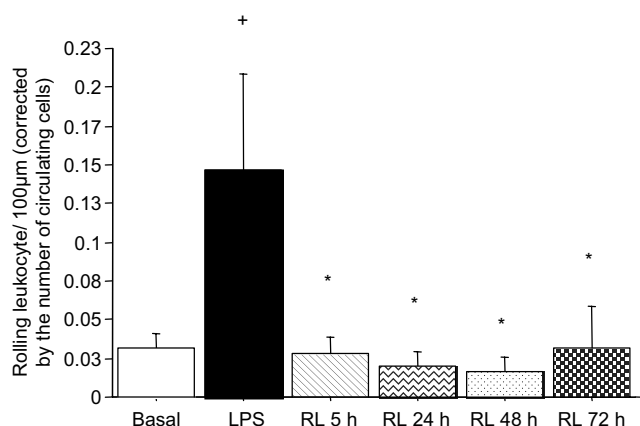


Fig. 3. Effects of low-dose radiotherapy (LD-RT) on lipopolysaccharide (LPS)-induced leukocyte rolling in colonic venules at various time points after irradiation ($n = 6$ per group). LD-RT significantly reduced the number of rolling leukocytes after challenge with LPS at all time points studied. Values were corrected by the number of circulating cells. * $p < 0.05$ vs. non-irradiated LPS; + $p < 0.05$ vs. control.

shear rate when venules of similar diameter were studied. In groups pre-treated with irradiation 0.3Gy at different interval periods before LPS challenge, no significant changes were observed in these parameters when compared with LPS treated animals that had not received prior radiation therapy.

Role of TGF- β_1

Based on immunoneutralization studies previously performed by our group showing a key role of TGF- β_1 as a mediator of LD-RT inhibition of the inflammatory response [9], we determined the relationship between circulating TGF- β_1 levels and leukocyte adhesion response over time. We corroborate that LD-RT induces a marked increase in TGF- β_1 levels, and this increment is maintained over a period of 24 h after LD-RT (Fig. 4). In later time points studied (48 and 72 h), plasma levels of TGF- β_1 were no longer significantly elevated compared to the LPS-challenged group not pretreated with LD-RT (Fig. 4).

Culture studies using intestinal tissue samples from control mice, LPS-treated mice, irradiated mice, and mice submitted to irradiation before LPS challenge confirm that radiotherapy induced the production of TGF- β_1 at intestinal level. As shown in Fig. 5, treatment with LPS alone did not significantly alter TGF- β_1 production in respect to control tissue samples, whereas irradiation induced a significant twofold increase in TGF- β_1 levels. Interestingly, in the group of mice irradiated before being challenged with LPS, TGF- β_1 levels further and significantly increased compared to baseline and to animals receiving irradiation without LPS.

Discussion

Recently we reported the efficacy of LD-RT (0.1, 0.3, 0.6Gy) in an experimental model of systemic inflammation in mice. LD-RT reduced leukocyte adhesion and we found

Table 2

Effects of low-dose irradiation and lipopolysaccharide (LPS) on venular blood flow ($\mu\text{m/s}$), shear rate (s^{-1}), venular diameter (μm) and leukocyte rolling velocity ($\mu\text{m/s}$)

	Control			RT			RT + LPS		
	LPS	5 h	24 h	5 h	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h
Venular blood flow ($\mu\text{m/s}$)	803.1 \pm 77.6	1173 \pm 99*	703 \pm 73	1015 \pm 104*	789 \pm 37	594 \pm 69*	488 \pm 32+	530 \pm 29*	186 \pm 12
Shear rate (s^{-1})	268 \pm 20	471 \pm 52*	269 \pm 35	310 \pm 44	246 \pm 20	245 \pm 34	187 \pm 20	186 \pm 12	21.5 \pm 0.56
Venular diameters (μm)	23.4 \pm 1.48	23.25 \pm 1.92	23.1 \pm 0.94	22.4 \pm 0.64	24.8 \pm 1.5	22.1 \pm 0.8	22.16 \pm 1.57	21.5 \pm 0.56	106 \pm 20.1
Leukocyte rolling velocity ($\mu\text{m/s}$)	109.4 \pm 11.9	86.9 \pm 27	111 \pm 10.2	75.6 \pm 28.3	68 \pm 6.3	204 \pm 29.8*	135 \pm 5	118.9 \pm 21.5	106 \pm 20.1

Abbreviation: RT, radiotherapy.

* $p < 0.05$ vs. LPS-challenged.

+ $p < 0.05$ vs. control.

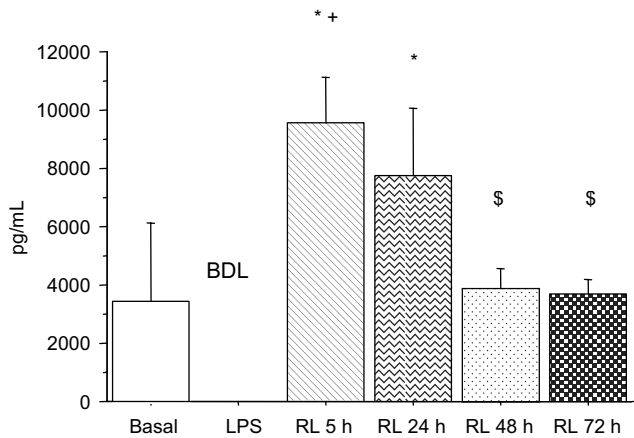


Fig. 4. Time course of circulating levels of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in mice. The groups studied included control mice (Basal), mice challenged with lipopolysaccharide (LPS), and irradiated mice (0.3Gy) challenged with LPS and studied 5 h (RL 5 h), 24 h (RL 24 h), 48 h (RL 48 h), or 72 h (RL 72 h) after irradiation ($n=6$ in each group). Circulating TGF- β_1 were significantly increased in response to treatment with 0.3Gy 5 h and 24 h after low-dose radiotherapy. At later time points (48 and 72 h) plasma levels of TGF- β_1 were no longer significantly elevated compared to the LPS-challenged group. * $p < 0.05$ vs. non-irradiated LPS; + $p < 0.05$ vs. control; \$ $p < 0.05$ vs. to irradiated with 0.3Gy at 5 h challenged with LPS. BDL, Below detection limits.

that the highest effective dose of radiotherapy among those tested was 0.3Gy [9].

In the present study, we characterize the inhibitory effect of LD-RT on the process of leukocyte recruitment over time, which may be crucial for establishing effective fractionation schedules of radiotherapy treatment for inflammatory conditions. We demonstrate that leukocyte adhesion after irradiation with 0.3Gy is markedly inhibited

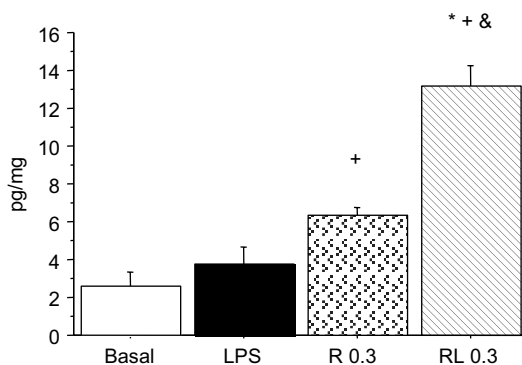


Fig. 5. Intestinal production of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in mice. Intestinal tissue samples of control mice (Basal), mice challenged with lipopolysaccharide (LPS), mice irradiated (0.3Gy) (R 0.3) and mice irradiated with 0.3Gy challenged with LPS (RL 0.3), were harvested and cultured for 24 h. Production of TGF- β_1 was significantly increased in response to irradiation, and further increased by challenge with LPS, whereas LPS alone had no effect. * $p < 0.05$ vs. basal; + $p < 0.05$ vs. non-irradiated LPS; & $p < 0.05$ vs. irradiated with 0.3Gy without LPS.

over a time period of 48 h after irradiation and that this effect is virtually lost after 72 h. Although at this time point, a marked reduction in the number of rolling cells was still very pronounced, it did not result in significant attenuation of firm adhesion, probably because only a small fraction of rolling cells become firmly adhered, and reduction in rolling must be almost complete to impact on the number of adherent cells [14].

Our observations are in agreement with previous *in vitro* studies showing that LD-RT of endothelial cells is followed by a reduction of leukocyte adhesion over periods up to 48 h [6–8]. Our study adds the value of showing that this effect also takes place in a whole animal system and that is lost after 72 h of application of LD-RT. The inhibition of leukocyte recruitment in the context of a systemic inflammatory response suggests that LD-RT might be applied to treatment of a variety of inflammatory conditions since it affects a key point of the inflammatory response, i.e. the recruitment of circulating inflammatory cells to the specific sites of inflammation. On the other hand, one of the limitations of the study is that LD-RT was applied prophylactically, before the pro-inflammatory insult. It remains to be evaluated in future studies whether LD-RT has also a similar efficacy for the treatment of established inflammatory conditions.

Previous studies using high doses of radiotherapy in a similar animal model demonstrated a significant reduction in the number of circulating leukocytes [15]. However, in the current study we did not observe a further reduction in the number of total leukocyte counts in animals treated with LD-RT before being challenged with LPS. Therefore, the changes in the number of circulating leukocytes do not seem to be the reason for the reduction in LPS-induced adhesion in our study, and the reduction of leukocyte adhesion in response to radiation during a period of 48 h remained significant when the results were corrected by the number of circulating cells. Reduction in firm leukocyte adhesion is also not the result of a reduction in dispersal forces of the venules where adhesion takes place, because shear rate was not significantly modified by radiation.

The potential anti-inflammatory actions of TGF- β_1 on endothelial cells were already demonstrated 20 years ago [16]. The modulation of the inflammatory response by TGF- β_1 includes inhibition of proliferation of all T-cells, inhibitory effects on proliferation and function of B-lymphocytes, down-regulation of natural killer cell activity and the T-cell response, regulation of cytokine production by immune cells, and regulation of macrophage function [17–20]. Roedel et al. showed that an increased expression of TGF- β_1 contributed to reduce adhesion of peripheral blood mononuclear cells to cultured endothelial cells. The authors demonstrated that TGF- β_1 expression had a maximum increase after irradiation with 0.5Gy, and that this dose provided the highest inhibitory effect on cell adhesion [1]. We have also provided evidence on the potential inhibitory role of TGF- β_1 as an anti-inflammatory mediator in response to irradiation [9]. In our previous study, we demonstrated an inverse correlation between the level of TGF- β_1 and leukocyte adhesion, and causally linked the increment in TGF- β_1 production with the reduction in leukocyte adhesion by immunoneutralization using blocking antibodies [9]. In the current study, we corroborate that LD-RT induces a significant increase in TGF- β_1 circulating lev-

els, and there is increased local production of this cytokine in the irradiated intestine. The time-course of increased TGF- β_1 levels in response to LD-RT was short-lived relative to the inhibition of leukocyte recruitment, i.e. whereas significant reduction of leukocyte adhesion was observed over a period of 48 h, increased TGF- β_1 levels were maintained only during the initial 24 h. In studies performed 72 h after LD-RT, the LPS-induced leukocyte adhesion and TGF- β_1 levels did not differ from non-irradiated animals. Nevertheless, the magnitude of inhibition of leukocyte adhesion in intestinal venules somehow mirrored the circulating levels of TGF- β_1 , with a highest inhibition at 5 h after LD-RT, when maximal levels of TGF- β_1 were detected. At this time, also the LPS-induced reduction in the number of total circulating leukocytes and circulating neutrophils was prevented, probably reflecting a lower number of cells being recruited to sites of inflammation.

The results of a recent *in vivo* study in mice using dorsal surface air pouch, and carrageenin as a proinflammatory stimulus, also showed that treatment with LD-RT (0.5–2 Gy) induces an increase in TGF- β_1 levels that is maximum at 24 h after irradiation and progressively declines, returning to baseline values at 72 h [21]. Other studies applying higher radiation doses up to 12.5 Gy have shown increased TGF- β_1 production for prolonged periods of time up to 26 weeks after irradiation [22–28]. Overall, these observations suggest that the increase of TGF- β_1 may contribute to, but is not the only responsible for, the LD-RT effects on leukocyte recruitment. It is conceivable that increased levels of TGF- β_1 over a period of 24 h following irradiation exert a direct anti-inflammatory action during this period. Whether later inhibition of the inflammatory response results from downstream effects of increased TGF- β_1 levels or from unrelated anti-inflammatory mechanisms remains to be clarified.

There is only one *in vitro* study where the effect of LD-RT on circulating levels of TGF- β_1 and leukocyte adhesion to endothelial cells was assessed. This study showed that LD-RT decreased adhesion at 4 and 24 h, but not at 12 h, and an inverse correlation with TGF- β_1 levels, that had peak levels at 4–8 h and 24–30 h. This study also corroborated the role of TGF- β_1 as an anti-inflammatory mediator showing that neutralization of TGF- β_1 activity restored adhesion at 4 and 24 h [8].

In summary, the results of the current experimental *in vivo* study demonstrate that LD-RT has a prolonged anti-inflammatory effect and suggest that LD-RT should be applied every 48–72 h period to maintain a sustained inhibition of the inflammatory process, in practice this may be accomplished by administration of 3 sessions per week.

Acknowledgements

This work was supported by grant SAF 2006/03074 from Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

* **Corresponding author.** Julián Panés, Department of Gastroenterology, Hospital Clinic, C/Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain. E-mail address: jpanes@clinic.ub.es

Received 28 March 2007; received in revised form 22 October 2007; accepted 25 October 2007; Available online 26 November 2007

References

- [1] Roedel F, Kley N, Beuscher HU, et al. Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta1-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int J Radiat Biol* 2002;78:711–9.
- [2] Trott KR. Therapeutic effects of low radiation doses. *Strahlenther Onkol* 1994;170:1–12.
- [3] Trott KR, Kamprad F. Radiobiological mechanisms of anti-inflammatory radiotherapy. *Radiother Oncol* 1999;51:197–203.
- [4] Seegenschmiedt MH, Katalinic A, Makoski HB, et al. Radiotherapy of benign diseases: a pattern of care study in Germany. *Strahlenther Onkol* 1999;175:541–7.
- [5] Keilholz L, Seegenschmiedt H, Sauer R. Radiotherapy for painful degenerative joint disorders. Indications, technique and clinical results. *Strahlenther Onkol* 1998;174:243–50.
- [6] Hildebrandt G, Maggiorella L, Rodel F, et al. Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 2002;78:315–25.
- [7] Kern PM, Keilholz L, Forster C, et al. Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro. *Radiother Oncol* 2000;54:273–82.
- [8] Rodel F, Schaller U, Schultze-Mosgau S, et al. The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation. *Strahlenther Onkol* 2004;180:194–200.
- [9] Arenas M, Gil F, Gironella M, et al. Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:560–7.
- [10] Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramine. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849–56.
- [11] Davis MJ. Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical Doppler velocimeter. *Microvasc Res* 1987;34:223–30.
- [12] Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ Res* 1978;43:738–49.
- [13] Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693–9.
- [14] Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995;95:2510–9.
- [15] Mollà M, Gironella M, Salas A, et al. Protective effect of superoxide dismutase in radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;61:1159–66.
- [16] Muller G, Behrens J, Nussbaumer U, et al. Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5600–4.
- [17] Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994;180:1587–90.
- [18] Goey H, Keller JR, Back T, Longo DL, Ruscetti FW, Wiltrout RH. Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* 1989;143:877–80.
- [19] Bartlett WC, Purchio A, Fell HP, Noelle RJ. Cognate interactions between helper T cells and B cells. VI. TGF-beta inhibits B cell activation and antigen-specific, physical interactions between Th and B cells. *Lymphokine Cytokine Res* 1991;3:177–83.
- [20] McCartney-Francis N, Wahl SM. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. *J Leukoc Biol* 1994;55:401.

- [21] Schae D, Jahns J, Hildebrandt G, et al. Radiation treatment of acute inflammation in mice. *Int J Radiat Biol* 2005;81:657–67.
- [22] Finkelstein JN, Johnston CJ, Baggs R, et al. Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;28:621–31.
- [23] Hauer-Jensen M, Richter KK, Wang J, et al. Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy. *Radiat Res* 1998;150:673–80.
- [24] Johnston CJ, Piedboeuf B, Baggs R, et al. Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Radiat Res* 1995;142:197–203.
- [25] Langberg CW, Hauer-Jensen M, Sung CC, et al. Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 1994;32:29–36.
- [26] Richter KK, Langberg CW, Sung CC, et al. Association of transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity with specific histopathologic lesions in subacute and chronic experimental radiation enteropathy. *Radiother Oncol* 1996;39:243–51.
- [27] Rube CE, Uthe D, Schmid KW, et al. Dose-dependent induction of transforming growth factor beta (TGF-beta) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:1033–42.
- [28] Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, et al. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:99–109.

7. COMUNICACIONS A CONGRESSOS I PREMIS

Els resultats dels treballs que constitueixen aquesta tesi han estat presentats en els següents congressos:

1) **“La radioterapia a dosis bajas reduce la adhesión leucocitaria en la estimulación inflamatoria experimental”.**

M. Arenas, F. Gil, M. Gironella, V. Hernández, S. Jorcano, C. Conill, A. Rovirosa, A. Biete, JM. Piqué, J. Panés.

XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR). Cádiz, 4-7 d'octubre, 2005. Clin Transl Oncol 2005, Vol 7, pàg 51

2) **“Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice”.**

M. Arenas, F. Gil, M. Gironella, V. Hernández, S. Jorcano, A. Biete, JM. Piqué, J. Panés.

22th Annual European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) Meeting. Leipzig, Alemanya, 8-12 d'octubre, 2006. Radiotherapy and Oncology 2006, Vol 81, S309

3) **“Estudio tiempo-respuesta de los efectos antiinflamatorios de la radioterapia a dosis bajas: correlación con la expresión del TGF- β_1 ”.**

M. Arenas, F. Gil, M. Gironella, V. Hernández, A. Rovirosa, A. Biete, JM. Piqué, J. Panés.

XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR). Málaga, 16-19 d'octubre, 2007. Clin Transl Oncol 2007, Vol 9, pàg 31

Premis a les comunicacions i publicacions:

Premi a la millor comunicació atorgat per l'Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya (Societat catalano-Balear d'Oncologia) maig 2006.

“La radioterapia a dosis bajas reduce la adhesión leucocitaria en la estimulación inflamatoria experimental”. M. Arenas, F. Gil, M. Gironella, V. Hernández, S. Jorcano, C. Conill, A. Rovirosa, A. Biete, JM. Piqué, J. Panés. Presentat al XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Oncología Radioterápica (SEOR). Cádiz, 4-7 octubre, 2005

Premi a la tercera millor publicació atorgat per l'Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya (Societat catalano-Balear d'Oncologia) maig 2007.

“Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice”. M. Arenas, F. Gil, M. Gironella, V. Hernández, S. Jorcano, A. Biete, JM. Piqué, J. Panés.

Int J Rad Oncol Biol Phys 2006, 66(2): 560-7

Premi al millor treball de recerca bàsica en la XIV Edició Premis Sagessa 2007.

“Anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy in an experimental model of systemic inflammation in mice”. M. Arenas, F. Gil, M. Gironella, V. Hernández, S. Jorcano, A. Biete, JM. Piqué, J. Panés.

Int J Rad Oncol Biol Phys 2006, 66(2): 560-7

8. DISCUSSIÓ

Els treballs realitzats en aquesta tesi confirmen que la irradiació a dosis baixes té un potent efecte antiinflamatori i amplien els coneixements sobre els mecanismes implicats en aquesta resposta, donant informació sobre la dosi més eficaç i sobre el temps en què es manté aquest efecte, per tal d'establir el millor esquema de tractament radioteràpic per patologia inflamatòria.

En el primer estudi l'administració de LPS indueix un significatiu augment del nombre de leucòcits amb fenòmens de rodament i adherits a les vècules del còlon, el tractament amb RT-DB sobre la regió abdominal amb dosi única de 0,1 Gy, 0,3 Gy, 0,6 Gy, 1 h abans de LPS, i estudiats a les 5 h de la RT, redueix significativament l'adhesió de leucòcits a les vècules del còlon comparats amb el grup LPS. S'han analitzat les interaccions leucòcit-endoteli mitjançant la tècnica de microscopia intravital. La dosi amb major efecte antiinflamatori és la dosi de 0,3 Gy, això concorda amb els resultats obtinguts en altres estudis *in vitro* on existeix un efecte antiinflamatori amb dosi entre 0,1-0,5 Gy, però contrasta amb la dosi usada en humans per al tractament de les malalties degeneratives òssies i inflamatòries que oscil·la entre 0,3-1.5 Gy amb dosi total de 3 a 12 Gy. Per tant, són necessaris estudis clínics usant dosis inferiors (0,1 o 0,3 Gy) per tal de maximitzar l'efecte antiinflamatori i minimitzar la toxicitat.

La dosi de 0,6 Gy produeix una disminució dels leucòcits circulants. Aquest efecte s'ha observat en humans després d'una irradiació corporal total amb dosi de 0,1 Gy, 2 o 3 sessions/setmana¹⁷⁹. Es podria pensar que la reducció

del nombre de leucòcits circulants fos la raó de la disminució de l'adhesió en el nostre estudi, però les dosis de 0,1 i 0,3 Gy no produeixen leucopènia i sí que produeixen una disminució significativa de l'adhesió i, a més, aquesta disminució en l'adhesió de leucòcits es manté quan els resultats es corregeixen segons el nombre de leucòcits circulants.

Per tal d'explorar els possibles mecanismes que expliquen aquesta disminució en l'adhesió, hem decidit investigar si l'efecte de la RT-DB està relacionat amb la modulació de l'expressió de la molècula d'adhesió ICAM-1, atès que aquesta és una molècula clau en l'adhesió mediada per LPS ⁸¹. Com s'ha descrit anteriorment, hem observat després de l'administració de LPS un significatiu increment de l'expressió d'ICAM-1 en l'endoteli dels òrgans abdominals irradiats, però el pretractament amb 0,3 Gy (dosi amb màxim efecte antiinflamatori) no ha modificat l'increment d'expressió d'ICAM-1 induït per LPS. Aquesta observació està d'acord amb altres estudis *in vitro* on l'adhesió induïda per IL-1 o TNF- α significativament es redueix amb dosis de RT de 0,1-0,6 Gy, sense modificar-se l'expressió d'ICAM-1 ^{6,7}.

Els efectes antiinflamatoris del TGF- β_1 sobre les cèl·lules endotelials es van demostrar fa més de 20 anys ¹⁶⁵. La modulació de la resposta inflamatòria pel TGF- β_1 inclou la inhibició de la proliferació de totes les cèl·lules T, els efectes inhibitoris de la proliferació i la funció dels limfòcits B, la baixa regulació de l'activitat de les cèl·lules natural killer i la resposta de les cèl·lules T, la regulació de la producció de citocines per cèl·lules immunes, i la regulació de la funció dels macròfags ^{160, 161, 180, 181}. Un estudi *in vitro* previ suggereix que el TGF- β_1 és un mediador clau en l'efecte anti-inflamatori de la RT ^{8, 144}. El nostre grup prèviament ha demostrat el paper inhibitori del

TGF- β_1 sobre el reclutament leucocitari induït per LPS en un model *in vivo*¹⁸². En aquest primer estudi, nosaltres demostrem una correlació inversa amb els nivells del TGF- β_1 i l'adhesió leucocitària. Hem demostrat que els nivells de TGF- β_1 augmenten en resposta a la irradiació i que aquest increment també apareix en els ratolins en els que s'ha administrat LPS. Per tal d'avaluar si l'augment de producció de TGF- β_1 és el responsable d'una acció antiinflamatòria de la RT en disminuir l'adhesió de leucòcits, hem procedit a la neutralització de TGF- β_1 mitjançant anticossos monoclonals bloquejants, mostrant que el tractament amb anti-TGF- β_1 significativament atenua l'efecte de la irradiació sobre l'adhesió leucocitària. D'altra banda, però, l'adhesió no es restableix als nivells observats en els animals estimulats amb LPS, la qual cosa suggereix que existeixen altres mecanismes que també participen en aquests efectes antiinflamatoris de la RT-DB. Altres possibles mediadors podrien incloure un augment de la producció de IL-10, la reducció de l'expressió iNOS, o la inducció d'apoptosi^{7, 137, 142, 147}.

Per tant, els resultats del primer estudi evidencien que el TGF- β_1 se sobreexpressa en resposta a la RT-DB, i que aquest augment és dosi dependent; l'immunobloqueig selectiu de TGF- β_1 reverteix de manera parcial l'adhesió post-administració d'un estímul pro-inflamatori en els ratolins irradiats a dosis baixes. Els resultats observats demostren que TGF- β_1 és un dels factors implicats en la disminució de l'adhesió en resposta a la RT-DB.

En el segon estudi hem caracteritzat l'efecte inhibitori sobre el reclutament leucocitari de la RT-DB en el temps, s'ha estudiat l'efecte de la RT-DB en el temps per tal d'establir un esquema de tractament radioteràpic òptim pel

tractament de patologia inflammatòria. La disminució de l'adhesió leucocitària es manté de manera significativa en el període de 48 h i es perd a les 72 h. Aquestes observacions estan en la línia de les observades en altres estudis *in vitro* previs, mostrant que la RT-DB disminueix l'adhesió en cèl·lules endotelials en un període de 48 h ⁶⁻⁸. El nostre estudi a més afegeix que es perd l'efecte a les 72 h.

La inhibició del reclutament leucocitari en el context d'una inflamació sistèmica suggereix que la RT-DB pot ser eficaç en diverses malalties inflammatòries, ja que la RT-DB influeix en un punt clau de la resposta inflammatòria que és en el reclutament de cèl·lules inflammatòries circulants als llocs específics de la inflamació. Però, una de les limitacions dels nostres estudis és que la RT-DB ha estat administrada de manera profilàctica, abans de l'estímul pro-inflamatori. En un futur, seran necessaris estudis on es demostrï que la RT-DB té una eficàcia similar administrada com a tractament quan ja està establerta la inflamació.

En tots els períodes estudiats (5 h, 24 h, 48 h, 72 h) s'observa una disminució del rodament, però el fet de tenir una disminució del rodament no explica la disminució de l'adhesió, ja que en el període de temps de 72 h tot i haver-hi una disminució del rodament no s'observa una disminució de l'adhesió, probablement perquè només una petita fracció de les cèl·lules en rodament s'adhereixen, per tant la reducció de les cèl·lules en rodament ha de ser pràcticament completa per arribar a tenir un impacte en el nombre de cèl·lules en adhesió ¹⁸³, circumstància que no s'ha observat en el nostre sistema experimental.

Després de demostrar, en el primer estudi, que el TGF- β_1 és un mediador clau en els efectes antiinflamatoris de la RT-DB i sabem també que té uns efectes en el recompte diferencial de limfòcits i neutròfils¹³⁰, hem caracteritzat el recompte diferencial de leucòcits en els grups amb LPS i pretractats amb RT-DB. En aquest segon estudi s'observa també que la RT-DB produeix leucopènia i limfopènia i el temps en què és més acusat el descens del nombre de cèl·lules circulants és a les 24 h. L'administració de LPS en animals no irradiats indueix una reducció significativa del recompte leucocitari (tant en el nombre de limfòcits com en el de neutròfils circulants) respecte el grup control. La RT-DB també indueix una reducció transitòria en el nombre de limfòcits circulants a les 24 h després de la irradiació; en canvi, el nombre de neutròfils es redueix significativament en tots els temps d'estudi. El pretractament amb RT-DB a les 5 h abans de l'estudi evita la disminució de leucòcits circulants induïda per LPS, però no ho evita en els temps d'estudi posteriors a les 5 h on no s'altera de manera significativa la reducció induïda per LPS en el recompte diferencial.

Com en el primer estudi, la reducció en el nombre de leucòcits circulants no sembla ser la raó de la disminució de l'adhesió, ja que la disminució de l'adhesió leucocitària en resposta a la RT-DB durant el període de 48 h es manté de manera significativa quan els resultats es corregeixen segons el nombre de cèl·lules circulants.

La RT-DB indueix un significatiu augment del TGF- β_1 , però no existeix una correlació en el temps, ja que l'augment del TGF- β_1 s'objectiva les primeres 24 h i en canvi la reducció de l'adhesió leucocitària es manté durant 48 h. Aquests resultats estan d'acord amb un estudi recent *in vivo* en ratolins on es

demostra que l'augment del TGF- β_1 és màxim a les 24 h i posteriorment disminueix fins a tornar a nivells basals a les 72 h ¹⁷⁵. Això indica que probablement el TGF- β_1 juga un paper molt important en l'efecte de la RT durant les primeres 24 h i que més tard existeixen altres mecanismes, que encara estan per clarificar, que poden ser o no dependents de l'increment en la producció de TGF- β_1 durant les primeres 24 h.

Només existeix un estudi *in vitro* on s'avalua els efectes de la RT-DB sobre la producció del TGF- β_1 i l'adhesió leucocitària, aquest estudi mostra una disminució en l'adhesió de leucòcits a les 4 i 24 h i una correlació inversa amb la producció del TGF- β_1 ; es corrobora el paper del TGF- β_1 mitjançant la neutralització de la seva activitat on l'adhesió es restaura a les 4 i 24 h ⁸.

Altres estudis utilitzant dosis altes de RT superiors a 12.5 Gy han mostrat un augment del TGF- β_1 durant períodes perllongats de més de 26 setmanes des de la irradiació ¹⁸⁴⁻¹⁹¹.

Els resultats de la present tesi basada en estudis *in vivo* en ratolins indiquen que la RT-DB té un efecte antiinflamatori molt potent inhibint les interaccions leucòcit-endoteli i que pot tenir un paper molt important en el tractament de malalties inflamatòries, sent la dosi mínima amb màxim efecte antiinflamatori de 0,3 Gy.

En relació als mecanismes implicats en aquest efecte antiinflamatori, la modulació de l'expressió d'ICAM-1 no participa en la disminució dels fenòmens d'adhesió leucocitària en els vasos del còlon dels animals irradiats amb baixa dosi, sent l'augment de la producció del TGF- β_1 un dels factors responsables d'aquesta disminució de l'adhesió.

La RDT-DB té un efecte antiinflamatori perllongat en el temps fins 48 h, associat a un augment dels nivells de TGF- β_1 les primeres 24 h, i perdent-se aquest efecte a les 72 h de la irradiació. Per tant, en la pràctica clínica el tractament amb RT-DB s'hauria d'aplicar cada 48-72 h per tal de mantenir la inhibició del procés inflamatori, és a dir, s'haurien d'administrar 2-3 sessions a la setmana.

9. CONCLUSIONS

Les conclusions del primer estudi són:

1. La RT-DB (0,1 Gy, 0,3 Gy, 0,6 Gy) té un potent efecte antiinflamatori en l'intestí. La inhibició de les interaccions leucòcit-endoteli, i per tant del reclutament de cèl·lules inflamatòries és cabdal en la modulació de la resposta inflamatòria per la RT-DB.
2. La dosi eficaç més baixa és de 0,3 Gy.
3. En relació als mecanismes implicats, l'acció antiinflamatòria de la RT-DB no depèn de la modulació de l'expressió de molècules d'adhesió com l'ICAM-1, sent la sobreexpressió del TGF- β_1 un dels factors responsables de l'atenuació de la resposta de l'adhesió leucocitària. La immunoneutralització del TGF- β_1 mostra que aquesta citocina juga un paper clau en la modulació dels fenòmens de reclutament leucocitari, sent en part responsable de l'efecte antiinflamatori de la RT-DB.

Les conclusions del segon estudi són:

1. La RDT-DB té un efecte antiinflamatori perllongat en el temps que es manté fins 48 h després de la irradiació.
2. Existeix una correlació amb els nivells de TGF- β_1 les primeres 24 h.

Els resultats obtinguts fan aconsellable el replantejament clàssic de les dosis utilitzades fins al moment en processos inflamatoris benignes.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Seegenschmiedt MH, Katalinic A, Makoski HB, Haase W, Gademann G, Hassenstein E. [Radiotherapy of benign diseases: a pattern of care study in Germany]. *Strahlenther Onkol* 1999;175:541-547.
2. Seegenschmiedt MH, Katalinic A, Makoski H, Haase W, Gademann G, Hassenstein E. Radiation therapy for benign diseases: patterns of care study in Germany. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:195-202.
3. Hildebrandt G, Seed MP, Freemantle CN, Alam CA, Colville-Nash PR, Trott KR. Mechanisms of the anti-inflammatory activity of low-dose radiation therapy. *Int J Radiat Biol* 1998;74:367-378.
4. Liebmann A, Hindemith M, Jahns J, Madaj-Sterba P, Weisheit S, Kamprad F, Hildebrandt G. Low-dose X-irradiation of adjuvant-induced arthritis in rats. Efficacy of different fractionation schedules. *Strahlenther Onkol* 2004;180:165-172.
5. Trott KR. Therapeutic effects of low radiation doses. *Strahlenther Onkol* 1994;170:1-12.
6. Hildebrandt G, Maggiorella L, Rodel F, Rodel V, Willis D, Trott KR. Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 2002;78:315-325.
7. Kern PM, Keilholz L, Forster C, Hallmann R, Herrmann M, Seegenschmiedt MH. Low-dose radiotherapy selectively reduces adhesion of peripheral blood mononuclear cells to endothelium in vitro. *Radiother Oncol* 2000;54:273-282.
8. Rodel F, Schaller U, Schultze-Mosgau S, Beuscher HU, Keilholz L, Herrmann M, Voll R, Sauer R, Hildebrandt G. The induction of TGF-beta(1) and NF-kappaB parallels a biphasic time course of leukocyte/endothelial cell adhesion following low-dose X-irradiation. *Strahlenther Onkol* 2004;180:194-200.
9. Winship T, Rosvoll RV. Cancer of the thyroid in children. *Proc Natl Cancer Conf* 1970;6:677-681.
10. Micke O, Seegenschmiedt MH. Radiotherapy in painful heel spurs (plantar fasciitis)--results of a national patterns of care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:828-843.
11. Crocker I. Radiation therapy to prevent coronary artery restenosis. *Semin Radiat Oncol* 1999;9:134-143.
12. Lo TC. Radiation therapy for heterotopic ossification. *Semin Radiat Oncol* 1999;9:163-170.
13. Seegenschmiedt MH, Keilholz L, Martus P, Goldmann A, Wolfel R, Henning F, Sauer R. Prevention of heterotopic ossification about the hip: final results of two randomized trials in 410 patients using either preoperative or postoperative radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;39:161-171.
14. Seegenschmiedt MH, Keilholz L. Epicondylopathia humeri and peritendinitis humeroscapularis: evaluation of radiation therapy long-term results and literature review. *Radiother Oncol* 1998;47:17-28.
15. Leon MB, Teirstein PS, Moses JW, Tripuraneni P, Lansky AJ, Jani S, Wong SC, Fish D, Ellis S, Holmes DR, Kerieakes D, Kuntz RE. Localized intracoronary gamma-radiation therapy to inhibit the recurrence of restenosis after stenting. *N Engl J Med* 2001;344:250-256.

16. Pokrajac B, Potter R, Wolfram RM, Budinsky AC, Kirisits C, Lileg B, Mendel H, Sabeti S, Schmid R, Minar E. Endovascular brachytherapy prevents restenosis after femoropopliteal angioplasty: results of the Vienna-3 randomised multicenter study. *Radiother Oncol* 2005;74:3-9.
17. Tripuraneni P, Giap H, Jani S. Endovascular brachytherapy for peripheral vascular disease. *Semin Radiat Oncol* 1999;9:190-202.
18. Waksman R, Ajani AE, White RL, Chan R, Bass B, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Torguson R, Deible R, Pinnow E, Lindsay J. Five-year follow-up after intracoronary gamma radiation therapy for in-stent restenosis. *Circulation* 2004;109:340-344.
19. Zabakis P, Kardamakis DM, Siablis D, Kalogeropoulou C, Karnabatidis D, Malatara G, Dimopoulos IA. External beam radiation therapy reduces the rate of re-stenosis in patients treated with femoral stenting: results of a randomised study. *Radiother Oncol* 2005;74:11-16.
20. Seegenschmiedt MH, Micke O, Willich N. Radiation therapy for nonmalignant diseases in Germany. Current concepts and future perspectives. *Strahlenther Onkol* 2004;180:718-730.
21. Micke O, Seegenschmiedt MH. Consensus guidelines for radiation therapy of benign diseases: a multicenter approach in Germany. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:496-513.
22. Keilholz L, Seegenschmiedt MH, Kutzki D, Sauer R. [Periarthritis humeroscapularis (PHS). Indications, technique and outcome of radiotherapy]. *Strahlenther Onkol* 1995;171:379-384.
23. Glatzel M, Fröhlich D, Bäsecke S. Analgesic radiotherapy for osteoarthritis of digital joints and rhizarthritis. *Radiother Oncol* 2004;71:24.
24. Keilholz L, Seegenschmiedt H, Sauer R. [Radiotherapy for painful degenerative joint disorders. Indications, technique and clinical results]. *Strahlenther Onkol* 1998;174:243-250.
25. Ruppert R, Seegenschmiedt MH, Sauer R. [Radiotherapy of osteoarthritis. Indication, technique and clinical results]. *Orthopade* 2004;33:56-62.
26. Kammerer R, Bollmann G, Schwenger P, Michael G, Koppen D. [The results of radiotherapy of epicondylitis humeri using different dosages]. *Radiobiol Radiother (Berl)* 1990;31:503-507.
27. Gartner C, Schuttauf M, Below M, Motorina LI, Michina ZP. [The radiotherapeutic treatment of chronically relapsing, degenerative skeletal changes at the Oncology Clinic (Charite)]. *Radiobiol Radiother (Berl)* 1988;29:689-698.
28. Mucke R, Schonekaes K, Micke O, Seegenschmiedt MH, Berning D, Heyder R. Low-dose radiotherapy for painful heel spur. Retrospective study of 117 patients. *Strahlenther Onkol* 2003;179:774-778.
29. Muecke R, Micke O, Reichl B, Heyder R, Prött FJ, Seegenschmiedt MH, Glatzel M, Schneider O, Schafer U, Kundt G. Demographic, clinical and treatment related predictors for event-free probability following low-dose radiotherapy for painful heel spurs - a retrospective multicenter study of 502 patients. *Acta Oncol* 2007;46:239-246.
30. Rodel F, Keilholz L, Herrmann M, Sauer R, Hildebrandt G. Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy. *Int J Radiat Biol* 2007;83:357-366.
31. Trott KR, Kamprad F. Radiobiological mechanisms of anti-inflammatory radiotherapy. *Radiother Oncol* 1999;51:197-203.
32. Tubiana M. Dose-effect relationship and estimation of the carcinogenic effects of low doses of ionizing radiation: the joint report of the Academie des Sciences (Paris) and of the Academie Nationale de Medecine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;63:317-319.

33. Marples B, Lambin P, Skov KA, Joiner MC. Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *Int J Radiat Biol* 1997;71:721-735.
34. Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC, Turesson I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:379-389.
35. Enns L, Bogen KT, Wizniak J, Murtha AD, Weinfeld M. Low-dose radiation hypersensitivity is associated with p53-dependent apoptosis. *Mol Cancer Res* 2004;2:557-566.
36. Krueger SA, Joiner MC, Weinfeld M, Piasentin E, Marples B. Role of apoptosis in low-dose hyper-radiosensitivity. *Radiat Res* 2007;167:260-267.
37. Sainz Fernández C. Análisis de la influencia in vitro de bajas dosis de radiación producidas por ²²²Rn sobre proliferación celular, apoptosis y respuesta a agentes citotóxicos [tesis doctoral]. Santander (Spain): Universidad de Cantabria; 2002.
38. Maity A, Kao GD, Muschel RJ, McKenna WG. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;37:639-653.
39. Brenner DJ, Sachs RK. Estimating radiation-induced cancer risks at very low doses: rationale for using a linear no-threshold approach. *Radiat Environ Biophys* 2006;44:253-256.
40. Tubiana M, Aurengo A, Averbeck D, Masse R. The debate on the use of linear no threshold for assessing the effects of low doses. *J Radiol Prot* 2006;26:317-324.
41. Wolff S. The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 1:277-283.
42. Sagan LA. What is hormesis and why haven't we heard about it before? *Health Phys* 1987;52:521-525.
43. Amundson SA, Do KT, Shahab S, Bittner M, Meltzer P, Trent J, Fornace AJ, Jr. Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 2000;154:342-346.
44. Ikushima T, Aritomi H, Morisita J. Radioadaptive response: efficient repair of radiation-induced DNA damage in adapted cells. *Mutat Res* 1996;358:193-198.
45. Ikushima T. Chromosomal responses to ionizing radiation reminiscent of an adaptive response in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1987;180:215-221.
46. Ikushima T. Radio-adaptive response: characterization of a cytogenetic repair induced by low-level ionizing radiation in cultured Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1989;227:241-246.
47. Ikushima T. Radioadaptive response: responses to the five questions. *Hum Exp Toxicol* 1999;18:433-435.
48. Morgan WF. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res* 2003;159:567-580.
49. Prise KM. New advances in radiation biology. *Occup Med (Lond)* 2006;56:156-161.
50. Morgan WF. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat Res* 2003;159:581-596.
51. Pierce DA, Shimizu Y, Preston DL, Vaeth M, Mabuchi K. Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, Part I. Cancer: 1950-1990. *Radiat Res* 1996;146:1-27.

52. Pierce DA, Preston DL. Radiation-related cancer risks at low doses among atomic bomb survivors. *Radiat Res* 2000;154:178-186.
53. Stsjazhko VA, Tsyb AF, Tronko ND, Souchkevitch G, Baverstock KF. Childhood thyroid cancer since accident at Chernobyl. *BMJ* 1995;310:801.
54. Cannon B, Randolph JG, Murray JE. Malignant irradiation for benign conditions. *N Engl J Med* 1959;260:197-202.
55. Court-Brawn WM, Doll R. Mortality from cancer and other causes after radiotherapy for ankylosing spondylitis. *BMJ* 1965;2:1327-1332.
56. Howe GR, McLaughlin J. Breast cancer mortality between 1950 and 1987 after exposure to fractionated moderate-dose-rate ionizing radiation in the Canadian fluoroscopy cohort study and a comparison with breast cancer mortality in the atomic bomb survivors study. *Radiat Res* 1996;145:694-707.
57. Broerse JJ, Jansen JTM, Seegenschmiedt MH. Carcinogenic risks in radiotherapy of benign diseases for head to heel. *Radiother Oncol* 2004;71(supl 1):1.
58. Bhatia S, Robison LL, Oberlin O, Greenberg M, Bunin G, Fossati-Bellani F, Meadows AT. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1996;334:745-751.
59. Mohanti BK, Bansal M. Late sequelae of radiotherapy in adults. *Support Care Cancer* 2005;13:775-780.
60. Cohen BL, Colditz GA. Tests of the linear-no threshold theory for lung cancer induced by exposure to radon. *Environ Res* 1994;64:65-89.
61. Cohen BL. Dose-response relationship for radiation carcinogenesis in the low-dose region. *Int Arch Occup Environ Health* 1994;66:71-75.
62. Cohen BL. How dangerous is low level radiation? *Risk Anal* 1995;15:645-653.
63. Ghiassi-Nejad M, Mortazavi SM, Cameron JR, Niroomand-rad A, Karam PA. Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: preliminary biological studies. *Health Phys* 2002;82:87-93.
64. Ghiassi-Nejad M, Zakeri F, Assaei RG, Kariminia A. Long-term immune and cytogenetic effects of high level natural radiation on Ramsar inhabitants in Iran. *J Environ Radioact* 2004;74:107-116.
65. Nambi KS, Soman SD. Environmental radiation and cancer in India. *Health Phys* 1987;52:653-657.
66. Cardis E, Gilbert ES, Carpenter L, Howe G, Kato I, Armstrong BK, Beral V, Cowper G, Douglas A, Fix J, . Effects of low doses and low dose rates of external ionizing radiation: cancer mortality among nuclear industry workers in three countries. *Radiat Res* 1995;142:117-132.
67. Cardis E, Vrijheid M, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, Howe G, Kaldor J, Muirhead CR, Schubauer-Berigan M, Yoshimura T, Bermann F, Cowper G, Fix J, Hacker C, Heinmiller B, Marshall M, Thierry-Chef I, Utterback D, Ahn YO, Amoros E, Ashmore P, Auvinen A, Bae JM, Solano JB, Biau A, Combalot E, Deboodt P, Diez SA, Eklof M, Engels H, Engholm G, Gulis G, Habib R, Holan K, Hyvonen H, Kerekes A, Kurtinaitis J, Malker H, Martuzzi M, Mastauskas A, Monnet A, Moser M, Pearce MS, Richardson DB, Rodriguez-Artalejo F, Rogel A, Tardy H, Telle-Lamberton M, Turai I, Usel M, Veress K. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ* 2005;331:77.

68. Cardis E. Commentary: Low dose-rate exposures to ionizing radiation. *Int J Epidemiol* 2007;36:1046-1047.
69. Cardis E, Vrijheid M, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, Howe G, Kaldor J, Muirhead CR, Schubauer-Berigan M, Yoshimura T, Bermann F, Cowper G, Fix J, Hacker C, Heinmiller B, Marshall M, Thierry-Chef I, Utterback D, Ahn YO, Amoros E, Ashmore P, Auvinen A, Bae JM, Bernar J, Biau A, Combalot E, Deboodt P, Diez SA, Eklof M, Engels H, Engholm G, Gulis G, Habib RR, Holan K, Hyvonen H, Kerekes A, Kurtinaitis J, Malke H, Martuzzi M, Mastauskas A, Monnet A, Moser M, Pearce MS, Richardson DB, Rodriguez-Artalejo F, Rogel A, Tardy H, Telle-Lamberton M, Turai I, Usel M, Veress K. The 15-Country Collaborative Study of Cancer Risk among Radiation Workers in the Nuclear Industry: estimates of radiation-related cancer risks. *Radiat Res* 2007;167:396-416.
70. Leer JW, van HP, Seegenschmiedt H. Radiotherapy of non-malignant disorders: where do we stand? *Radiother Oncol* 2007;83:175-177.
71. Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066-1090.
72. Adams DO. Molecular interactions in macrophage activation. *Immunol Today* 1989;10:33-35.
73. Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005;6:1182-1190.
74. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995;9:866-873.
75. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-3287.
76. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990;343:757-760.
77. Sanders WE, Wilson RW, Ballantyne CM, Beaudet AL. Molecular cloning and analysis of in vivo expression of murine P-selectin. *Blood* 1992;80:795-800.
78. Weller A, Isenmann S, Vestweber D. Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem* 1992;267:15176-15183.
79. Issekutz AC, Lopes N. Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leucocyte transendothelial migration and modulation by interferon-gamma. *Immunology* 1993;79:600-607.
80. Eppihimer MJ, Wolitzky B, Anderson DC, Labow MA, Granger DN. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins in vivo. *Circ Res* 1996;79:560-9.
81. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MJ. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:9238-9242.
82. Jutila MA, Rorr L, Berg EL, Butcher EC. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: Comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol* 1989;143:3318-3324.
83. Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:2244-2248.

84. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245:1238-1241.
85. Foxall C, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA, Kiso M, Hasegawa A, Asa D, Brandley BK. The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol* 1992;117:895-902.
86. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel WJ, Grimley C, Fennie C, Gillett N, Watson SR, Rosen SD. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell* 1992;69:927-938.
87. Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, et al. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 1993;75:1179-1186.
88. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* 1992;118:445-456.
89. Ohmori K, Takada A, Yoneda T, Buma Y, Hirashima K, Tsyuoka K, Hasegawa A, Kannagi R. Differentiation-dependent expression of sialyl stage-specific embryonic antigen-1 and I-antigens on human lymphoid cells and its implications for carbohydrate-mediated adhesion to vascular endothelium. *Blood* 1993;81:101-111.
90. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-314.
91. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997;158:1825-1832.
92. Norris PG, Barker JN, Allen MH, Leiferman KM, MacDonald DM, Haskard DO, Hawk JL. Adhesion molecule expression in polymorphic light eruption. *J Invest Dermatol* 1992;99:504-508.
93. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson TRR. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992;140:665-673.
94. Cordell JL, Pulford K, Turley H, Jones M, Micklem K, Doussis IA, Tyler X, Mayne K, Gatter KC, Mason DY. Cellular distribution of human leucocyte adhesion molecule ICAM-3. *J Clin Pathol* 1994;47:143-147.
95. Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, Rosenbloom CL, Miyasaka M, Kvietys PR, Granger DN. Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 1995;269:H1955-H1964.
96. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon-gamma: Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986;137:245-254.
97. Staunton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989;339:61-64.
98. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler M, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990;60:577-584.
99. Strauch UG, Lifka A, Gosslar U, Kilshaw PJ, Clements J, Holzmann B. Distinct binding specificities of integrins alpha 4 beta 7 (LPAM-1), alpha 4 beta 1 (VLA-4), and alpha IEL beta 7. *Int Immunol* 1994;6:263-75.

100. Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in leukocyte homing. *Nature* 1988;331:41-6.
101. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC. L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1. *Nature* 1993;366:695-698.
102. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 1993;74:185-195.
103. Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA. EndoCAM: A novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1990;110:1227-37.
104. Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, Albelda SM, Larkin SW, Boughton-Smith N, Williams TJ, Nourshargh S. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *J Exp Med* 1996;184:229-39.
105. Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen (LFA-1). *Cell* 1987;51:813-819.
106. Panés J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999;129:1-14.
107. Bell RG, Issekutz T. Expression of a protective intestinal immune response can be inhibited at three distinct sites by treatment with anti-alpha 4 integrin. *J Immunol* 1993;151:4790-802.
108. Allavena P, Paganin C, Martin-Padura I, Peri G, Gaboli M, Dejana E, Marchisio PC, Mantovani A. Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J Exp Med* 1991;173:439-48.
109. Ibbotson GC, Doig C, Kaur J, Gill V, Ostrovsky L, Fairhead T, Kubes P. Functional alpha4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nat Med* 2001;7:465-470.
110. Holzmann B, McIntyre BW, Weissman IL. Identification of a murine Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an alpha chain homologous to human VLA-4 alpha. *Cell* 1989;56:37-46.
111. Tsuzuki Y, Miura S, Suematsu M, Kurose I, Shigematsu T, Kimura H, Higuchi H, Serizawa H, Yagita H, Okumura K, Ishii H. Alpha₄ integrin plays a critical role in early stages of T lymphocyte migration in Peyer's patches of rats. *Intl Immunol* 1996;8:287-95.
112. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von-Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC. Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413-422.
113. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-79.
114. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995;9:899-909.
115. Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995;80:529-32.
116. Beg AA, Baldwin AS, Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev* 1993;7:2064-70.

117. Read MA, Whitley MZ, Williams AJ, Collins T. NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation. *J Exp Med* 1994;179:503-12.
118. Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 1995;2:493-506.
119. Conner EM, Brand S, Davis JM, Laroux FS, Palombella VJ, Fuseler JW, Kang DY, Wolf RE, Grisham MB. Proteasome inhibition attenuates nitric oxide synthase expression, VCAM-1 transcription and the development of chronic colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1615-22.
120. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Büschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit NF-k B abrogates established experimental colitis in mice. *Nature Medicine* 1996;2:998-1004.
121. Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477-84.
122. Ardite E, Panés J, Miranda M, Salas A, Elizalde JI, Sans M, Arce Y, Bordas JM, Fernández-Checa JC, Piqué JM. Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor k B in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 1998;124:431-3.
123. Blackwell TS, Blackwell TR, Holden EP, Christman BW, Christman JW. In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 1996;157:1630-1637.
124. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1991;88:691-5.
125. Hallahan D, Clark ET, Kuchibhotla J, Gewertz BL, Collins T. E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;217:784-95.
126. Baeuml H, Behrends U, Peter RU, Mueller S, Kammerbauer C, Caughman SW, Degitz K. Ionizing radiation induces, via generation of reactive oxygen intermediates, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene transcription and NF kappa B-like binding activity in the ICAM-1 transcriptional regulatory region. *Free Radic Res* 1997;27:127-142.
127. Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, De La MC, Strong SA, Focchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996;157:1261-1270.
128. Sido B, Braunstein J, Breitzkreutz R, Herfarth C, Meuer SC. Thiol-mediated redox regulation of intestinal lamina propria T lymphocytes. *J Exp Med* 2000;192:907-912.
129. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis [see comments]. *Cell* 1993;75:263-274.
130. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-9.
131. Boirivant M, Pica R, DeMaria R, Testi R, Pallone F, Strober W. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 1996;98:2616-2622.
132. Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Strober W. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999;116:557-565.

133. Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001;22:21-26.
134. Veltkamp C, Tonkonogy SL, De Jong YP, Albright C, Grenther WB, Balish E, Terhorst C, Sartor RB. Continuous stimulation by normal luminal bacteria is essential for the development and perpetuation of colitis in Tg(epsilon26) mice. *Gastroenterology* 2001;120:900-913.
135. Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today* 1997;18:61-64.
136. Blumberg RS, Strober W. Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001;285:643-647.
137. Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Sheikholvaezin A, Johansson A, Lofroth PO, Johansson L, Stigbrand T. Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation. *Cancer* 2002;94:1210-1214.
138. Hallahan DE, Kuchibhotla J, Wyble C. Sialyl Lewis X mimetics attenuate E-selectin-mediated adhesion of leukocytes to irradiated human endothelial cells. *Radiat Res* 1997;147:41-7.
139. Hildebrandt G, Seed MP, Freemantle CN, Alam CA, Colville-Nash PR, Trott KR. Effects of low dose ionizing radiation on murine chronic granulomatous tissue. *Strahlenther Onkol* 1998;174:580-588.
140. Hildebrandt G, Radlingmayr A, Rosenthal S, Rothe R, Jahns J, Hindemith M, Rodel F, Kamprad F. Low-dose radiotherapy (LD-RT) and the modulation of iNOS expression in adjuvant-induced arthritis in rats. *Int J Radiat Biol* 2003;79:993-1001.
141. Hildebrandt G, Loppnow G, Jahns J, Hindemith M, Anderegg U, Saalbach A, Kamprad F. Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by low-dose X-irradiation in vitro. Is there a time dependence? *Strahlenther Onkol* 2003;179:158-166.
142. Kern P, Keilholz L, Forster C, Seegenschmiedt MH, Sauer R, Herrmann M. In vitro apoptosis in peripheral blood mononuclear cells induced by low-dose radiotherapy displays a discontinuous dose-dependence. *Int J Radiat Biol* 1999;75:995-1003.
143. Rodel F, Kamprad F, Sauer R, Hildebrandt G. [Functional and molecular aspects of anti-inflammatory effects of low-dose radiotherapy]. *Strahlenther Onkol* 2002;178:1-9.
144. Roedel F, Kley N, Beuscher HU, Hildebrandt G, Keilholz L, Kern P, Voll R, Herrmann M, Sauer R. Anti-inflammatory effect of low-dose X-irradiation and the involvement of a TGF-beta1-induced down-regulation of leukocyte/endothelial cell adhesion. *Int J Radiat Biol* 2002;78:711-719.
145. Schaeue D, Marples B, Trott KR. The effects of low-dose X-irradiation on the oxidative burst in stimulated macrophages. *Int J Radiat Biol* 2002;78:567-576.
146. Micke O, Haidenberger A, Auer T, Egger S, Seegenschmiedt MH, Hengster P, DeVries AF. Irradiation causes biphasic neutrophilic granulocyte phagocytic function. *Strahlenther Onkol* 2005;181:313-318.
147. Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Johansson A, Lofroth PO, Johansson L, Ahlstrom KR, Stigbrand T. Apoptosis in HeLa Hep2 cells is induced by low-dose, low-dose-rate radiation. *Radiat Res* 2002;158:634-640.
148. Hallahan D, Kuchibhotla J, Wyble C. Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res* 1996;56:5150-5.

149. Hertveldt K, Philippe J, Thierens H, Cornelissen M, Vral A, De RL. Flow cytometry as a quantitative and sensitive method to evaluate low dose radiation induced apoptosis in vitro in human peripheral blood lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1997;71:429-433.
150. Prasad AV, Mohan N, Chandrasekar B, Meltz ML. Activation of nuclear factor kappa B in human lymphoblastoid cells by low-dose ionizing radiation. *Radiat Res* 1994;138:367-372.
151. Hertveldt K, Robben J, Volckaert G. Whole genome phage display selects for proline-rich Boi polypeptides against Bem1p. *Biotechnol Lett* 2006;28:1233-1239.
152. Mohan N, Meltz ML. Induction of nuclear factor kappa B after low-dose ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. *Radiat Res* 1994;140:97-104.
153. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 1990;6:597-641.
154. Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:111-119.
155. Gamble JR, Vadas MA. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 1988;242:97-9.
156. Moses HL, Yang EY, Pietenpol JA. Regulation of epithelial proliferation by TGF-beta. *Ciba Found Symp* 1991;157:66-74.
157. Shah M, Revis D, Herrick S, Baillie R, Thorgeirson S, Ferguson M, Roberts A. Role of elevated plasma transforming growth factor-beta1 levels in wound healing. *Am J Pathol* 1999;154:1115-1124.
158. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:99-109.
159. Massague J. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 1987;49:437-438.
160. Ruscetti F, Varesio L, Ochoa A, Ortaldo J. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 1993;685:488-500.
161. Cartney-Francis NL, Wahl SM. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. *J Leukoc Biol* 1994;55:401-409.
162. Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4577-4581.
163. Gamble JR, Khew Goodall Y, Vadas MA. Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* 1993;150:4494-503.
164. Gamble JR, Vadas MA. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* 1991;146:1149-54.
165. Muller G, Behrens J, Nussbaumer U, Bohlen P, Birchmeier W. Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:5600-5604.
166. Barcellos-Hoff MH, Derynck R, Tsang ML, Weatherbee JA. Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland. *J Clin Invest* 1994;93:892-899.
167. Budras KD, Hartung K, Munzer BM. [Light and electron microscopy studies of the effect of roentgen irradiation on the synovial membrane of the inflamed knee joint]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 1986;99:148-152.

168. Fischer U, Kamprad F, Koch F, Ludewig E, Melzer R, Hildebrandt G. [The effects of low-dose Co-60 irradiation on the course of aseptic arthritis in a rabbit knee joint]. *Strahlenther Onkol* 1998;174:633-639.
169. Trott KR, Parker R, Seed MP. [The effect of x-rays on experimental arthritis in the rat]. *Strahlenther Onkol* 1995;171:534-538.
170. Von Pannewitz G. [Radiotherapy of arthrosis deformans. Method and results]. *Radiologe* 1970;10:51-54.
171. Von Pannewitz G. [On the roentgen therapy of inflammatory diseases]. *Med Welt* 1960;3:181-189.
172. Von Pannewitz G. [Die Röntgenotherapie der arthritis deformans]. *Ergebnisse der medizinischen Strahlenforschung* 1933;6:62-126.
173. Glenn JC. Further studies on the effects of X-rays on phagocytic indices of healthy rabbits. A preliminary report. *J Immunol* 1946;53:95-100.
174. Trott KR. Radiation risks from imaging of intestinal and abdominal inflammation. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1994;203:43-47.
175. Schae D, Jahns J, Hildebrandt G, Trott KR. Radiation treatment of acute inflammation in mice. *Int J Radiat Biol* 2005;81:657-667.
176. Fraker PJ, Speck JC. Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramine. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;80:849-856.
177. Davis MJ. Determination of volumetric flow in capillary tubes using an optical Doppler velocimeter. *Microvasc Res* 1987;34:223-230.
178. Lipowsky HH, Kovalcheck S, Zweifach BW. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circ Res* 1978;43:738-49.
179. Durelli L, Ferrio MF, Urgesi A, Poccardi G, Ferrero B, Bergamini L. Total body irradiation for myasthenia gravis: a long-term follow-up. *Neurology* 1993;43:2215-2221.
180. Goey H, Keller JR, Back T, Longo DL, Ruscetti FW, Wiltrout RH. Inhibition of early murine hemopoietic progenitor cell proliferation after in vivo locoregional administration of transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* 1989;143:877-80.
181. Wahl SM. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994;180:1587-1590.
182. Bessa X, Elizalde JI, Mitjans F, Pinol V, Miquel R, Panes J, Piulats J, Pique JM, Castells A. Leukocyte recruitment in colon cancer: role of cell adhesion molecules, nitric oxide, and transforming growth factor beta1. *Gastroenterology* 2002;122:1122-1132.
183. Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 1995;95:2510-2519.
184. Hauer JM, Poulakos L, Osborne JW. Intestinal complications following accelerated fractionated x-irradiation. An experimental study in the rat. *Acta Oncol* 1990;29:229-34.
185. Finkelstein JN, Johnston CJ, Baggs R, Rubin P. Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;28:621-631.

186. Hauer-Jensen M, Richter KK, Wang J, Abe E, Sung CC, Hardin JW. Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy. *Radiat Res* 1998;150:673-80.
187. Johnston CJ, Piedboeuf B, Baggs R, Rubin P, Finkelstein JN. Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Radiat Res* 1995;142:197-203.
188. Langberg CW, Hauer-Jensen M, Sung CC, Kane CJ. Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 1994;32:29-36.
189. Richter KK, Langberg CW, Sung CC, Hauer-Jensen M. Association of transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity with specific histopathologic lesions in subacute and chronic experimental radiation enteropathy. *Radiother Oncol* 1996;39:243-51.
190. Rube CE, Uthe D, Schmid KW, Richter KD, Wessel J, Schuck A, Willich N, Rube C. Dose-dependent induction of transforming growth factor beta (TGF-beta) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:1033-42.
191. Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;33:99-109.

