

Radiobiología

Revista electrónica

ISSN 1579-3087

<http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/radiobiologia.htm>

[http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/numeros/RB5\(2005\)100-103.pdf](http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/numeros/RB5(2005)100-103.pdf)

Radiobiología 5 (2005) 100-103

Estudio *in vitro* de terapia combinada con bajas dosis de radiación (Rn-222) y quimioterapia (taxol)

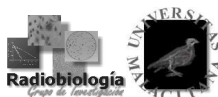
J. Soto, C. Sainz, S. Cos, D. González-Lamuño

Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander, España

Recibido 4 julio 2005; aceptado 20 julio 2005



Edita: Grupo de Investigación de Radiobiología.
Dpto. Radiología y Medicina Física. Universidad
de Málaga (España)



Editor: Grupo de Investigación de Radiobiología
Dpto. Radiología y Medicina Física
Universidad de Málaga (España)

Radiobiología 5 (2005) 100-103

Radiobiología

Revista electrónica

<http://www-rayos.medicina.uma.es/rmf/radiobiologia/revista/radiobiologia.htm>

Estudio *in vitro* de terapia combinada con bajas dosis de radiación (Rn-222) y quimioterapia (taxol)

J. Soto, C. Sainz, S. Cos, D. González-Lamuño

Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander, España

Recibido 4 julio 2005; aceptado 20 julio 2005

Resumen

Se ha realizado un estudio para comprobar la posibilidad de que células tumorales de mama aumenten su sensibilidad al quimioterápico taxol cuando son tratadas previamente con bajas dosis de radiación producidas por el gas radón. Para ello las células se cultivan en un medio que contiene radón disuelto y, posteriormente, en otro que contiene una concentración del quimioterápico. Terminada la fase del cultivo se mide la supervivencia de las células y su viabilidad. Los resultados obtenidos señalan que las células tratadas con bajas dosis de radiación, próximas a 3 mGy, exhiben una sensibilidad aumentada cuando son tratadas después con determinadas concentraciones de taxol, próximas a 50 nM, disminuyendo su porcentaje de supervivencia con respecto al control y su viabilidad. Estos resultados parecen estar relacionados con un efecto del radón sobre la expresión de genes relacionados con la apoptosis celular, complementaria de la actuación del taxol sobre genes relacionados con bcl-2

Palabras clave: taxol, radón, radiación alfa, MCF-7

INTRODUCCIÓN

El tratamiento quimioterápico del paciente oncológico está limitado por la necesidad de que las dosis del agente químico empleado sean lo mas bajas posible para minimizar el efecto sobre las células sanas y los efectos secundarios. Esta necesaria minimización de la dosis del quimioterápico está contrapuesta al hecho de que algunos tumores adquieren una gran resistencia al agente químico por mecanismos relacionados con la modificación de la expresión de genes relacionados con la apoptosis, (Dole et al. 1994).

Para aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la acción de los quimioterápicos se puede recurrir a la actuación previa sobre ellas de distintos agentes que modifiquen su expresión génica. En anteriores experiencias hemos encontrado que las bajas dosis de radiación producidas por el gas radiactivo radón (^{222}Rn) disuelto en el medio de cultivo celular tienen un efecto importante en el crecimiento de poblaciones de células tumorales MCF-7, (Soto et al. 1996). Posteriormente hemos encontrado que, en las mismas condiciones, las células irradiadas expresan genes de apoptosis en proporciones diferentes que las células no irradiadas, (Soto et al. 1997). Por ello, hemos realizado una serie de experiencias, que se describen en el presente trabajo, para determinar si las modificaciones producidas por la irradiación con radón de células MCF-7 modifican la sensibilidad celular al quimioterápico taxol.

Correspondencia: Carlos Sainz (sainzc@unican.es)

MATERIAL Y MÉTODOS

Para estudiar si existe una modificación por el radón de la sensibilidad de las células tumorales hemos usado la línea estable MCF-7 de cáncer de mama humano. Las células se mantienen en cultivos monocapa a 37 °C y son cultivadas cada 3-4 días por suspensión para eliminación de las células muertas. Antes de cada experiencia las células se cultivan para conseguir una suspensión en la que se determina su número y viabilidad. Después las células se tratan para conseguir su fijación en placas Petri y se aspira el medio de crecimiento sustituyéndolo por medio fresco.

Se han realizado 7 experiencias con diferentes dosis de radón y/o diferentes concentraciones de taxol. Cada experiencia comprende una primera fase de irradiación de las células, tres días, y una segunda de acción del quimioterápico, tres días. Se utilizan 12 placas en cada experiencia. En la primera fase se rellenan 8 de ellas con medio estándar y 4 con el mismo medio conteniendo una concentración de radón. En la segunda fase 4 de las 8 placas control y las 4 placas con radón se rellenan con el medio estándar con taxol.

El medio de cultivo conteniendo radón se obtienen disolviendo en aquel el gas emanado de una muestra de ^{226}Ra . El radón producido por el radio difunde a través de un circuito cerrado y se disuelve en el medio de cultivo contenido en un vial estéril alcanzándose una concentración que es función del tiempo. Después de diferentes tiempos de exposición al radio, para obtener distintas concentraciones, los viales se cierran y se mide la concentración de radón mediante un sistema de espectrometría gamma con detector de semiconductor a través de los fotopicos de 352 keV del ^{214}Pb y de 612 keV del ^{214}Bi , (Soto *et al.* 2002). El medio de cultivo, con o sin radón, se filtra luego para asegurar su carácter aséptico y se añade a las placas Petri. En éstas las células son cultivadas durante tres días en una cámara de incubación.

En cada caso la dosis a las células se calcula a partir de la concentración de radón medida teniendo en cuenta la existencia de equilibrio radiactivo entre éste y sus descendientes de vida media corta. Se considera que el gas radón no contribuye a la dosis por pasar al aire, siendo ésta debida a la radiación alfa emitida por los descendientes ^{218}Po y ^{214}Po . Las dosis calculadas en las siete experiencias realizadas han estado comprendidas entre 1.7 y 15 . 10⁻³ Gy. La tasa de dosis no es constante durante el tiempo de incubación si no que evoluciona de la misma manera que las concentraciones de los descendientes de vida corta del radón.

Una vez cultivadas durante tres días se cambia el medio de cultivo de las placas por medio fresco en 4 de ellas, usadas como control, y por medio fresco conteniendo una determinada concentración de taxol en las 4 placas sin radón y en las otras 4 placas con radón. Las concentraciones de taxol utilizadas han estado comprendidas entre 20 y 100 nM. A continuación las células se incuban de nuevo durante tres días.

Transcurrido este segundo periodo de incubación se mide el número de células en cada placa mediante un hemocitómetro y se mide la viabilidad de las células superviviente por medio del test de exclusión con trypan azul.

RESULTADOS

Los resultados encontrados en 3 de las 7 experiencias realizadas están expresados en las tablas I, II y III. En cada tabla se expresan los tres tipos de condiciones usadas: C-C en el caso de células cultivadas en medio estándar; C-T en el caso de las células cultivadas en medio estándar tres días y en medio con taxol otros tres días; R-T en el caso de las células cultivadas en medio con radón y, posteriormente, en medio con una concentración de taxol.

Para cada una de las tres condiciones de cultivo se expresa el porcentaje de supervivencia celular con respecto al control. Tanto este último como los correspondientes a las otras dos condiciones son los valores medios de los recuentos de 4 placas, siendo la desviación estándar la correspondiente a esta media. Por fin, en cada tabla se expresa el porcentaje con respecto al control de células viables y, deducida de éste, la supervivencia a largo plazo en cada condición. La significación de las diferencias entre las distintas condiciones usadas ha sido calculada mediante la t de Student empleando un intervalo de confianza de un 99%, $p < 0.01$.

Tabla I: Supervivencia y viabilidad celulares con 20 nM de taxol y 3.2 mGy de irradiación

Irradiación	Cultivo (T)	Número de placas	Supervivencia (% control)	SD	Viabilidad	Supervivencia largo plazo
C	C	4	100 %	7 %	85 %	85 %
C	T (20 nM)	4	106 %	10 %	92 %	98 %
R (3.2 mGy)	T (20 nM)	4	100 %	19 %	90 %	90 %

Tabla II: Supervivencia y viabilidad celulares con 50 nM de taxol y 2.7 mGy de irradiación

Irradiación	Cultivo (T)	Número de placas	Supervivencia (% control)	SD	Viabilidad	Supervivencia largo plazo
C	C	4	100 %	12 %	85 %	85 %
C	T (50 nM)	4	34 %	7 %	76 %	26 %
R (2.7 mGy)	T (50 nM)	4	24 %	2 %	58 %	14 %

Tabla III: Supervivencia y viabilidad celulares con 75 nM de taxol y 3.0 mGy de irradiación

Irradiación	Cultivo (T)	Número de placas	Supervivencia (% control)	SD	Viabilidad	Supervivencia largo plazo
C	C	4	100 %	17 %	83 %	83 %
C	T (75 nM)	4	14 %	3 %	57 %	8 %
R (3.0 mGy)	T (75 nM)	4	12 %	3 %	50 %	6 %

Los resultados obtenidos con concentraciones de taxol de 20 nM muestran que el taxol no produce diferencias significativas con respecto al control en la supervivencia de las células MCF-7 tratadas ni tampoco lo hacen el radón y el taxol conjuntamente.

Los resultados en las tres experiencias realizadas con distintas dosis de radón y concentración de taxol de 50 nM muestran que el taxol produce una disminución significativa de la supervivencia celular con respecto al control y también lo hace, en mayor grado, la combinación de radón y taxol. Las diferencias de supervivencia entre las células tratadas con taxol y las tratadas con radón y taxol son significativas.

Los resultados obtenidos en la experiencia realizada con una concentración de taxol de 75 nM muestran que el taxol produce una disminución importante de la supervivencia con respecto al control. La pequeña disminución de la supervivencia producida por radón y taxol con respecto a la producida por taxol no es significativa.

Se ha realizado una última experiencia usando una concentración de taxol de 100 nM. La supervivencia de las células tratadas, tanto con taxol como con radón y taxol, fue próxima a cero.

DISCUSIÓN

El uso de radiaciones para aumentar la efectividad de un quimioterápico en el tratamiento del paciente oncológico es una interesante posibilidad que está relacionada con la conveniencia de disminuir la acción de éste sobre células sanas y los efectos secundarios. En esta modalidad de tratamiento se pretende que las radiaciones produzcan un efecto subletal en las células que las haga más sensibles a la acción del quimioterápico, (Lowe *et al.* 1993).

Es difícil suponer de qué manera las bajas dosis de radiación debidas al radón pueden modificar la acción del taxol. Existen muy pocos estudios sobre los mecanismos de acción a nivel molecular de la radiación alfa, y las bajas dosis usadas hacen que su interacción sobre el DNA celular sea muy poco probable. Debe existir una acción complementaria del radón y del taxol que esté relacionada con la apoptosis, ya que éste es el principal mecanismo de actuación del taxol, que puede estar relacionada con la inactivación de bcl-2 o con la acción sobre bcl-x, (Boise *et al.* 1993; Sumantran *et al.* 1995), a través de especies químicas inducidas por la radiación que produzcan la rotura de este último en sus dos transcritos.

Los resultados encontrados en las experiencias con 50 nM y con 75 nM de taxol son interesantes por cuanto muestran que el radón ejerce una acción eficaz disminuyendo la supervivencia producida por el taxol y la viabilidad de las células supervivientes. La disminución producida por el radón y el taxol con respecto al taxol llega a ser de casi un 100% en algunos casos. Añadido a este valor, la supervivencia a largo plazo también es disminuida por la acción de radón y taxol con respecto a taxol en otro 80%, también en determinadas condiciones.

La posible utilización clínica de los resultados obtenidos debe, sin duda, pasar por el estudio de los efectos de los mismos agentes en células sanas. En este sentido, hemos encontrado indicaciones de que las bajas dosis de radón usadas, que modifican el crecimiento de poblaciones de MCF-7, no cambian el crecimiento de poblaciones de fibroblastos. Cabe añadir que las dosis usadas son del mismo orden de magnitud que las recibidas anualmente por personas que viven en regiones de alto nivel de radiación natural, (Quindós *et al.* 1995), o las recibidas por el personal de algunos balnearios en los que el radón está disuelto en el agua en concentraciones importantes, (Soto y Gómez, 1999; Falkenbach *et al.* 2000).

REFERENCIAS

- Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Núñez G, Thompson CB. Bcl-x a related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608. 1993
- Dole M, Núñez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, Castle VP. Bcl-2 inhibits chemotherapy – induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res.* 54: 3253-3259. 1994
- Falkenbach A, Just G, Soto J. Radon progeny activity in sweat following radon exposure in a warm and humid environment. *Radiat Environ Biophys* 39: 137-139. 2000
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 975-967. 1993
- Quindós LS, Fernández PL, Soto J. Study of areas of Spain with high indoor radon. *Radiation Measurements* 24 (2): 207-210. 1995
- Soto J, Quindós LS, Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Influence of low doses of radiation due to ²²²Rn on proliferation of fibroblasts and MCF-7 human cancer cells in vitro. *Sci Total Environ* 181: 181-185. 1996
- Soto J, Martín A, Cos S, González-Lamuño D. Inducción de factores de apoptosis en células tumorales por bajas dosis de radón. IAEA-CN-67/190, 647-650. 1997
- Soto J, Gómez J. Occupational doses from radon in Spanish spas. *Health Phys* 76: 398-401. 1999
- Soto J, Sainz C, Cos S, González-Lamuño D. A simple method of alpha irradiation for experiments in radiobiology. *Nucl Instr Methods* 197: 310-316. 2002
- Sumantran VN, Ealovega MW, Núñez G, Clarke MF, Wicha MS. Overexpression of bcl-xS sensitizes cells to chemotherapy – induced apoptosis. *Cancer Res.* 55: 2507-2510. 1995