

ESTUDIO IN VITRO DE LOS EFECTOS DEL ^{222}Rn EN DOSIS BALNEOTERAPICAS SOBRE CELULAS TUMORALES HUMANAS

SOTO TORRES, Jesús*; QUINDOS PONCELA, L.S.; COS CORRAL, S.; SANCHEZ BARCELO, E.
Depto. Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Depto. Fisiología y Farmacología. Facultad de Medicina.
Universidad de Cantabria.

RESUMEN

Hemos estudiado el efecto que tiene el radón sobre la proliferación de células tumorales humanas. Las células son irradiadas por disolución del radón y de sus descendientes en el medio de cultivo, con dosis semejantes a las que se reciben en balnearios radiactivos. Los resultados obtenidos indican efectos importantes a pesar de las débiles dosis usadas.

RÉSUMÉ

Dans cette travail, nous avons étudié l'effect qui exerce le radon sur la reproduction in vitro des cellules tumorales humaines. Les cellules sont irradiées avec doses de radiation pour dissolution du radon et descendants dans son milieu de cultive. L'agent et les doses utilisés sont les mêmes qui actuent dans le balnearies radioactives. Les resultats trouvés pour les faibles doses employés sont intéressants.

SUMMARY

We has led us to carry out a series of experiments to study the effects of low doses of radiation due to radon on mammalian tumorous cells. In these experiments we have released doses of radiation similar to those received in radioactive spas into in vitro cell populations. The results obtained indicate that important effects can occur in body cell tissue using doses of radiation due to low radon levels.

INTRODUCCION

El tratamiento balneoterápico ha sido tradicionalmente contraindicado en enfermedades tumorales debido a los efectos hormonales excitatorios que se producen en el ambiente balneario. Esta contraindicación incluye a los balnearios radiactivos donde los efectos de las radiaciones se suponen menores que los balneoterápicos generales. Así, en los balnearios radiactivos las dosis recibidas por los pacientes son varios órdenes de magnitud inferiores a las que se reciben en el tratamiento por radioterapia de las enfermedades tumorales y, supuestamente, sin efectos. Sin embargo, y sin negar la influencia principal del ambiente balneario, debe añadirse que en los balnearios radiactivos se presentan determinados efectos específicos que no son una extrapolación de los que se producen a altas dosis de radiación.

El gas radiactivo de origen natural radón (^{222}Rn) se presenta en el agua, y también en el aire, de los balnearios radiactivos en concentraciones moderadamente elevadas, (DANALI, 1986; KOBAL y REINER, 1987). Por distintas vías produce dosis de radiación en los pacientes que son superiores a las que recibe la población en promedio y que son capaces de generar efectos. A pesar de ello, los trabajos experimentales realizados sobre los efectos del radón en concentraciones moderadas son muy escasos. Entre ellos deben citarse los de MINTA, 1975, y los de KOCHANSKI, 1976, que demuestran que existe una estimulación del endotelio vascular y del tejido pulmonar en determinadas condiciones de inhalación de radón, los de SCHEMINSKI, 1965, y DEETJEN, 1990, sobre la reparación de DNA de células sometidas a concentraciones de radón bajas y, más recientemente, los proyectos de estudio de GOODWIN, 1993, y ZAIDER, 1993.

Este pequeño número de trabajos experimenta-

* Catedrático de Radiología y Medicina Física (Física Médica). Facultad de Medicina. Santander.

les realizados nos ha llevado a hacer una serie de experiencias para estudiar los efectos de bajas dosis de radiación debidas al radón sobre células de mamífero. En estas experiencias hemos irradiado poblaciones celulares in vitro con dosis de radiación semejantes a las que se reciben en balnearios radiactivos.

MATERIAL Y METODOS

Para estudiar los efectos del radón a bajas dosis de radiación sobre la evolución de una población celular, hemos usado como modelos células tumorales de mama humana. Este es un modelo útil de experimentación por el crecimiento rápido de estas poblaciones celulares, que permite el estudio en periodos de tiempo cortos. Las células usadas son una línea estable, MCF-7, obtenida de efusión pleural de una paciente con carcinoma mamario metastásico, (SOULE, 1973) que se conservan en botellas a 37°C donde exhiben antigenicidad a la superficie. En cada experimento se toma una cierta cantidad y se diluye en líquido nutriente hasta conseguir una concentración de $3 \cdot 10^5$ células/cm³. De esta disolución se preparan 16 placas en cada experiencia, poniendo en cada una de ellas 1 cm³ de disolución y añadiendo 4 cm³ de líquido nutriente, después de lo que se dejan 3 horas para que comience la proliferación celular. Al cabo de este tiempo se quita todo el medio de cada placa y se sustituye por otro conteniendo radón.

El medio de cultivo conteniendo radón se obtiene por difusión del gas desde una muestra líquida que contiene radio (²²⁶Ra) y por disolución de radón en el líquido nutriente existente en un tubo estéril. La graduación de las concentraciones de radón en este medio se consigue exponiendo cada tubo a la difusión del gas un tiempo distinto. Los tubos con líquido nutriente obtenidos de esta manera se cierran y se miden por espectrometría gamma (SOTO, 1988), con un detector de centelleo de INa(Tl) acoplado a un analizador multicanal, determinando los contajes bajo el triplete del ²¹⁴Pb y bajo el fotopico de 0.61 MeV del ²¹⁴Bi, los descendientes del radón de vida corta emisores gamma. Mediante medidas sucesivas del líquido contenido en cada tubo se encuentra una tendencia al equilibrio entre el radón, que ha difundido desde la muestra de radio, y sus descendientes, que se alcanza al cabo de 3 horas. La medida de estas muestras, representativas de cada una de las concentraciones de radón disueltas, se hace por medio de una geometría previamente calibrada en el siste-

ma de espectrometría.

Alcanzado el equilibrio radiactivo entre el radón y sus descendientes, el medio nutriente se calienta a 37°C en un baño termostático en los mismos tubos cerrados. Cuando se encuentra a esta temperatura, se abren y se filtran, para asegurar su carácter aséptico, tomando porciones de 5 cm³ que se añaden a las placas. La última porción de cada tubo se trasvasa a otro tubo estéril y se vuelve a medir por espectrometría gamma. Igual que anteriormente, se miden los fotopicos de los descendientes del radón ²¹⁴Pb y ²¹⁴Bi y se vuelven a medir al cabo de 30 minutos. Los resultados encontrados comparando ambos contajes indican que se ha perdido en el líquido la mayor parte del radón inicial, no existiendo en el medio más que sus descendientes radiactivos.

A partir de la concentración inicial de radón en el medio, en equilibrio con sus descendientes, y de los contajes realizados en las muestras testigo pueden calcularse las concentraciones de cada uno de los descendientes del radón emisores de radiación alfa que se añaden a cada placa.

Las 16 placas de cada experiencia obtenidas de esta manera se mantienen en cámara de incubación a 37°C durante 3 días, transcurridos los cuales se sacan de la incubadora y se cuentan. Cada una de las placas expuestas al radón, y también las de control, se cuentan para determinar el número de células por cm³ alcanzado al final de este periodo. El líquido nutriente se recoge para medir su concentración final de radón. La medida de éste da como resultado una concentración nula de elementos radiactivos, lo que se corresponde con el decaimiento de los descendientes del radón.

RESULTADOS

Utilizando la anterior metodología experimental, hemos realizado 4 experiencias de irradiación de células con radón o, con mayor precisión, con las radiaciones emitidas por los descendientes del radón. Además de las correspondientes placas de control hemos usado 12 concentraciones de radón distintas, con un total de 64 placas.

De acuerdo con las consideraciones expuestas anteriormente, el cálculo de la dosis en cada placa se hace calculando la energía alfa depositada por los descendientes del radón de vida media corta. Calculada la actividad inicial de cada descendiente se calcula la energía total depositada en la placa por la desintegración de los emisores de radiación alfa. Sumando las energías debidas a éstos y divi-

diendo por la masa de líquido en cada placa se obtiene la dosis absorbida. Los errores de las dosis calculadas debidos a la medida de las muestras pueden estimarse en el 10% de cada valor.

El recuento de las células, una vez que han permanecido 3 días en la cámara de incubación, se hace por medio de una placa graduada, contando cada célula individualmente. Para evitar la manipulación inconsciente de los resultados, el experimentador que cuenta las células no conoce las concentraciones de radón correspondientes.

Los resultados obtenidos para las 12 dosis de radiación utilizadas están representados en la figura 1. En ella se muestran los porcentajes de las poblaciones celulares supervivientes irradiadas con respecto a las de control en función del logaritmo decimal de las dosis absorbidas. Los porcentajes de las poblaciones supervivientes están afectados por el error correspondiente a la desviación estándar de los recuentos de al menos 4 placas con la misma dosis. Las dosis de radiación utilizadas toman valores comprendidos entre $5 \cdot 10^{-5}$ y 10^{-2} Gy. No se han presentado los errores de las dosis que son del orden indicado anteriormente.

En todas las experiencias realizadas el efecto ha sido una disminución del número de células finales con respecto a las de la población control. Como puede observarse en la figura, existe una relación entre dosis y efecto sobre las células, con una graduación en los efectos producidos por distintas do-

sis. Esta graduación se manifiesta en el hecho de que las dosis más bajas, próximas a las dosis nulas recibidas por la población control, y las dosis más altas entre las usadas producen un efecto menor que las dosis intermedias. Para estas últimas, los crecimientos de las poblaciones celulares son muy inferiores a los de la población control, llegando al 55% de ésta, con una elevada significación estadística de la diferencia entre ambas poblaciones.

DISCUSION

Una población celular en crecimiento, células juveniles o tumorales, está caracterizada por un tiempo de mitosis, promedio, de cada célula. Este tiempo de mitosis, de 30 horas en las células usadas, es el tiempo necesario para que se duplique el número de células de la población y su existencia determina que, en condiciones ideales, la relación del número de células con el tiempo sea una función exponencial creciente. Cuando irradiamos una población actuamos sobre algunas células con la consecuencia de que éstas no se reproducen. En las anteriores experiencias se ha obtenido una disminución del crecimiento de la población irradiada con respecto a la población control.

La disminución encontrada en el crecimiento de la población celular que se obtiene por nuestra

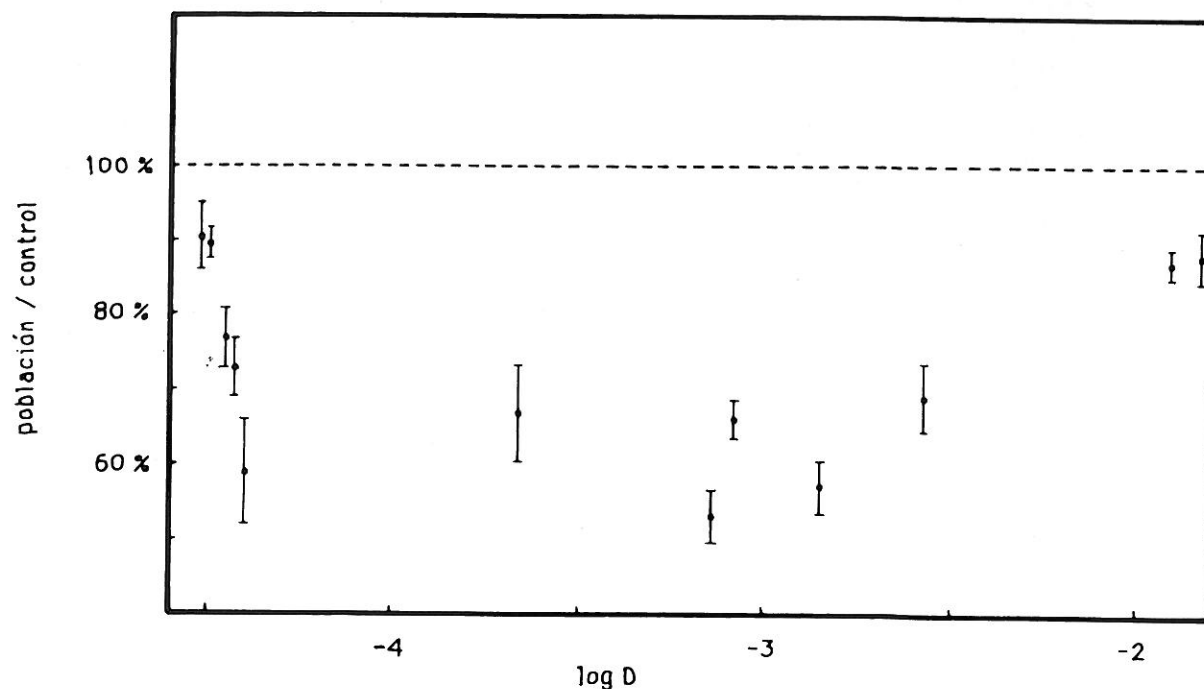


Figura 1: Porcentaje del número de células supervivientes con respecto al control en función del logaritmo de la dosis.

irradiación es sorprendente por dos motivos. El primero es que no era esperable ningún tipo de efecto con dosis tan bajas como las utilizadas. Este tipo de células de cáncer de mama tienen un tratamiento radioterápico en el que se irradian con dosis entre 50 y 70 Gy para obtener disminuciones en el crecimiento de la población del mismo orden de magnitud que los obtenidos por nosotros con dosis 10^4 - 10^5 veces menores.

El segundo motivo de sorpresa es la forma de la relación entre dosis y efecto y complementa al primero. Aunque las dosis de radiación empleadas sean débiles podría admitirse algún mecanismo que justificara un efecto tan importante. Sin embargo, siempre debería existir una relación directa entre dosis y efecto, entre causa y efecto, que no es lo que se observa. Por el contrario, la relación dosis-efecto encontrada presenta un máximo, un mínimo en el número de células, con efectos que tienden a ser nulos tanto para dosis inferiores como superiores.

Estas dos características de la relación dosis-efecto encontrada indican que lo obtenido no es una extrapolación de los efectos que se encuentran a dosis de radiación más elevadas.

Se han descrito pocas experiencias en las que la irradiación con bajas dosis de radiación producen efectos no lineales y no extrapolables de lo que se obtiene para dosis altas. Algunas de estas experiencias forman parte del conjunto de trabajos recopilados por LUCKEY, 1980, sobre los efectos de distintos tipos de radiación en organismos vegetales o animales. Un trabajo más reciente es el realizado por PLANEL, 1987, con dosis de radiación inferiores a las ambientales. En la mayoría de los casos, se obtiene como resultado de la irradiación un incremento en el número de células, con lo que la radiación resulta estimuladora. Los resultados, contrarios, encontrados por nosotros podrían tener su justificación en el distinto metabolismo de las células cancerosas con respecto a las células normales.

Es interesante comparar la dosis recibidas por las células en las experiencias anteriores con las que recibe el hombre por causas naturales. Esta comparación es tanto más interesante por cuanto la irradiación que realizamos se hace por las partículas alfa emitidas por los descendientes de vida corta del radón, que es el mismo agente que produce la irradiación del sistema respiratorio en poblaciones expuestas al radón. Tales son las poblaciones de mineros o la población en general por la presencia de radón en viviendas (NCRP, 1984; BEIR IV, 1988).

La dosis equivalente efectiva promedio anual recibida por la población se estima en 2 mSv/año.

De este valor más de la mitad se cree debida a la irradiación por los descendientes del radón existente en el aire del interior de las viviendas (FERNANDEZ, 1983; QUINDOS, 1991), en cuyo caso se aplica el factor de calidad de la radiación alfa para pasar la dosis absorbida a dosis equivalente. Deshaciendo este cambio se obtiene que las dosis recibidas anualmente por la población son, en promedio, del mismo orden de magnitud que las empleadas por nosotros. Aquí cabe añadir que las tasas de dosis a la población son muy inferiores a las del presente trabajo y que afectan a células con tiempos de mitosis mucho mayores que las tumorales.

La comparación de las dosis liberadas a la población celulares irradiadas con las recibidas en los balnearios radiactivos es difícil de hacer porque en estas últimas influyen tanto las concentraciones de radón existentes como los no bien conocidos mecanismos de penetración y tiempo de residencia del radón en el cuerpo. Sin embargo, pueden hacerse algunas estimaciones de las dosis recibidas partiendo de datos y consideraciones generales. Así, las concentraciones que hemos encontrado en el agua de los balnearios radiactivos españoles (SOTO, 1991, SOTO et al., 1991) están comprendidas entre 300 y 800 Bq/l, lo que da lugar a concentraciones en el aire que varían entre 80 y 5000 Bq/m³. En el aire que se utiliza para tratamientos por inhalación las concentraciones son mayores, llegando a alcanzar los 100000 Bq/m³.

Con estas concentraciones de radón basta conocer el tiempo de estancia del gas en el cuerpo para poder evaluar las dosis producidas. Suponiendo un tiempo de estancia de 3 horas (GOSINK, 1990), se obtiene que las dosis recibidas en tratamientos típicos en un balneario radiactivo pueden evaluarse como dentro del mismo intervalo de dosis utilizado por nosotros en la irradiación de células (SOTO, 1992).

Es interesante destacar que las radiaciones utilizadas en este trabajo para la irradiación de poblaciones celulares son las mismas que se dan en los balnearios radiactivos. El gas radón se disuelve en el medio nutriente o en un tejido produciendo sus descendientes de vida media corta que se desintegran. Eventualmente el radón puede salir del tejido y la dosis producida es debida fundamentalmente a sus descendientes emisores de radiación alfa. Este idéntico mecanismo de acción en ambos casos permite justificar a partir de nuestras experiencias in vitro el que puedan producirse determinados efectos en los balnearios radiactivos debidos a la acción del radón en concentraciones moderadas.

BIBLIOGRAFIA

BEIR IV: "The committees's analysis of four cohorts of miners". En "Health risk of radon". New York. Ed. National Academic Press. 1988.

DANALI, S.; MARGOMENOU, G.; VELDEKI, K.: "The radioactivity of spas on the greek island Ikaria and influencing factors". Health Physics, 1986, 50, 4, 509-513.

DEETJEN, J.: "Los fundamentos científicos de los tratamientos terapéuticos en Bad Gastein y Bad Hofgastein". Inform. sem. Salzburg, 1990, 1-4.

FERNANDEZ, P.L.; QUINDOS, L.S.; SOTO, J.; VILLAR, E.: "Radiation exposure levels in Altamira Cave". Health Physics, 1983, 46, 2, 445-447.

GOODWIN, E.H.: "Chromosome damage in the 1 rad region: Cytogenic detection following ultralow doses and doses rates". En: "Radon Research Program". Ed. US Department of Energy. 1993.

GOSINK, T.A.; BASKARAN, M.; HOLLEMAN, D.F.: "Radon in the human body from drinking water". Health Physics, 1990, 59, 6, 919-924.

KOBAL, I.; REINER, A.: "Radioactivity of the atomic spa at Podcetrtek, Slovenia, Yugoslavia". Health Physics, 1987, 53, 3, 307-310.

KOCHANSKI, W.; MINTA, P.; KOCHANSKA, I.: "Histologic changes in pulmonary tissues of rabbits from inhaled radon 222". Med. Prev. 1976, 27, 353-359.

LUCHEY, T.D.: "Hormesis with ionizing radiation". Boca Raton. Ed. CRC Press. 1980.

MINTA, A.; MINTA, P.; KOCHANSKI, W.: "The effect of radon 222 on the oral mucosa of rabbits". Czas. Stomatol. 1975, 28, 615-620.

NCRP: "Evaluation of occupational and environmental exposures to radon and radon daughters". Report No. 78. Ed. NCRP Publications. 1988.

PLANEL, H., et al.: "Influence on cell proliferation of background radiation or exposure to very low, chronic gamma radiation". Health Physics, 1987, 52, 5, 571-578.

QUINDOS, L.S.; FERNANDEZ, P.; SOTO, J.: "National survey on indoor radon in Spain". Environment International, 1991, 17, 449-453.

SCHEMINSKY, F.: "The scientific bases for Gastein cure". Wien. Klin. Wochenschr. 1965, 77, 31, 533-537.

SOTO, J., et al.: "Ra 226 and Rn 222 in natural waters in two typical locations in Spain". Radiation Protection Dosimetry, 1988, 24, 109-111.

SOTO, J., et al.: "Niveles de Rn 222 en el balneario Las Caldas de Besaya (Cantabria)". Rev. Sanidad e Higiene Pública, 1991, 65, 61-64.

SOTO, J.; FERNANDEZ, P.L.; QUINDOS, L.S.; DELGADO, M.T.: "Radón 222 en balnearios". Bol. Sociedad Española de Hidrología Médica, 1991, 2, 101-104.

SOTO, J.: "Radón 222 en el agua: Origen, niveles y dosis de radiación". Santander. Universidad de Cantabria. 1992.

SOULE, H.D., et al.: "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". J. Nat. Cancer Inst. 1973, 51, 5, 1409-1416.

ZAIDER, M.: "Nanodosimetry and nanodosimetric-based models of radiation action for radon alpha particle". En: "Radon Research Program". Ed. US Department of Energy. 1993.

BALNEARIO DE LUGO - HOTEL

TERMAS ROMANAS

Aguas Bicarbonatadas, Sulfuradas Mixtas, Hipertermales (43'8°)

TRATAMIENTOS: Reumatismos crónicos (Artrosis, Artritis • Reumatismos no articulares (Ciáticas, Lumbalgias) • Afecciones Respiratorias (Faringitis, Rinitis, Sinusitis, Laringitis, Bronquitis) • Enfermedades dermatológicas • Aparato digestivo

TECNICAS: Baños, Chorros, Hidromasajes, Baños de Burbujas • Duchas Circulares, Parafangos, Masajes • Pulverizaciones, Inhalaciones, Nebulizaciones • Duchas Nasales, Aerosoles

Situado en Lugo dispone de hotel con 40 habitaciones con cuarto de baño, calefacción, hilo musical, televisión. Amplio aparcamiento, 6000 m² de zona ajardinada, con embarcadero propio y un paseo peatonal de 2 kilómetros al lado del río.

Barrio del Puente, s/n • 27004 LUGO • Teléfono (982) 22 12 28 - Fax (982) 22 16 59

ABIERTO TODO EL AÑO. Reservas con una antelación mínima de 15 días

