

EFFECTOS NO CONVENCIONALES DE LAS RADIACIONES IONIZANTES Y SU POTENCIAL IMPLICACIÓN EN LA PROTECCIÓN RADIOLÓGICA DEL PACIENTE

Almudena Real Gallego



SIMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE PROTECCIÓN RADIOLÓGICA DEL PACIENTE
Málaga, 2-4 Octubre 2006

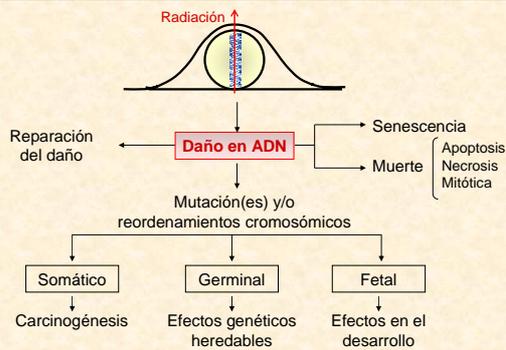
Blanco crítico de los efectos de la radiación ionizante

- ▶ Zirkle y Bloom en 1953: la muerte celular era dependiente de la irradiación del núcleo, existiendo poca citotoxicidad cuando sólo el citoplasma era irradiado. **El núcleo es el blanco de acción de la radiación.**
- ▶ Posteriormente, el interés se centró específicamente en la **molécula de ADN** con el descubrimiento de los mecanismos de reparación celular en 1964.
- ▶ En 1977: relación directa entre la regulación de la reparación del ADN y los efectos citotóxicos de la radiación.
- ▶ Técnicas que permitían la exposición a radiación localizada en el ADN (¹²⁵I-deoxiuridina): gran efecto mutagénico y citotóxico.

Paradigma de la Radiobiología:

El blanco crítico en la célula irradiada es la molécula de ADN. Los efectos biológicos se producirán en las células irradiadas como consecuencia del daño en el ADN no reparado

Efectos biológicos de la radiación ionizante



"Jaque" al paradigma

1992 Nagasawa y Little

Aumento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en cerca del 30% de las células de una población en la que menos del 1% de los núcleos habían sido atravesados por una partícula alfa.

Pueden aparecer efectos genéticos en células que no han sufrido una irradiación directa, pero están próximas a las células que si han sido directamente irradiadas.



Efectos circunstantes ("bystander")

Efectos circunstantes

Reseña histórica de efectos circunstantes

1953	Mole	Efectos abscopales
1970	Inmunología y terapia génica	Término "bystander"
1992	Nagasawa y Little	Efectos circunstantes y radiación ionizante



Ciemat

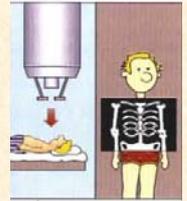
Efectos abscopales

Los radioterapeutas observaron que tejidos que se encontraban fuera del haz de radiación de sus equipos de radioterapia respondían como si estuvieran siendo irradiados, desconociéndose la causa.

Abscopal del latín

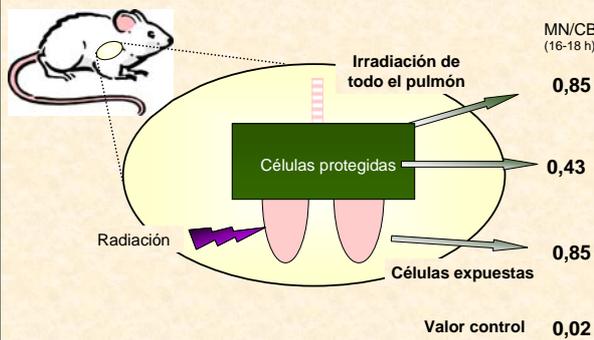
Ab: posición alejada de
Scopus: marca o blanco

Efectos fuera del blanco



Ciemat

Efectos abscopales



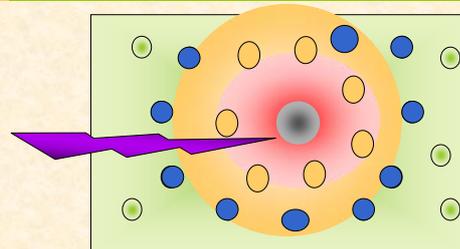
Khan y col. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 40(2): 467-476 (1998)



Ciemat

Efectos circunstantes radioinducidos

Cuando una célula es dañada por radiación, puede enviar señales a células a que se encuentran próximas a ella



Las señales enviadas por las células dañadas pueden alterar el funcionamiento normal de sus células vecinas, o puede estimularlas a responder con señales adicionales hacia la célula dañada o hacia otras células cercanas.

Ciemat

Efectos circunstantes *in vitro*

► Irradiadores de partículas alfa a flujos bajos

Aumento en la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas en cerca del 30% de las células de una población en la que menos del 1% de los núcleos habían sido atravesados por una partícula alfa.

- Muerte celular
- Mutaciones
- Aberraciones cromosómicas
- Transformación celular
- Expresión de genes

La expresión de los efectos circunstantes depende de:

- Tipo de célula
- Factores genéticos

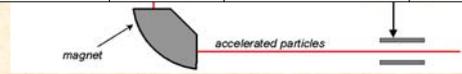


Ciemat

Efectos circunstantes *in vitro*

► Irradiadores de microhaces

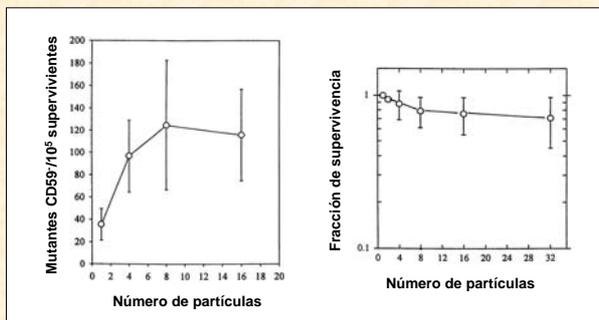
Centro	País	Radiación	LET (keV/μm)
Columbia University	EE.UU.	Partículas alfa	30-220
Gray Cancer Institute	Reino Unido	Iones He-3 Rayos-X ultra blandos	100
Atomic Energy Research Center	Japón	Elementos de alto n° atómico (Ar, Ne)	380-1.260



Ciemat

Efectos circunstantes *in vitro*

► Irradiación del citoplasma (microhaz)

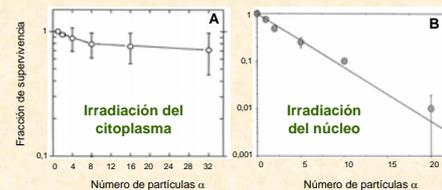


Ciemat

Efectos circunstantes *in vitro*

► Irradiación del citoplasma: Conclusiones

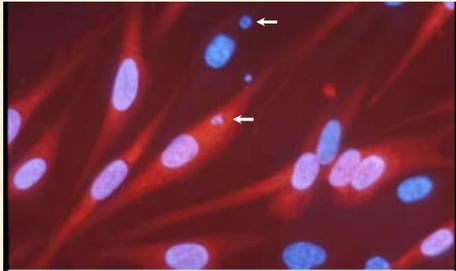
- El blanco de los efectos genéticos era mayor que el núcleo.
- La irradiación del citoplasma con partículas alfa puede ser más peligrosa que la irradiación del núcleo, ya que al aumentar el n° de partículas que atraviesan el citoplasma aumenta la mutagenicidad pero no la mortalidad celular



Ciemat

Efectos circunstantes *in vitro*

► Inducción de micronúcleos en células circunstantes



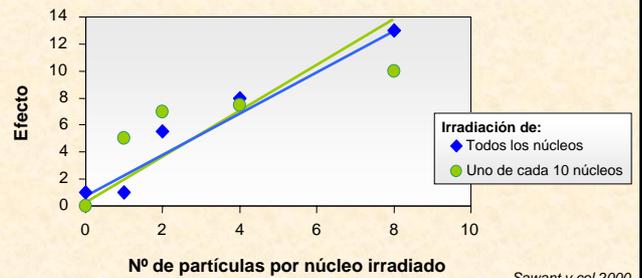
- Sólo los núcleos de células teñidas de rosa han sido atravesados por partículas α .
- MN no sólo en las células irradiadas (rosa) sino también en las no expuestas (azul).



Ciemat

Efectos circunstantes *in vitro*

► Transformación celular en células circunstantes



Sawant y col.2000



Ciemat

Efectos circunstantes *in vivo*

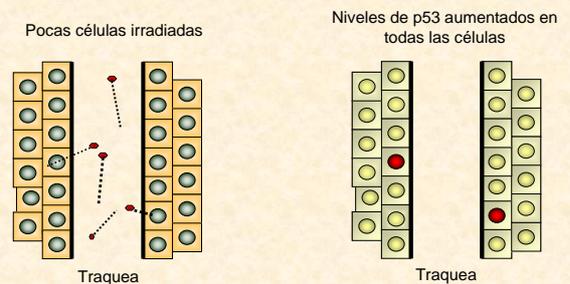
Efecto	Sistema celular	Radiación
Aberraciones cromosómicas	Hámster chino (ovario e hígado)	Partículas de $^{239}\text{PuO}_2$ Partículas alfa
	Células de M.O. de ratón	Neutrones
Frecuencia de micronúcleos	Pulmón de rata	Rayos gamma
Movilización de calcio, niveles de fosfatasa alcalina, desarrollo embrionario	Incisivos de rata, tiroides, abdomen	Rayos-X
Activación de macrófagos, "burst" respiratorio, infiltración de neutrófilos	Ratones p53-/-	Rayos gamma
Crecimiento de tumores	Células humanas de adenocarcinoma de colon	Partículas beta (Yodo)
	Ratones C57BL/6	Rayos gamma



Ciemat

Efectos circunstantes *in vivo*

► Efecto circunstante en epitelio traqueal de rata inducido por radón



Ciemat

Efectos circunstantes *in vivo*

A tasas de dosis bajas el efecto circunstante se limita al tejido u órgano irradiado

El sitio en el que se deposita el radionucleido es el sitio donde se induce el cáncer

- ^{90}Sr – cáncer de hueso
- ^{144}Ce – cáncer de hígado/hueso
- $^{239}\text{PuO}_2$ (inhalado)- cáncer de pulmón



Ciemat Centro de Investigaciones Energéticas, Nucleares y Medioambientales

Efectos circunstantes

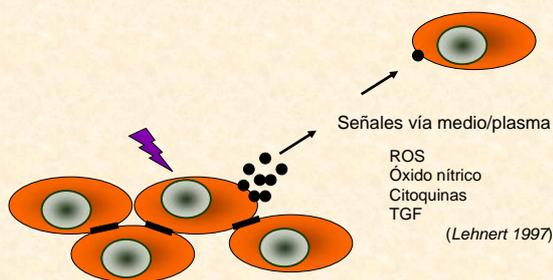
- ▶ Evidencias sólidas en humanos y animales de laboratorio de que células que no han sufrido una irradiación directa pueden manifestar efectos genéticos, cuando se encuentran próximas a aquellas células que han sido atravesadas por una trayectoria de radiación.

¿Cómo se producen los efectos circunstantes?



Ciemat Centro de Investigaciones Energéticas, Nucleares y Medioambientales

Efectos circunstantes



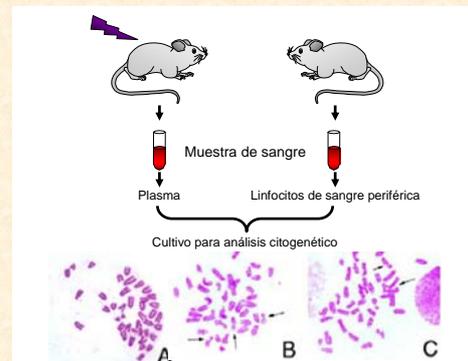
Señales vía uniones intercelulares
(Azamm 2001)

Años 50
Trabajos de factores clastogénicos en sangre de individuos irradiados



Ciemat Centro de Investigaciones Energéticas, Nucleares y Medioambientales

Factores clastogénicos



Ciemat Centro de Investigaciones Energéticas, Nucleares y Medioambientales

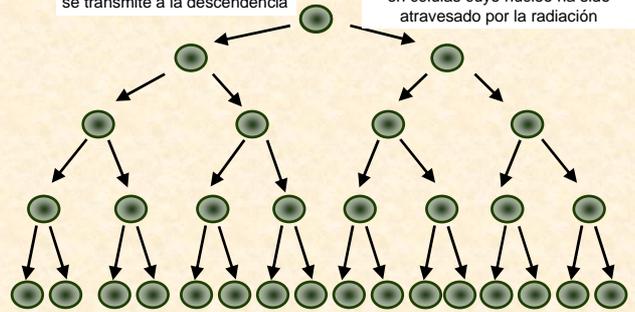
Efectos circunstantes: Conclusiones

- ▶ La exposición de las células a radiación puede inducir cambios en células que no han sido atravesadas por una trayectoria de ionización.
- ▶ No muestran una relación lineal con la dosis. Se inducen de forma máxima a dosis muy bajas, "saturándose" a dosis más altas.
- ▶ Son consecuencia de la comunicación entre las células, ya sea por contacto o mediante factores liberados.
- ▶ A tasas de dosis bajas se han descrito efectos circunstantes *in vivo*, estando estos limitados al tejido expuesto a la radiación.
- ▶ Los efectos inducidos por la radiación en células circunstantes son eventos muy frecuentes, sugiriendo la implicación de todo el tejido.
- ▶ La existencia de estos efectos indica que el cáncer radioinducido no es sólo un evento celular, sino una respuesta tisular u orgánica.
- ▶ El descubrimiento de estos efectos ha contribuido a que cambie el principal paradigma de la radiobiología.

Paradigma de Radiobiología

El daño fijado en el ADN de la célula irradiada, si no es letal, se transmite a la descendencia

Los efectos se producen en células cuyo núcleo ha sido atravesado por la radiación



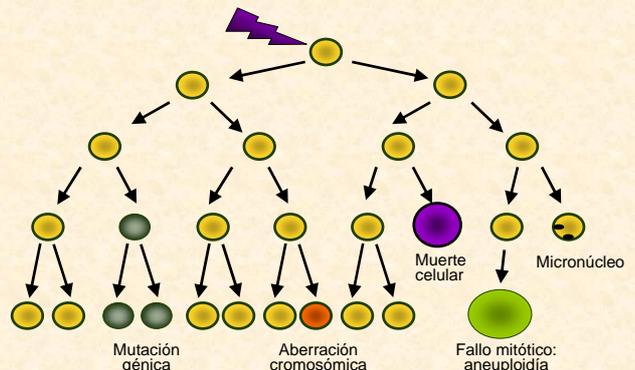
Inestabilidad genómica

▶ Kennedy y col. 1980: Experimento de transformación neoplásica

- Los focos de transformación no procedían de una única célula dañada por irradiación.
- La radiación parecía inducir inestabilidad en un alto porcentaje de la población irradiada (20-30%), aumentando la probabilidad de que ocurriera un segundo evento de transformación neoplásica en uno o más de los descendientes de la célula irradiada, después de muchas divisiones celulares.
- El segundo evento era poco frecuente (10^{-6}) y tenía las características de un evento mutacional (ocurría a una frecuencia constante por célula y generación).

Los focos de transformación neoplásica no se originaban a partir de la célula irradiada sino a partir de uno o más de sus descendientes.

"Jaque" al paradigma



Inestabilidad genómica

Hipótesis

La radiación puede inducir un tipo de inestabilidad en el genoma de una fracción relativamente grande de la población irradiada, lo que lleva a un aumento en la frecuencia con la que tienen lugar cambios genéticos en la progenie de la célula inicialmente irradiada. El fenotipo inestable podría persistir muchas rondas de división celular después de la exposición a radiación.



Ciemat

Inestabilidad genómica

- ▶ Diversos sistemas experimentales
- ▶ Distintos efectos biológicos:

- Mutaciones
- Aberraciones cromosómicas
- Muerte celular
- Expresión de genes



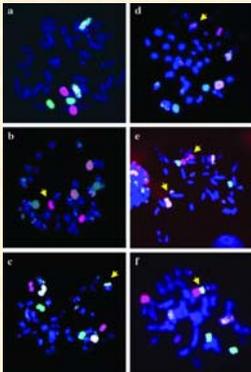
Ciemat

Inestabilidad genómica

▶ Inestabilidad cromosómica

Metafasas de un clon inestable, C-32, superviviente a 10 Gy de rayos-X.

Hibridación con sondas para:
 - cromosoma 4 (biotina y digoxigenina, azul)
 - cromosoma 13 (digoxigenina, rosa)
 - cromosoma 16 (biotina, verde).

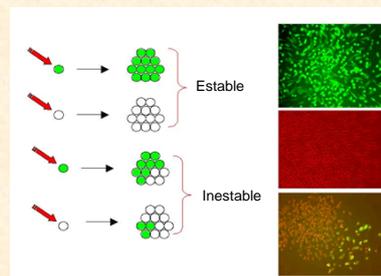


(A) Subpoblación con cariotipo normal (dos copias de los cromosomas 4, 13 y 16).
 (B-F) Cromosomas en metafase mostrando diferentes reordenamientos (flechas)



Ciemat

Inestabilidad genómica



Colonia estable: todas las células son verdes o claras,

Colonia inestable: mezcla de células verdes y claras

Inestabilidad genómica en el locus *GFP* en células RK036 que pueden ser GFP⁺ (verde) o GFP⁻ (clara).



Ciemat

Inestabilidad genómica *in vivo*

- ▶ **Estudios en animales de laboratorio**
- ▶ **Estudios en humanos:**
 - Inestabilidad genómica y cánceres secundarios en pacientes tratados con radioterapia por cáncer
 - Pacientes que recibieron tratamiento con "Thorotrast"
 - Tumores sólidos desarrollados tras radioterapia en pacientes con retinoblastoma
- ▶ **Relación con las leucemias inducidas por radiación**
 - Supervivientes de Hiroshima y Nagasaki con leucemia: inestabilidad cromosómica persistente.

Concluyen que la inestabilidad genómica persistente influye fuertemente en el desarrollo de leucemia en humanos expuestos a radiación.

No está claro que la inestabilidad esté relacionada con la dosis recibida.



Inestabilidad genómica: Conclusiones

- ▶ Los distintos **fenotipos asociados con la inestabilidad genómica** están relativamente bien caracterizados.
- ▶ **No hay una relación dosis-respuesta clara.** A dosis altas "saturación".
- ▶ Los datos disponibles apuntan a que la inestabilidad genómica es **independiente de la tasa de dosis y de la calidad de la radiación.**
- ▶ Los **eventos moleculares, bioquímicos y celulares que inician y perpetúan** la inestabilidad genómica siguen siendo desconocidos.
- ▶ La **frecuencia con la que se produce la inestabilidad genómica** es muy superior a la frecuencia de mutación a dosis similares, por lo que es poco probable que una mutación en un gen o familia de genes sea la responsable del fenotipo inestable.
- ▶ La inestabilidad genómica podría tener un **papel importante en el proceso carcinogénico radioinducido.**



Relación entre ambos efectos

▶ Efectos circunstantes vs inestabilidad genómica

Diferencias:

La **inestabilidad genómica** ocurre en la descendencia lejana de la célula irradiada, mientras los **efectos circunstantes** ocurren casi inmediatamente en las células próximas que reciben las señales circunstantes.

Semejanzas:

- Los **mismos efectos** observados: reordenamiento cromosómico, micronúcleos, mutaciones, transformación neoplásica y muerte celular.
- Las **mutaciones** observadas son similares en cuanto a su estructura molecular, siendo principalmente mutaciones puntuales.
- Parece haber una regulación positiva del **estrés oxidativo** (aumento de ROS).

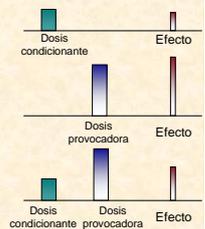
Cada vez hay más evidencias que sugieren que ambos fenómenos están ligados. Es probable, dado que los efectos observados son los mismos, que ambos fenómenos puedan ser manifestaciones de un mismo proceso(s) no-dirigido(s).



Respuesta adaptativa

▶ Respuesta adaptativa

- Células expuestas a una dosis baja de radiación, dosis "adaptadora" de pocos cGy, se vuelven menos susceptibles a posteriores exposiciones a dosis altas de radiación, una dosis "retadora" de varios Gy.
- **Olivieri en 1984:** Linfocitos humanos, inducción de aberraciones cromosómicas
- Respuesta adaptativa relacionada con descenso en muerte celular, formación de MN y SCE, mutaciones y transformación.
- Respuesta adaptativa tras exposición clínica, medio ambiental u ocupacional a radiación.
- **Mecanismo:** las dosis bajas aumentan la capacidad de reparación del ADN y la actividad antioxidante, lo que da lugar a una respuesta celular más hábil en retos posteriores.

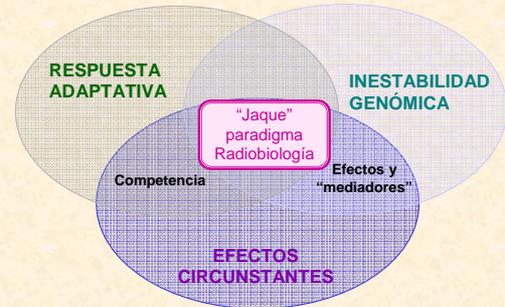


Efectos circunstantes y respuesta adaptativa

- ▶ Los efectos circunstantes inducidos por radiación **competirían** con una respuesta adaptativa
- ▶ La exposición de células a una dosis baja de rayos X, 4 horas antes de la irradiación con partículas alfa, **disminuía significativamente la respuesta mutagénica circunstante**. Además las células circunstantes mostraron una sensibilidad aumentada a irradiaciones posteriores con dosis altas de rayos-X.
- ▶ Para transformación oncogénica, pero no para supervivencia celular, la **adaptación a radiación podía ocurrir en células no irradiadas** vía señales transmisibles.



Efectos no convencionales



Implicaciones en PR

▶ Inestabilidad genómica y efectos estocásticos

- La **carcinogénesis** implica una progresión de eventos genéticos que están asociados con estadios específicos del proceso de malignización.

Es tentador especular que la inestabilidad genómica puede dirigir la progresión de cambios genéticos y por tanto proporcionar el impulso para adquirir las alteraciones genéticas asociadas con la carcinogénesis

El concepto de inestabilidad inducida como paso inicial en la carcinogénesis es consistente con resultados de estudios epidemiológicos, que sugieren que algunos cánceres radioinducidos pueden seguir un modelo de riesgo relativo, es decir, una dosis determinada de radiación aumenta la tasa a la que se desarrolla dicho cáncer, en lugar de inducir nuevos tumores.

- **Efectos heredables:** la inestabilidad genómica podría transmitirse por la línea germinal y aumentar la susceptibilidad de la descendencia a desarrollar cáncer o efectos genéticos.



Implicaciones en PR

▶ Riesgo de dosis bajas y efectos circunstantes

Sin embargo, los **efectos circunstantes parecen estar limitados al órgano irradiado**, y puesto que los riesgos se estiman en un órgano no en una célula, los efectos circunstantes están esencialmente abarcados en las actuales estimaciones de riesgo de cáncer

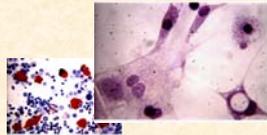


Implicaciones en PR

► Re-examinar los conceptos de dosis y tamaño del blanco

- Los efectos circunstantes en esencia "amplifican" la efectividad biológica de una dosis de radiación dada. La **dosis de radiación** a bajas fluencias de partículas bajas o a dosis bajas de radiación gamma o X puede no ser un concepto tan significativo como a dosis altas.

- Muchos de los efectos indirectos descritos indican que el **blanco** para los efectos perjudiciales de la radiación puede ser mucho mayor que el volumen irradiado, lo que tendría implicaciones par ala salud de las personas.



Implicaciones en radioterapia

En casos de utilizar tratamientos con múltiples campos, el volumen que recibe la máxima dosis de radiación se diseña cuidadosamente. Los efectos circunstantes introducen incertidumbres en esta **dosimetría**, especialmente en los extremos del área de irradiación

Puede que sea necesario redefinir lo que entendemos por "campo" y considerar una "**penumbra biológica**" al igual que una penumbra física.



Será necesario determinar hasta que punto los efectos circunstantes contribuyen en los perfiles de respuesta globales de las células tras irradiación.



Preguntas sin resolver

► ¿Cuales son las señales transmitidas desde las células irradiadas a las células circunstantes?

- ¿El factor soluble liberado al medio desde las células irradiadas es el mismo del que se transmite de célula a célula?
- ¿Hay diferentes factores o señales?
- ¿En que tiempos se liberan las señales?

► ¿Hay efectos beneficiosos asociados con la respuesta circunstante?

► Efectos circunstantes y radiación de baja LET

Aún hay pocos datos sobre Efectos circunstantes inducidos por radiación de baja LET, para dosis inferiores <mGy.

Es de esperar que esa información se obtenga en los próximos años con el desarrollo de microhaces para estas radiaciones.

