

CAPÍTULO IV

Proliferación en 3T3 y MCF-7

1.- Introducción

2.- Irradiación y cultivo de 3T3 y MCF-7

3.- Resultados en 3T3

4.- Resultados en MCF-7

5.- Discusión

1.- Introducción

La metodología general de estudio de los efectos de las radiaciones ionizantes sobre poblaciones celulares se basa en la irradiación de las células seguida de la medida de su proliferación en placas de cultivo hasta formar colonias observables o poder ser contadas individualmente. Como se ha mencionado antes, los resultados del efecto de dosis elevadas se expresan como curvas de supervivencia celular en función de la dosis. En este rango de dosis, un número escaso de experiencias con radón o radiación alfa, han mostrado efectos que no difieran cualitativamente de los observados para otros tipos de radiación usados más frecuentemente como rayos X o γ . Únicamente se han encontrado diferencias cuantitativas en la forma de la relación entre supervivencia y dosis relacionadas con la eficacia biológica relativa asociada a la radiación α [SCH92]. Los resultados encontrados en este tipo de estudios parecen apuntar hacia un mecanismo predominante como causa de los efectos observados. Tanto en la muerte como en la transformación (mutaciones, aberraciones, etc..) celular, la rotura de moléculas de ADN y ARN parece encontrarse como causa principal [CHE84]. Estas lesiones, producidas aleatoriamente, aparecen con una frecuencia que es proporcional a la dosis total absorbida por la célula.

Cuando se realiza el mismo tipo de estudios con dosis bajas de radiación, habitualmente se supone que los efectos producidos son los mismos que a dosis mayores, aunque afectados cuantitativamente por un factor de probabilidad dependiente de la dosis [SMI94]. Esta suposición de linealidad dosis-efecto hasta dosis nulas se basa en los criterios actualmente asumidos en radioprotección. Desde este punto de vista, se considera que existen probabilidades no nulas de ocurrencia de efectos como muerte o transformación maligna, incluso a dosis muy bajas.

Aunque esta interpretación es conceptualmente correcta, cuando se calculan las frecuencias de aparición de este tipo de efectos para dosis en torno a los valores ambientales promedio, se obtienen valores demasiado bajos como para ser observados [COH95, COH95b]. La propia variabilidad de las muestras biológicas da lugar a errores estadísticos que enmascaran la respuesta. En estudios epidemiológicos, a esta característica hay que añadir la influencia sobre la población de otros factores capaces de producir efectos con la misma intensidad que los estudiados.

Sin embargo, algunos trabajos han mostrado efectos distintos de los anteriores que aparecen con frecuencias detectables. A nivel celular, se sugieren efectos mediados por mecanismos tales como activación de sistemas enzimáticos de reparación de daños celulares, acción de radicales libres sobre diferentes estructuras celulares o alteraciones del potencial de membrana, entre otros [NAG96b, IKU85, WOL98, AND79]]. A escala orgánica, tanto en experimentación animal como en estudios sobre personas que viven en regiones de alto nivel de radiación o pacientes tratados en balnearios radiactivos se han observado efectos como estimulación del sistema inmunológico, aumento del ritmo de crecimiento y aumento de la esperanza de vida [TUS95, LUC80]. En estos casos, tanto el agente de irradiación como el orden de magnitud de las dosis promediadas son los mismos que los empleados en los experimentos que se describen a continuación.

Para estudiar el efecto que las bajas dosis de partículas alfa procedentes del radón y sus descendientes de vida corta producen en la evolución de una población celular, se irradiaron fibroblastos y células tumorales de mama humana. Estas líneas celulares se caracterizan por un crecimiento rápido, lo cual las convierte en un modelo útil de experimentación permitiendo estudiar cambios en su actividad proliferativa durante periodos de tiempo reducidos. En ninguna de estas dos líneas celulares se han realizado con anterioridad experimentos de irradiación con bajas dosis de radiación α .

2.- Irradiación y cultivo de MCF-7 Y 3T3

Los fibroblastos son de la línea 3T3 de ratón y las células tumorales de mama de una línea estable, MCF-7, obtenidas de efusión pleural de una paciente con carcinoma mamario metastásico [SOU84]. Las células fueron adquiridas de la American Tissue Type Culture Collection y mantenidas en cultivos monocapa en frascos de cultivo de 75 cm². El medio de cultivo empleado es el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) de la compañía Sigma Chemical, suplementado con un 5 % de suero fetal bovino (FBS), 20 unid./ml de penicilina, y 20 μ g/ml de estreptomicina, todo ello en atmósfera húmeda a 37 °C con un 5 % de contenido en CO₂. Las células fueron subcultivadas cada 3 o 4 días por suspensión en una disolución de 5 mM de Na₂-EDTA en solución salina buffer-fosfato (PBS) de pH 7.4, a 37 °C durante 5 minutos.

Antes de los experimentos, las células de los cultivos monocapa fueron incubadas en una disolución de NA2-EDTA con PBS, a 37 ° C durante 5 minutos, resuspendidas en DMEM suplementado con 5 % de FBS y pasadas a través de una aguja de calibre 25 varias veces para conseguir una suspensión de células separadas individualmente. Las células fueron ajustadas a una densidad de 300000 cel/placa, en placas de cultivo de 60x15 mm. El conteo del número de células viables y no viables, se realizó usando un pequeño volumen de la suspensión celular con 0.4 % de solución “trypan blue” y examinándolo con un hemocitómetro o cámara de Neubauer.

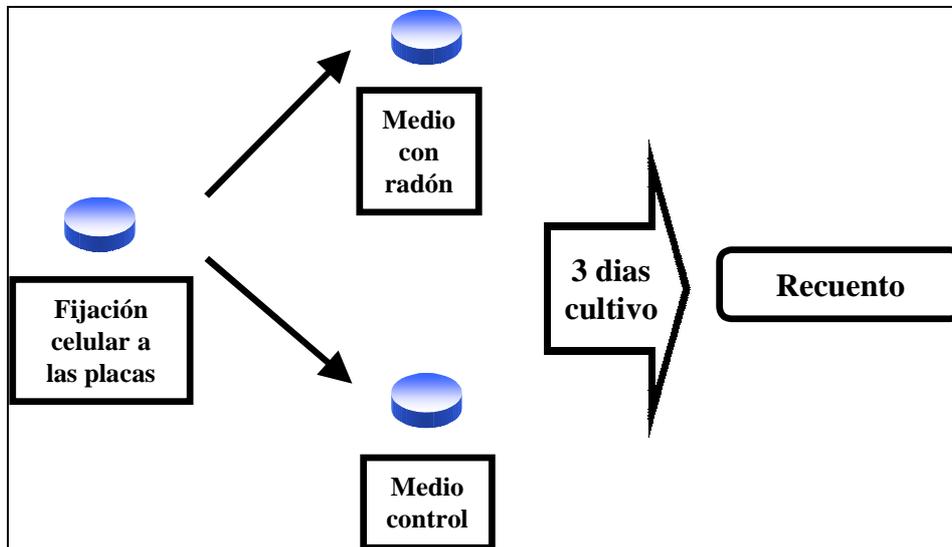


Fig. 4.1: Esquema de irradiación para análisis de crecimiento celular

Como se ha visto, la irradiación con partículas alfa se produce tras disolver el gas radiactivo radón en el medio de cultivo usando el dispositivo presentado. El radón generado en una fuente de radio (^{226}Ra), se difunde en el aire a través de un sistema cerrado hasta entrar en contacto con el medio de cultivo. La concentración de radón en el medio de cultivo depende del tiempo que el medio ha estado expuesto al radón generado en la fuente. Después de diferentes tiempos de exposición, los tubos conteniendo el medio de cultivo con radón se cierran herméticamente para medir la concentración de radón presente en los mismos.

Tras estas medidas, el líquido fue filtrado con el fin de asegurar su carácter aséptico, y se aspiró el medio de las placas de cultivo, sustituyéndolo por el medio fresco con radón. La última porción de cada tubo se conservó como testigo, midiendo su actividad por espectrometría gamma cada 30 min, en dos ocasiones. La comparación de los contajes obtenidos en estas dos medidas indicó que al final de la preparación de la placa la mayor parte del radón inicialmente disuelto se perdió, quedando en el medio únicamente sus descendientes de vida corta.

Las placas así preparadas se mantuvieron en la cámara de incubación a 37 °C durante 3 días. Después de este tiempo se realizaron los contajes del número de células por placa alcanzado. Posteriormente se recogió el medio de cultivo para medir la concentración final de radón y descendientes. Esta medida dio como resultado una concentración nula de elementos radiactivos, coherente con la existencia de una concentración inicial nula de radón y con la desintegración de todos los descendientes de vida corta presentes inicialmente en el cultivo.

En cada caso la dosis absorbida por los cultivos se calcula a partir de la concentración inicial de radón en equilibrio con sus descendientes. Dado que los cultivos se realizan en placas abiertas al ambiente, el radón inicialmente disuelto en el medio se escapa. Por lo tanto, únicamente quedan sus descendientes de vida corta ^{218}Po y ^{214}Po como responsables de la irradiación. Tanto la energía depositada por emisiones β y γ , como la probabilidad de emisión alfa de otros descendientes son tan bajas que su aportación a la dosis total no es significativa. Se asume también que todas las emisiones alfa dentro del cultivo depositan toda su energía en el mismo. En estas condiciones, la dosis total absorbida en el cultivo se calcula teniendo en cuenta las poblaciones iniciales de cada isótopo, así como sus respectivas energías de emisión alfa (6 MeV- ^{218}Po y 7.68 MeV- ^{214}Po). Los errores en la determinación de las dosis se derivan de los asociados a las medidas de la actividad de las muestras, y en ningún caso superaron el 10 % de los valores estimados.

3.- Resultados en 3T3

Con esta metodología experimental se realizaron 2 experiencias de irradiación celular con fibroblastos. En cada experiencia se utilizaron entre 4 y 6 placas para cada concentración inicial de radón disuelto, y otras tantas con placas de control, sin radón. En las dos experiencias se usaron 8 concentraciones de radón distintas, además de las placas de control, con un total de 50 placas.

La Figura 4.2 muestra los resultados, que describen la proliferación celular tras 3 días dependiendo de la dosis de radiación recibida por los cultivos. Cada punto de la gráfica representa el valor promedio del porcentaje de células supervivientes en seis placas de cultivo con la misma concentración de radón, con desviaciones estándar correspondientes a variaciones entre el 4 y el 10 % en el número de células contadas. Asimismo, los recuentos realizados en los cultivos de control están afectados por variaciones entre el 6 y el 10 %.

Para las ocho dosis empleadas en el rango comprendido entre 0.01 y 10 mGy, se observó que el crecimiento de estas células no se vio afectado por ninguna de ellas. Los valores más alejados en el porcentaje medio de células supervivientes con respecto a los controles fueron 107 y 91 % para dosis de 0.01 y 0.15 mGy respectivamente. La significación estadística de las diferencias encontradas se calculó por medio de un test t-Student de análisis de varianza con $p > 0.05$. En este rango de dosis, el crecimiento de las poblaciones de fibroblastos en presencia de medio de cultivo con radón resultó significativamente igual al de las poblaciones control en todas las placas. (Tabla 4.1)

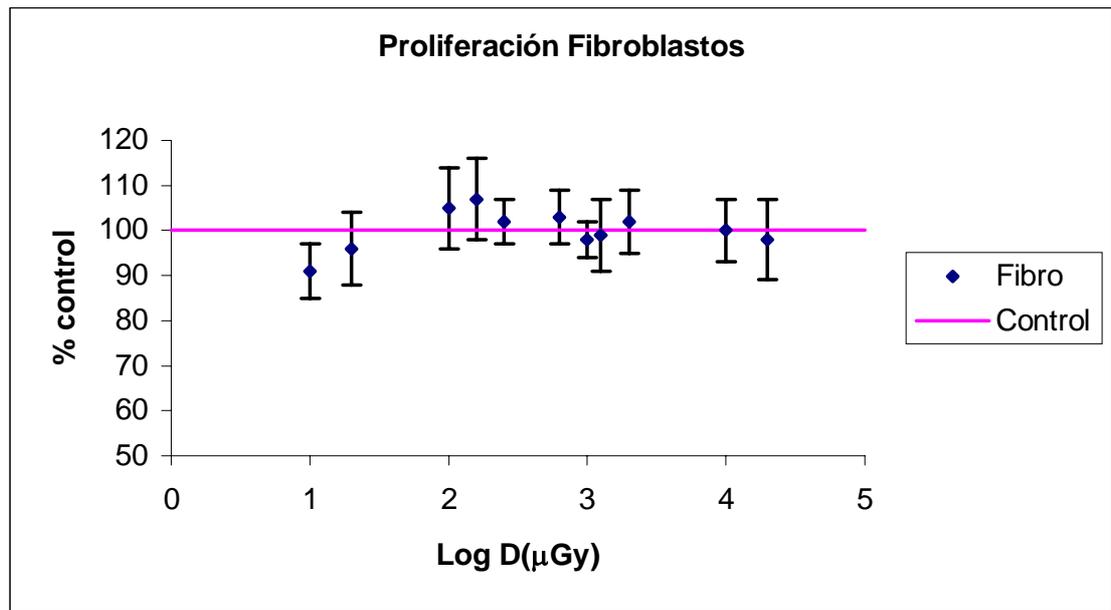


Fig. 4.2: Proliferación de poblaciones de fibroblastos para diferentes dosis de radiación

Dosis (mGy)	Control (%)	Desv. estándar	3T3 (% control)	Desv. estándar
0.01	100	6	91	6
0.02	100	7	96	8
0.1	100	8	105	9
0.15	100	9	107	9
0.25	100	6	102	5
1.00	100	10	98	4
2	100	7	102	7
10	100	6	100	7

Tabla 4.1: Proliferación celular tras irradiar fibroblastos 3T3 con diferentes dosis de radiación

4.- Resultados en MCF-7

Con el mismo esquema experimental se realizaron cuatro experiencias con células tumorales usando doce concentraciones de radón distintas que, junto con las placas de control comprendieron un total de 68 placas.

Al contrario que en los fibroblastos, se observó un efecto de reducción del número final de células en todas las experiencias con respecto a las poblaciones control (Tabla 4.2). La Figura 4.3 muestra valores medios del porcentaje de células supervivientes para las 12 dosis empleadas en el mismo rango que anteriormente. Al igual que en el caso de los fibroblastos, los porcentajes de las poblaciones de células supervivientes al cabo de tres días están afectados por el error correspondiente a la desviación estándar de los recuentos de, al menos, 4 placas con la misma dosis, es decir, entre el 4 y el 10%.

Como puede observarse en la Figura 4.3, existe en este caso una relación dosis efecto sobre las células. Tanto las dosis más bajas (0.01 mGy), próximas a las dosis nulas correspondientes a las poblaciones de control, como las mayores (15 mGy), producen el menor efecto observable. Sin embargo, para dosis intermedias, entre 0.1 y 1.2 mGy, los crecimientos de las poblaciones celulares resultaron muy inferiores a los de las poblaciones control, llegando a un 70% de éstas para una dosis de 1 mGy. A pesar de las pequeñas diferencias encontradas para las dosis extremo del intervalo estudiado, el grupo irradiado mostró una proliferación inferior al grupo de control con una elevada significación estadística de la diferencia entre ambas poblaciones ($p < 0.001$)

Este efecto antiproliferativo no mostró sin embargo, una relación de linealidad entre los valores de supervivencia celular y las dosis de radiación absorbidas en los cultivos. El mejor ajuste funcional a la forma de la curva experimental obtenida se consiguió con una regresión polinómica de 2º orden ($r = 0.622$, $p < 0.05$).

Dosis (mGy)	Control (%)	Desv. estándar	MCF-7 (% control)	Desv. estándar
0.01	100	7	87	7
0.02	100	5	78*	5
0.03	100	10	82	8
0.05	100	6	72*	4
0.10	100	8	90	6
0.25	100	6	87	7
0.60	100	10	71*	7
1	100	10	77*	5
1.25	100	7	75*	4
3.15	100	6	88	6
5	100	8	90	8
10	100	6	93	7
13	100	7	96	7
15	100	10	99	8

Tabla 4.2: Valores de proliferación tras irradiar células MCF-7 con diferentes dosis (* significativamente diferente del control, $p < 0.001$)

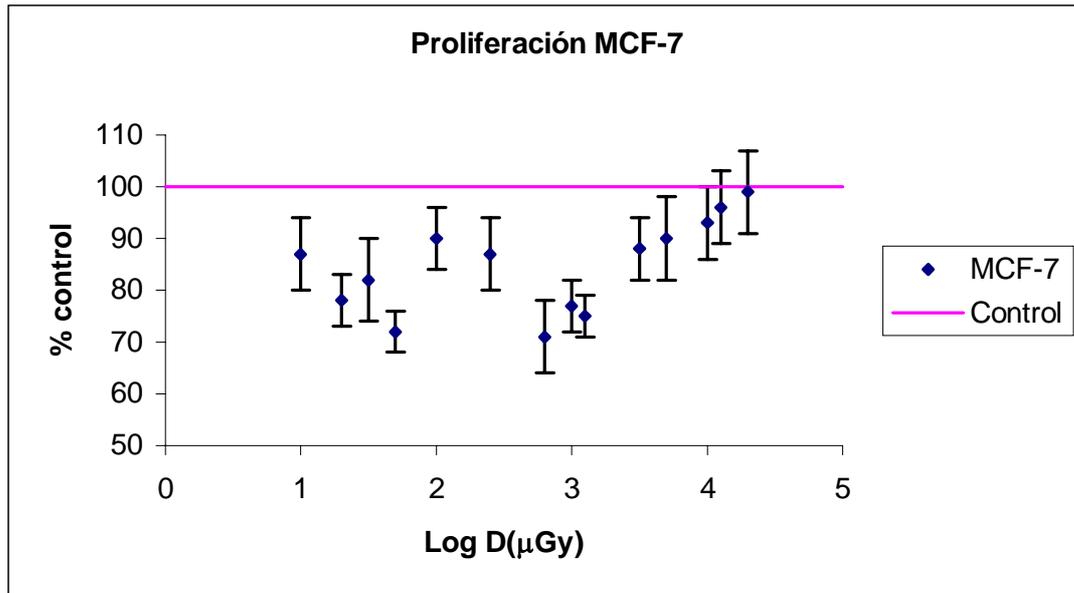


Fig 4.3: Proliferación de poblaciones de MCF-7 para diferentes dosis de radiación

5.- Discusión

Los efectos observados sobre las poblaciones celulares de fibroblastos pueden ser interpretados como una extrapolación de los que se encuentran a altas dosis de radiación. En este sentido, resulta razonable que dosis por debajo de 10 mGy no tengan un efecto significativo sobre el crecimiento de estas células, con lo que las poblaciones irradiadas evolucionarán igual que la población control.

Igualmente, resulta sorprendente que éste intervalo de dosis produzca algún tipo de efecto sobre las células tumorales de mama. Para dosis por debajo de 10 mGy se observan disminuciones de hasta el 40 % con respecto a los cultivos de control. Sin embargo, este resultado no parece ser solamente consecuencia de la mayor radiosensibilidad de las células, ya que se observa que la radiación produce efectos más notables para dosis intermedias que para dosis elevadas. Este hecho no parece extrapolable a partir de la relación dosis efecto observable a altas dosis. En este sentido, el ajuste lineal de los valores experimentales obtenidos daría lugar a una D_0 de menos de 0.1 mGy, valor contradictorio con el resto de los resultados. Además el intervalo de

dosis empleado es de más de dos ordenes de magnitud, es decir, suficientemente amplio como para haber encontrado una relación monótona entre supervivencia y dosis.

Como ya se mencionó en la introducción, se han descrito experiencias en las que la irradiación con dosis bajas produce efectos no lineales, no extrapolables de los que se obtiene para dosis altas [LUC80]. En la mayoría de los casos se obtiene como resultado de la irradiación un efecto estimulante en las poblaciones celulares irradiadas. Los resultados, contrarios a estas observaciones, encontrados por nosotros podrían justificarse en el distinto metabolismo de las células cancerosas con respecto a las células normales.

Resulta poco probable que el mecanismo responsable de la reducción en el crecimiento de los cultivos irradiados de MCF-7 sea la muerte por necrosis, ya que las dosis empleadas son demasiado bajas como para inducir este efecto. Sin embargo, es plausible que la respuesta encontrada esté relacionada con una detención del ciclo celular antes de la mitosis [GIL94], o incluso, con la inducción de apoptosis por acumulación de lesiones no reparadas [GIB94]. Normalmente en las células tumorales los mecanismos de detección y reparación de daños en el ADN no funcionan adecuadamente o están inutilizados, por lo que la inducción de apoptosis es probable, incluso a bajas dosis.

A pesar de lo anterior, en nuestras condiciones de irradiación, el porcentaje de células alcanzadas por partículas α procedentes del radón y sus descendientes disueltos en el medio de cultivo es muy bajo. Por lo tanto, el efecto causado por interacciones directas con el ADN no parece ser suficiente para justificar los resultados encontrados. Una explicación más completa debería incluir la formación de radicales libres por la radiación, y la acción de éstos en estructuras celulares diferentes del ADN como las membranas biológicas [SOT96].

Junto al hecho del bajo porcentaje de células alcanzadas por partículas alfa, está la observación de efectos que se manifiestan en todo el cultivo. Este efecto general extendido a células no irradiadas se denomina “efecto bystander” [GRO99] y no es exclusivo de la radiación. Ha sido observado con otros agentes físicos y químicos, e incluso con adenovirus empleados para infectar células tumorales y sensibilizarlas a la

acción de fármacos específicos. Para las bajas dosis de radiaciones de alta LET, el efecto bystander ha sido explicado a través de diversos mecanismos. Uno de ellos es la generación de especies reactivas del oxígeno [NAR97]. También se ha propuesto la liberación por parte de las células afectadas de citoquinas y otros factores extracelulares [LEH97] capaces de aumentar los niveles intracelulares de radicales libres en las células no irradiadas. Finalmente, también se ha postulado la transmisión del efecto a través de las denominadas uniones tipo GAP o conexiones intercelulares, aunque esta explicación no parece plausible en el caso de células tumorales, en las cuales este tipo de comunicación no funciona adecuadamente [YAN98, AZZ98].

Es interesante comparar las dosis y los efectos que aparecen en estos experimentos con las que recibe el hombre por causas naturales. Esta comparación no resulta sencilla por dos razones principales. Por un lado, existe una gran variabilidad en las dosis que el hombre puede recibir de fuentes naturales. Además, la estimación de los efectos producidos por dichas dosis suele realizarse a través de estudios epidemiológicos, de metodología muy diferente a la empleada in vitro. Sin embargo, la comparación también cobra interés por la fuente de radiación empleada. La irradiación se hace por partículas alfa procedentes de los descendientes de vida corta del radón, que es el mismo agente que produce la irradiación del sistema respiratorio en las poblaciones humanas expuestas.

En el caso de mayores dosis absorbidas se encuentran las poblaciones de mineros expuestas a concentraciones elevadas de radón [BEI88]. Las dosis recibidas por estas personas se suelen calcular como suma de las recibidas durante toda su vida laboral y son de varios órdenes de magnitud superiores a las usadas en nuestros experimentos. Los estudios epidemiológicos realizados en las poblaciones expuestas señalan una mayor frecuencia de aparición de cáncer de pulmón en mineros que en la población en general.

Las dosis más bajas absorbidas por el hombre en su entorno natural se estiman en un promedio de 2 mSv/año. De este valor, más de la mitad se atribuye a la irradiación producida por los descendientes del radón existente en el aire del interior de las viviendas. En consecuencia, las dosis liberadas al sistema respiratorio debidas al

radón durante un año son del mismo orden de magnitud que las utilizadas en nuestros experimentos.

Otro punto de comparación, intermedio de los dos anteriores, es el caso de dosis recibidas en las regiones de alto nivel de radiación natural. Estimando que estas dosis son entre diez y cien veces superiores a las dosis promedio recibidas por la población, los habitantes de estas regiones están sometidos en tiempos comprendidos entre un mes y una semana a dosis semejantes a las utilizadas en los experimentos presentados. Los estudios epidemiológicos llevados a cabo en estas regiones muestran resultados no concordantes, encontrándose tanto incrementos como disminuciones de la frecuencia de cáncer de pulmón en las poblaciones estudiadas.