

ALGUNAS EXPERIENCIAS SOBRE EFECTOS DEL RADÓN EN CÉLULAS TUMORALES

Sáinz Fernández C.¹, Cos Corral S.², González-Lamuño D.³, Soto Torres J.¹

¹ *Cátedra de Física Médica.*

² *Departamento de Fisiología y Farmacología.*

³ *Grupo de Genética Infantil.*

Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria. Avda. Herrera Oria s/n. 39011 Santander.

RESUMEN

Se presentan los resultados encontrados en un conjunto de experiencias en las que se utilizan bajas dosis de radiación producidas por el gas radón disuelto en el medio de cultivo celular para la irradiación de células tumorales humanas. Los resultados encontrados indican (1) menores crecimientos de las poblaciones celulares irradiadas, (2) mayor expresión de algunos genes de apoptosis y (3) modificación de la acción de los quimioterápicos por la irradiación.

Palabras clave: *radón, irradiación, células tumorales.*

RÉSUMÉ

Le radon dissout dans un milieu de culture a été utilisé pour fournir d'irradiation á des cellules cancérogènes. L'exposition á différentes doses de radiation ionisante a été associée avec (1) un effet antiprolifératif dans des cellules cancérogènes, (2) des changements dans l'expression de gènes qui régularisent l'apoptosis, et (3) une amélioration de la chimiothérapie.

Mots clef: *radon, irradiation, cellules cancérogènes.*

SUMMARY

Radon was used to provide a standardized irradiation of breast cancer cells in culture media. Exposure to various doses of ionizing radiation was associated with (1) an antiproliferative effect on cancer cells, (2) changes in the expression of genes regulating apoptosis, and (3) an improved effectiveness of chemotherapy-induced apoptosis.

Key words: *radon, irradiation, cancer cells.*

INTRODUCCIÓN

La existencia del gas radiactivo de origen natural radón (²²²Rn) en las aguas subterráneas determina que aparezca en concentraciones más o menos elevadas en el agua y en el aire que se utilizan en el tratamiento en los establecimientos termales, (Soto et al. 1995; Alcaide et al. 1999). En este tratamiento el radón produce una irradiación en los pacientes que deposita una cantidad de energía en los distintos tejidos corporales generando un efecto estimulante, (Soto, 1997; Falkenbach et al. 2000). Como consecuencia de ello el radón se utiliza como agente principal, (Falkenbach et al. 2001), o como agente coadyuvante, (Armijo y San Martín, 1994), en muchas de las indicaciones del tratamiento termal.

Los efectos mencionados como estimulantes son una consecuencia de la acción de distintos factores ambientales incluyendo la irradiación a bajas dosis, (Sagan, 1987; Wolf, 1998). Contrariamente a lo que ocurre cuando se aplican altas dosis de radiación a poblaciones celulares, principalmente muerte inmediata y muerte diferida, las bajas dosis de radiación inducen modificaciones en el funcionamiento celular con producción alterada de proteínas o enzimas, (Luckey, 1982). Esta producción alterada modifica el funcionamiento celular que responde al medio intentando restaurar el funcionamiento normal, (Soto y Gómez, 1995; Sáinz y Soto, 1999). Por ello, es significativa la producción de proteínas reparadoras del DNA, controladoras de la proliferación celular o modificadoras de la apoptosis, (UNSCEAR, 2000).

Las posibles aplicaciones clínicas de los efectos anteriores pueden incluir el tratamiento de pacientes oncológicos. Aunque, por distintas razones, el tratamiento termal resulta contraindicado como terapia antitumoral la irradiación producida por bajas dosis debidas al radón parecen inducir efectos de características antitumorales.

En este trabajo exponemos los resultados encontrados en el estudio in vitro de algunos efectos del radón en células tumorales humanas. En el estudio hemos realizado experiencias relacionadas con tres temas:

- Crecimiento de poblaciones celulares expuestas al radón
- Inducción por radón de la expresión de genes de apoptosis en células tumorales
- Uso del radón para mejorar el tratamiento con quimioterápicos

METODOLOGÍA

En todas las experiencias realizadas se ha usado el radón como agente de irradiación de las células. El

método ha consistido en disolver el gas en el medio de cultivo para el crecimiento y proliferación de las células, (Soto y Noriega, 1996). Para ello hemos diseñado y construido un sistema que contiene una muestra del isótopo radiactivo ^{226}Ra en solución acuosa encerrada en un recipiente, con protección de plomo, figura 1. La muestra de ^{226}Ra produce radón que difunde por un tubo en cuyo extremo se coloca un recipiente que contiene el medio de cultivo celular. Mediante una llave de paso el medio de cultivo se mantiene en conexión con la muestra de ^{226}Ra un tiempo diferente dependiendo de la concentración de radón disuelto que se quiere obtener.

Transcurrido ese tiempo, el recipiente se cierra y se esperan 3 horas para que el radón alcance el equilibrio radiactivo con sus descendientes de vida media corta. A continuación se mide en el mismo tubo cerrado por medio de una cadena de espectrometría gamma con detector de semiconductor de GeHP y analizador multicanal. La concentración de radón disuelto se calcula a partir de los fotopicos de 352 keV del ^{214}Pb y de 610 keV del ^{214}Bi en equilibrio con el radón. El sistema se calibra con una muestra de ^{226}Ra de actividad conocida preparada en solución acuosa con la misma geometría que la de los diferentes medios de cultivo.

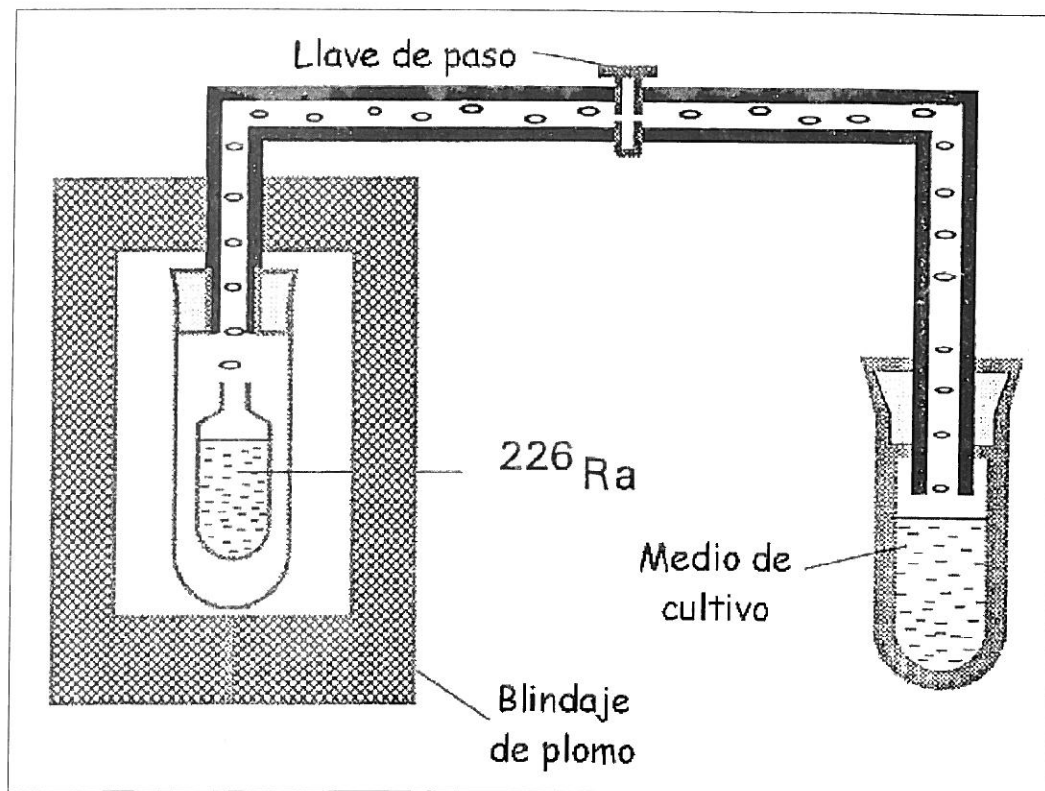


Figura 1:
Dispositivo
experimental
empleado para
la disolución de
radón en el
medio de cultivo
celular.

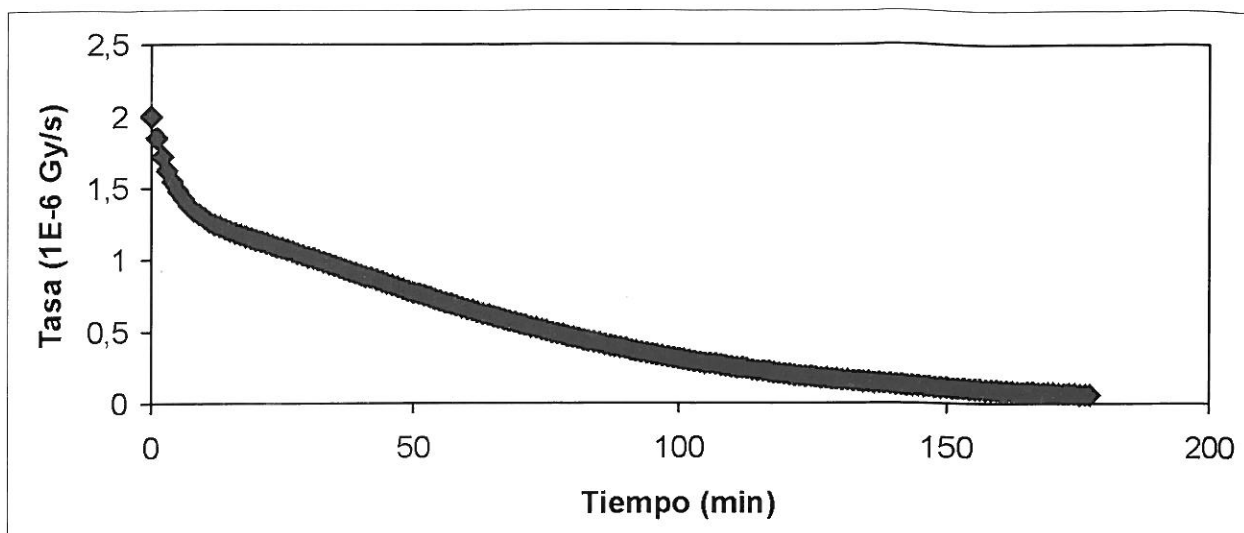


Figura 2: Evolución de la tasa de dosis en ausencia de radón disuelto.

En la mayor parte de los experimentos realizados las células usadas han sido células tumorales de mama de la línea MCF-7. Las células se conservan en medio de cultivo en frigorífico realizándose test de viabilidad cada 3 o 4 días. Cuando deben ser utilizadas las células se distribuyen en placas Petri, $3 \cdot 10^5$ células por placa, y se espera 1 hora para que se fijen. Después se cambia el medio nutriente sustituyéndolo por el medio con radón y se ponen en una cámara de incubación durante 3 días.

Para el cálculo de las dosis recibidas por las células en estas condiciones hemos considerado que es debida únicamente a la radiación alfa emitida por el radón y por sus descendientes de vida media corta ^{218}Po y ^{214}Po . La dosis de radiación liberada en las células no es constante en el tiempo sino que disminuye como lo hacen los descendientes del radón, figura 2. Las dosis utilizadas en las experiencias realizadas han estado comprendidas entre 0,1 y 10 mGy, siempre dentro del intervalo de dosis bajas.

CRECIMIENTO DE POBLACIONES TUMORALES

Utilizando esta metodología hemos hecho un primer tipo de experiencias para estudiar el crecimiento de poblaciones celulares irradiadas con distintas dosis de radiación debidas al radón. En este caso hemos utilizado tanto las células tumorales humanas MCF-7 como fibroblastos 3T3 de ratón.

Para cada dosis, cada concentración de radón en el medio de cultivo, se utilizan 4 placas y otras tantas con medio de cultivo sin radón como control. Después de 3 días en la cámara de incubación se cuenta el número total de células en cada placa mediante un hemocitómetro. A partir del recuento de células en las 4 placas se calcula el valor medio correspondiente al crecimiento de la población celular comparándolo con el valor obtenido en las placas de control.

Los resultados obtenidos indican que las poblaciones de células tumorales MCF-7 irradiadas disminuyen su crecimiento con respecto a las no irradiadas, (Soto et al. 1994; Soto et al. 1996). La disminución del crecimiento es dependiente, de forma no creciente, de la dosis con un efecto máximo, donde se obtienen crecimientos próximos al 60% de la población control, en torno a 1 mGy, figura 3. En el mismo intervalo de dosis, las poblaciones de fibroblastos 3T3 muestran crecimientos semejantes a los de la población control, no modificados por la irradiación.

Cabe señalar aquí que las bajas dosis usadas hacen muy improbable la modificación del DNA celular de un porcentaje significativo de las poblaciones irradiadas. Por ello la disminución del crecimiento de las células tumorales no parece ser una consecuencia de la muerte diferida que se produce para dosis altas, más en cuanto a que no es función creciente de la dosis, sino que parece existir una modificación del medio que induce a las células a

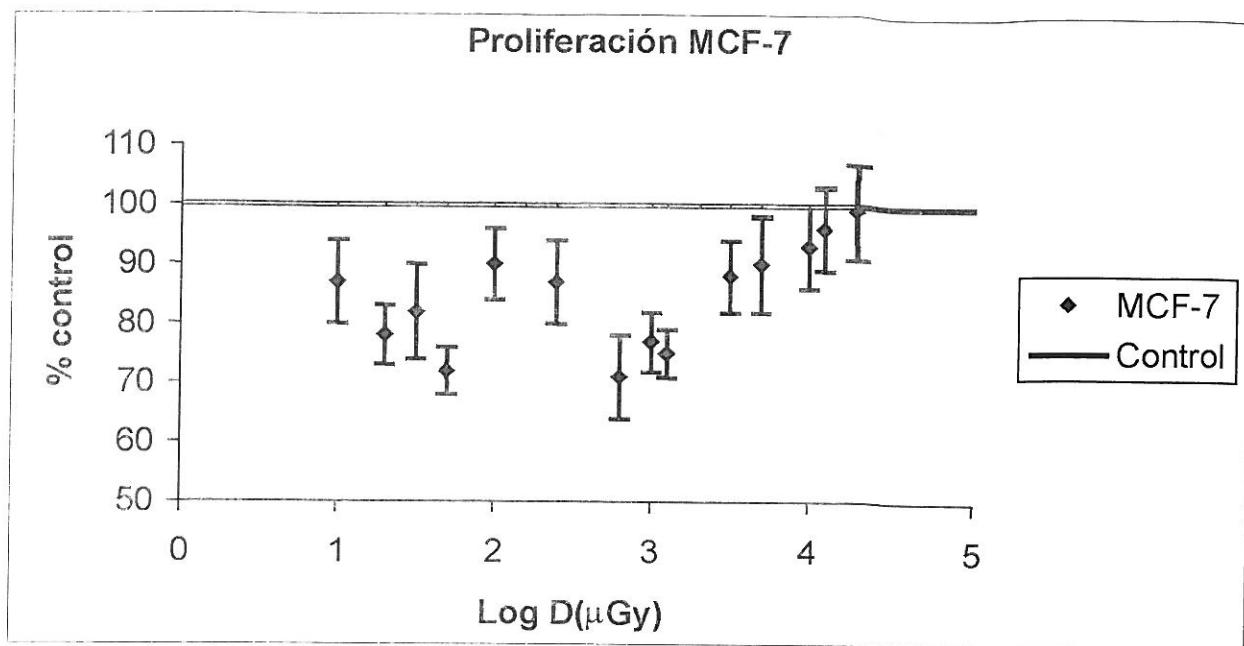


Figura 3: Porcentaje de células MCF-7 supervivientes tras diferentes dosis de radiación.

disminuir su proliferación. Esta disminución de la proliferación podría estar relacionada con el retardo de la mitosis que se produce en células sometidas a situación de stress, (Halliwell y Cross, 1994), o al aumento del número de células que entran en apoptosis.

EXPRESIÓN DE GENES DE APOPTOSIS

Teniendo en cuenta los resultados anteriores hemos hecho un segundo tipo de experiencias para analizar la expresión de genes relacionados con apoptosis, la forma de muerte celular inducida genéticamente, en las células irradiadas, (White, 1996). Para ello, al igual que en el caso anterior, las células que son irradiadas y las control se dejan crecer durante 3 días en cámara de incubación al cabo de los cuales se congelan a -70°C para su posterior análisis.

Para el estudio de la expresión de genes se procede, en primer lugar, a la extracción del RNA total celular utilizando las técnicas típicas de la biología molecular, (Chomczynsky y Sacchi, 1987). A partir del RNA obtenido se sintetiza una cadena de RNA complementario de la que se amplifican regiones específicas correspondientes a los genes reguladores de apoptosis bcl-2, bax y bcl-x mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de la amplificación obtenidos se corren

después por electroforesis en gel de agarosa o polyacrilamida.

Cuando la amplificación por PCR se lleva a saturación se obtiene que la línea celular utilizada expresa los genes relacionados con apoptosis bcl-2, bax y bcl-x tanto en las células tumorales irradiadas como en las control, (Soto et al. 1997). Aunque es difícil, en estas condiciones de saturación, deducir conclusiones sobre la expresión las células irradiadas parecen expresar más los genes bcl-x y bax que bcl-2.

Para relizar un análisis mas detallado de la expresión de bcl-x hemos realizado la amplificación por PCR con un número limitado de ciclos y corrido por electroforesis sobre polyacrilamida los fragmentos obtenidos. Los resultados encontrados señalan que el transcrito largo inhibidor de apoptosis bcl-x_L tiene un aumento de expresión significativo en las células irradiadas con respecto al control. En las mismas células irradiadas aparece el transcrito corto inductor de apoptosis bcl-x_S que no lo hace en las control, figura 4. La estructura de este último se ha estudiado transfiriendo la banda obtenida en la electroforesis a un secuenciador de DNA.

El aumento que se encuentra en la expresión de genes de apoptosis, y en especial la expresión del

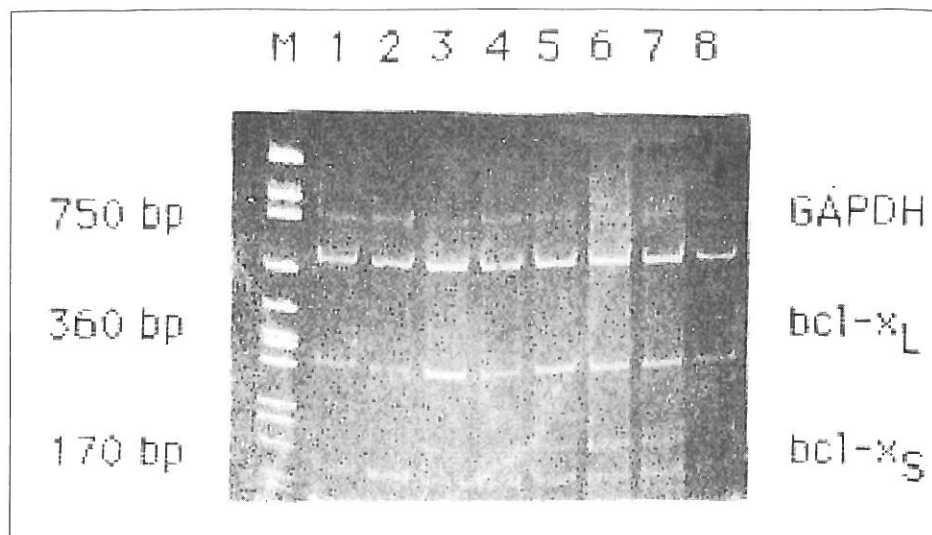


Figura 4: Visualización por electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos bcl-x_S y bcl-x_L del gen bcl-x.

inductor bcl-x_S, hacen suponer que es posible usar el radón para la mejora de tratamientos con radioterapia o quimioterapia. Una idea semejante ha sido ensayada utilizando un agente viral que aumenta la expresión del gen bcl-x_S para obtener un mejor resultado en el subsiguiente tratamiento por radiación o por agentes quimioterápicos, (Sumantran et al. 1995). Aquí cabe señalar que la utilización de un agente natural como el radón actuando a bajas dosis, como lo hace en los balnearios, sería una mejora significativa, a igualdad de resultados obtenidos, con respecto a otros métodos más agresivos.

MODIFICACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A RADIOTERÁPICOS

Teniendo en cuenta los cambios observados en la expresión de los transcritos bcl-x_L y bcl-x_S, relacionados con la resistencia a fármacos citotóxicos, hemos intentado determinar si la acción del radón a bajas dosis es capaz de mejorar el tratamiento quimioterápico con taxol en un tercer tipo de experimentos.

La metodología utilizada en este caso conlleva dos fases. En la primera fase las células se irradian con dosis próximas a 3 mGy usando una técnica igual que la indicada antes y se incuban durante 3 días. Terminada esta primera fase se cambia el medio de cultivo por otro fresco, tanto en las células irradiadas como en las control, al que se ha añadido una determinada cantidad del quimioterápico taxol. En estas condiciones las células se vuelven a incubar

durante otros 3 días y después se cuenta el número de células supervivientes y se determina su viabilidad, porcentaje de células capaces de reproducirse de manera indefinida.

Los resultados obtenidos en el conjunto de este tercer tipo de experimentos indican que la irradiación previa con radón aumenta siempre la eficacia del quimioterápico taxol, (Soto et al. 2000). Este aumento de la eficacia se da tanto en la disminución del número total de células como en la disminución de la viabilidad de las supervivientes, figura 5.

Con respecto al número total de células supervivientes el radón produce un efecto cuantitativamente diferente dependiendo de la concentración de taxol utilizada. Para 20 nM de taxol, una concentración que apenas modifica el crecimiento de la población, el radón solamente disminuye la población celular con respecto a la acción del taxol en un 6%. Para una concentración de taxol de 50 nM, que disminuye el crecimiento de la población celular hasta un 30% del control, la irradiación previa con radón mejora el efecto del taxol de manera importante, un 80%. Para concentraciones más elevadas de taxol, a las que disminuye mucho el crecimiento de la población celular, el radón mejora el efecto del taxol en menor grado.

Los resultados anteriores son similares a los que se obtienen en cuanto a la viabilidad de las células supervivientes. Para 20 nM de taxol el radón disminuye la viabilidad que produce el taxol en un 5%. Para 50 nM la disminuye en un 120% y para 75 nM en un 33%.

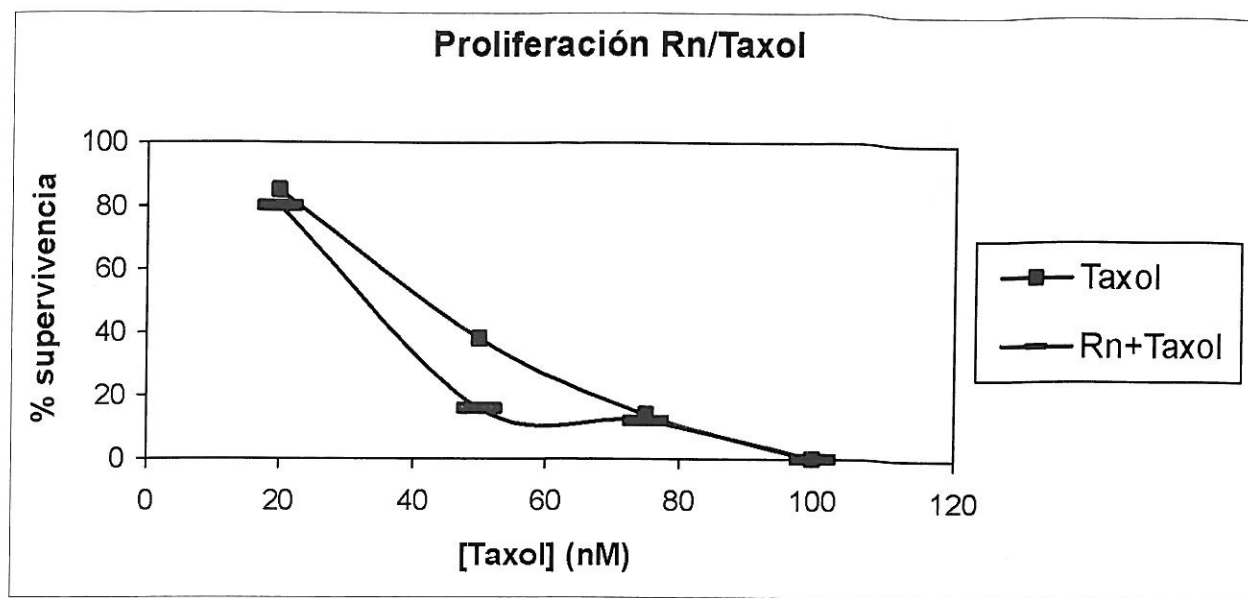


Figura 5: Influencia de la combinación radón-taxol en la supervivencia de células MCF-7.

CONCLUSIONES

Como consecuencia de los resultados anteriores puede concluirse que el radón parece poder actuar como un agente antitumoral. Esta acción antitumoral se manifiesta de manera limitada en la disminución de la supervivencia de las poblaciones de células MCF-7 en las células irradiadas. Pero, principalmente, se manifiesta en el efecto apoptótico sobre estas células y en la sensibilización que produce en ellas a la acción del quimioterápico taxol, reduciendo la concentración necesaria para obtener un determinado nivel de control de la población tumoral.

La utilización de estos resultados en la práctica clínica oncológica debe ir precedida de un gran trabajo en cuanto a especificación del efecto sobre células no tumorales, en cuanto a intervalos temporales y en cuanto a dosis, tanto de radón como de distintos quimioterápicos, a utilizar. Sin embargo, cabe señalar que los resultados obtenidos son interesantes y que puede obtenerse una mejora importante en el tratamiento quimioterápico, quizás como terapia combinada entre radiación, a bajas dosis, y agentes químicos.

Resulta interesante señalar aquí que el carácter gaseoso del radón permitiría una forma sencilla de tratamiento en puntos del cuerpo alejados del foco tumoral. Así, tras la inhalación, el transporte por la sangre y la disolución en los diferentes tejidos

corporales produce una irradiación a todo el cuerpo con dosis suficientemente bajas para actuar sobre células transformadas sin efecto significativo sobre grupos celulares sanos.

Finalmente, puede ser ilustrativo señalar que las bajas dosis producidas por pequeños incrementos en la concentración de radón ambiental, solo o potenciando la acción de otros agentes naturales, parecen capaces de estimular la acción de mecanismos de control de la proliferación celular. Esta forma de estimulación presenta al radón como un agente antitumoral que podría controlar de manera natural el desarrollo de las células cancerígenas.

BIBLIOGRAFÍA

ALCAIDE, J., OLIVERA, J., VALDÉS, G., LEAL, R., SOTO, J. (1999). Radiactividad del agua en manantiales y balnearios de Cuba. *Bol. Soc. Esp. Hidrol. Med.* 2, 89-93.

ARMIJO, M., SAN MARTÍN, J. (1994). *Curas balnearias y climáticas*. Madrid. Ed. Complutense.

CHOMZCYNKY, P., SACCHI, N. (1987). Single step method of RNA isolation by and guanidium thiocyanate- phenol- chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

FALKENBACH, A., JUST, G., SOTO, J. (2000). Radon progeny activity in sweat following radon exposure in a warm and humid environment. **Rad. Environ. Biophys.** 39, 137-139.

FALKENBACH, A., KOVAC, J., BRAND-MAIER, P., SOTO, J. (2001). Radon exposure with the treatment of rheumatic diseases- Radomized controlled trials. **Strahlenschutz fur Mensch und Gesellschaft im Europa von Morgen.** Gmunden. Ed. IRPA.

HALLIWEL, B., CROSS, C. (1994). Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environ. Health Perspect.** 102, 5-12.

LUCKEY, T.D. (1982). Physiological benefits from low levels of ionizing radiation. **Health Phys.** 43, 771-789.

SAGAN, L. (1987). What is hormesis and why haven't we heard about it before? **Health Phys.** 52, 521-525.

SÁINZ, C., SOTO, J. (1999). Respuesta adaptativa a las bajas dosis de radiación. **Actas XII Congreso de la SEFM**, 1-5.

SOTO, J., GÓMEZ, J. (1995). Efectos horméticos en balnearios radiactivos. **Bol. Soc. Esp. Hidrol. Med.** 3, 133-138.

SOTO, J., FERNÁNDEZ, P.L., QUINDÓS, L.S., GÓMEZ, J. (1995). Radioactivity in Spanish spas. **Sci. Total Environ.** 162, 187-192.

SOTO, J., NORIEGA, M.J. (1996). Potencial de membrana de células nerviosas y Rn-222 en balnearios. **Bol. Soc. Esp. Hidrol. Med.** 3, 147-152.

SOTO, J., MARTÍN, A., COS, S., GONZÁLEZ-LAMUÑO, D. (1997). Inducción de factores de apoptosis en células tumorales humanas por bajas dosis de radón. **IAEA/WHO Int. Conference on Low Doses of Ionizing Radiation**, 647-650.

SOTO, J. (1997). Effects of radon on the immune system. **Radon in der Kurommedizin.** Munich. Ed. ISMH Verlag Geretsried.

SOTO, J., SÁINZ, C., GONZÁLEZ-LAMUÑO, D., FALKENBACH, A., COS, S. (2000). Low radon doses sensitize MCF-7 human cancer cells to taxol. **Oncology Rep.** 7, 941-944.

SUMANTRAN, V.N., ESLOVEGA, M.W., NUÑEZ, G., CLARKE, M.F., WICHA, M.S. (1995). Overexpression of bcl-xS sensitize cells to chemotherapy- induced apoptosis. **Cancer Res.** 55, 2507-2510.

UNITED NATIONS SCIENTIFIC COMMITTEE on the EFFECTS of ATOMIC RADIATION, UNSCEAR (2000). **Sources and effects of ionizing radiation.** New York. Ed. ONU.

WHITE, E. (1996). **Apoptosis.** Ed. Scientific Handbook and Catalogue.

WOLFF, S. (1998). The adaptative response in radiobiology: evolving insights and implications. **Environ. Health Perspect.** 106, 267-283.