

Efecto de una dosis aguda de radiación ionizante en la viabilidad celular de diferentes subtipos de leucemias agudas

Effect of an acute dose of ionizing radiation in the cell viability in different subtypes of acute leukemias

Bertha García¹, Mayer Zaharia¹, Luis Pinillos¹, Alberto Lachos¹ y Cesar Saravia².

RESUMEN

Introducción: Los diferentes tipos de leucemias agudas presentan una biología diferente, lo que podría traducirse en distinta radiosensibilidad a las radiaciones ionizantes. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una dosis de radiación ionizante en la viabilidad celular en diferentes subtipos de leucemias agudas. **Métodos:** Se colectaron 20 muestras consecutivas (10 de LLA y 10 de LMA), las que fueron criopreservadas hasta su irradiación. Todas las muestras se irradiaron al mismo tiempo con 1 Gy en una máquina de Cobalto TH2 a una distancia de 80 cm de la fuente. Luego de 20 minutos, las muestras fueron sometidas a estudios de viabilidad celular. Debido a que las muestras fueron criopreservadas, se realizó una corrección en el cálculo de la viabilidad celular. **Resultados:** Todas las LLA fueron de estirpe B. Con respecto a las LMA, 2 casos fueron M2; 2 casos, M3; 4 casos, M4 y 2, M5. La mediana de viabilidad celular corregida para las LLA fue de 66,5% (Desviación estándar [DE] 6,4), mientras que para las LMA, la mediana fue de 73,0% (DE 10,3). En el grupo de LMA, la mediana de viabilidad para la LMA M2 fue de 71,9%; para M3 de 72,5%; para M4, de 78,1% y para M5, de 69,7%. **Conclusiones:** Se observa una mayor radioreistencia en las células de leucemia mieloide aguda aunque sin diferencias estadísticamente significativas, constituyéndose en un grupo con radiosensibilidad heterogénea.

Palabras clave: Radiobiología, Radiación Gamma, Leucemia Mieloide Aguda, Leucemia Linfoblástica Aguda, Viabilidad Celular.

ABSTRACT

Introduction: The different types of acute leukemia show a different biology that could translate in a different radiosensitivity to ionizing radiation. The aim of this trial was to evaluate the effect of a dose of ionizing radiation in the cellular viability in different subtypes of acute leukemia. **Methods:** 20 consecutive samples (10 of LLA and 10 of LMA) were collected, which were cryopreserved until its irradiation. All samples were irradiated at the same time with 1 Gy in a Cobalt TH2 machine with a distance of 80 cm from the source. After 20 minutes, the samples were submitted to viability cellular studies. Due to the cryopreservation of samples, a correction of the cell viability calculation was made. **Results:** All LLA were lineage B. With respect to the LMA ones, 2 cases were M2, 2 cases M3, 4 cases M4 and 2 M5. The median of the corrected cellular viability was 73,0% (DE 10,3). Within the LMA group, the viability median for the LMA M2 was 71,9%; 72,5% for M3; 78,1% for M4; and 69,7% for M5. **Conclusions:** We observed a mayor radioresistance in the acute myeloid leukemia cells although without significant statistically differences, becoming in a group with heterogeneous radiosensitivity.

Key words: Radiobiology, Gamma Radiation, Acute Myeloid Leukemia, Acute Lymphoblastic Leukemia, Cell Viability.

Afiliaciones:

1, Departamento de Radioterapia, Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas
2, Laboratorio TAMO/Criopreservación

Autor para correspondencia:

Bertha García
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas
Av. Angamos Este 2520, Surquillo
Lima 34 – Perú
Teléfono: ++511 2016500 Anexo 2260
Email: bgarcia@inen.sld.pe

INTRODUCCIÓN

Las leucemias agudas se caracterizan por la proliferación, acumulación anormal y detención de la maduración de los precursores hematopoyéticos. Existe una variación a nivel biológico y clínico entre los diferentes tipos de leucemias. En lo referente a leucemias agudas, estas se caracterizan por la presencia de un número elevado de células inmaduras, un cuadro clínico de comienzo agudo y evolución más agresiva de la enfermedad.^{1,2}

Las células eucariotas poseen una maquinaria compleja, responsable de la reparación de su material genético a las radiaciones ionizantes. Las proteínas involucradas incluyen a p53, ATM, BRCA2, p21, entre otras.^{3,4}

La radioterapia en el tratamiento de leucemias se emplea en la prevención y el tratamiento de los focos extramedulares de leucemia. El sitio más importante en la leucemia linfoblástica aguda es el sistema nervioso central, y en la leucemia mieloide aguda, además del sistema nervioso, las células neoplásicas infiltran la piel, el globo ocular y otros depósitos tisulares que son sitios de desarrollo de focos extramedulares de células leucémicas.

Las células neoplásicas se caracterizan porque presentan alteraciones en el ciclo celular, en la activación de la vía apoptótica y deficiencias en la reparación del DNA; siendo la última característica la más importante para los tratamientos basados con radiación.^{5,6}

La radiobiología en el tratamiento del cáncer se fundamenta en el estudio de los efectos citotóxicos causadas por las radiaciones ionizantes sobre las células malignas que traen como consecuencia la muerte celular. De ese modo, la radioterapia se convierte un arma para tratar esta enfermedad.

Los diferentes tipos de leucemias presentan diferentes anomalías en su biología molecular, lo que puede conllevar a diferentes respuestas al tratamiento oncológico. Por eso es importante discriminar subtipos de neoplasias que pueden responder mejor a un determinado tipo de tratamiento.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una dosis de radiación ionizante en la viabilidad celular en diferentes subtipos de leucemias agudas.

MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio prospectivo de corte transversal. Se evaluó el efecto de una dosis única de radiación Gamma en la viabilidad celular en distintos linajes de leucemias agudas.

Muestras

Se colectaron 20 muestras consecutivas de aspirado de médula ósea de pacientes con leucemias agudas, de las cuales 10 correspondieron a leucemias linfoblásticas agudas (LLA) y 10 a leucemias mieloides agudas (LMA). Conforme se colectaron, las muestras fueron sometidas a criopreservación con la finalidad de realizar una irradiación homogénea.

Aislamiento de células mononucleares

Las muestras fueron procesadas dentro de las 2 horas de la colección. En un tubo cónico de 15 ml se adicionó 3 ml de la muestra más 3 ml de solución buffer fosfato salino (PBS). En otro tubo de similares características se adicionó 3 ml de ficoll (lymphoprep) y se añadió 6 ml de la suspensión anterior, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. Luego de este tiempo, con una pipeta estéril se colectó la interfase (células nucleadas), se colocó en un tubo cónico de 15 ml, adicionándole 3 ml de PBS, se homogenizó suavemente y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Con una pipeta estéril se descartó el sobrenadante. Al botón celular obtenido se le adicionó 3 ml de PBS, se homogenizó suavemente y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Con una pipeta estéril se descartó el sobrenadante y se adicionó 1.5 ml de medio Hanks (Invitrogen).

Criopreservación

La criopreservación de estas células se realizó en viales criogénicos de 1,8 ml, para lo cual se adicionó 1,44 ml de la suspensión celular más 0,36 ml de DMSO (Cryostore). Para congelar las células, se usó una cámara de congelamiento (Forma Scientific) con un programa de descenso de temperatura. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la irradiación.

Irradiación de las muestras

Antes de la irradiación, los viales se descongelaron en un baño María a 37°C. Luego, se diluyeron en PBS para posteriormente colocar la suspensión en frascos de cultivos. Todas las muestras se irradiaron simultáneamente con 1 Gy en una máquina Cobalto TH2 a una distancia de 80 cm de la fuente. Luego de la irradiación, los cultivos fueron centrifugados para colectar las células mononucleares, y así, poder realizar las pruebas de viabilidad celular.

Pruebas de viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada antes y 20 minutos luego de la irradiación. En un tubo de 1,5 ml se colocó 0,5 ml de HBSS (Invitrogen) más 0,3 ml de una solución azul de tripán al 0,4% (Merck) más 0,2 ml de la suspensión celular a una dilución 1:5

con HBSS (Invitrogen). Se dejó en reposo durante 10 minutos. Se tomó 100 ul y se colocó en la cámara de Neubauer (Brand). La evaluación de la viabilidad celular se realizó en un microscopio óptico a 400 aumentos. Se consideraron como células viables aquellas que no se colorearon con el azul de tripán. Para calcular el porcentaje de células viables se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Células viables}}{\text{Células totales}} \times 100$$

Cálculo de la viabilidad celular corregida

Debido a que un porcentaje de las células no fue viable luego de la criopreservación, se tuvo que corregir la viabilidad celular post irradiación mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad corregida (\%)} = \frac{\text{CV Post-i} \times 100^2}{\text{CT Post-i} \times \text{V Pre-i}}$$

Donde: CV Post-i= células viables post irradiación; CT Post-i= células totales post irradiación y V Pre-i= Viabilidad pre irradiación.

Análisis estadístico.

Se presentan estadísticas descriptivas sobre las medidas de tendencia central y medidas de dispersión. La comparación entre la viabilidad celular de las LMA y LLA fue realizada usando la prueba T de Student. Se consideró un nivel de significancia $P < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Aspectos éticos

Los pacientes aceptaron donar voluntariamente sus muestras para el estudio mediante la firma de un consentimiento informado. Este protocolo de investigación (INEN N° 05-43) fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.

RESULTADOS

Se colectaron 20 muestras, de las cuales 10 correspondieron a LLA de estirpe B. Las 10 muestras de LMA correspondieron en 2 casos a LMA M2, 2 casos a LMA M3; 4 casos, a LMA M4 y 2 casos, a LMA M5. En la **tabla 1** se presentan los datos de las 20 muestras evaluadas.

Tabla 1. Resultados de la viabilidad celular de todos los casos.

Muestra	Tipo	Subtipo	Pre-irradiación			Post-irradiación			Viabilidad corregida
			# de células vivas	# de células muertas	Viabilidad (%)	# de células vivas	# de células muertas	Viabilidad (%)	
1	LLA	B	97	13	88,2	45	36	55,6	63,0
2	LLA	B	72	9	88,9	48	37	56,5	63,5
3	LLA	B	67	18	78,8	47	42	52,8	67,0
4	LLA	B	67	18	78,8	72	51	58,5	74,3
5	LLA	B	78	20	79,6	42	21	66,7	83,8
6	LLA	B	74	7	91,4	50	35	58,8	64,4
7	LLA	B	96	14	87,3	44	35	55,7	63,8
8	LLA	B	65	20	76,5	45	40	52,9	69,2
9	LLA	B	66	20	76,7	45	40	52,9	69,0
10	LLA	B	68	19	78,2	46	43	51,7	66,1
11	LMA	M5	78	5	94,0	42	33	56,0	59,6
12	LMA	M3	62	18	77,5	67	47	58,8	75,8
13	LMA	M2	77	19	80,2	37	19	66,1	82,4
14	LMA	M4	79	14	84,9	73	27	73,0	85,9
15	LMA	M4	87	18	82,9	32	23	58,2	70,2
16	LMA	M2	76	7	91,6	40	31	56,3	61,5
17	LMA	M4	88	17	83,8	31	24	56,4	67,3
18	LMA	M5	77	16	82,8	39	20	66,1	79,8
19	LMA	M3	79	17	82,3	65	49	57,0	69,3
20	LMA	M4	64	16	80,0	73	28	72,3	90,3

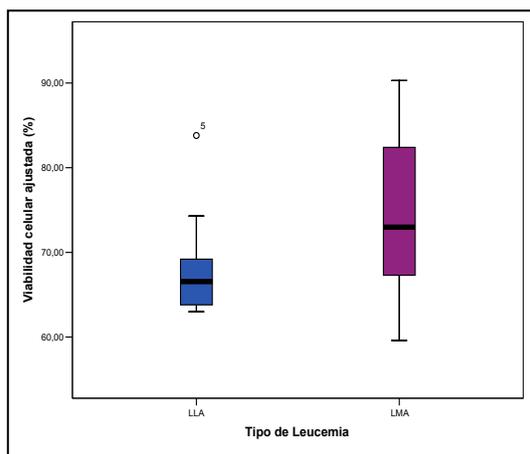


Figura 1. Viabilidad celular post irradiación según el tipo de Leucemia aguda.

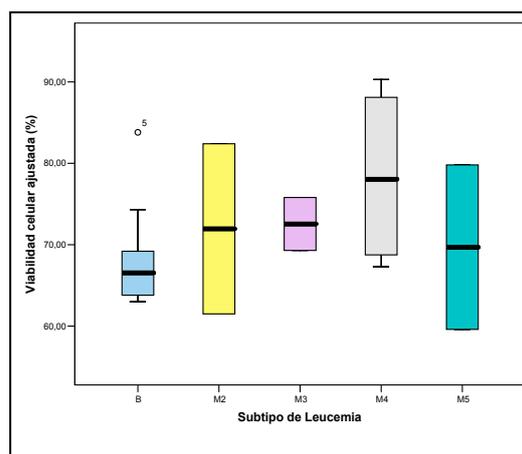


Figura 2. Viabilidad celular post irradiación según el subtipo de LMA.

No existieron diferencias entre ambos grupos cuando se comparó la viabilidad celular pre irradiación (medianas de 79,2% para LLA y 82,8% para LMA; $P=0,531$). La mediana de células evaluadas antes de la irradiación fue de 85,5 para LLA (media 90,8; DE 11,1), mientras que para el grupo de LMA fue de 93 células (media 91,4; DE 9,5), sin observarse diferencias ($P=0,899$). Del mismo modo, no existieron diferencias significativas con respecto al número de células evaluadas en ambos grupos, con una mediana de 85 células para el grupo de LLA (media 86,4; DE 14,9) y de 73 para el grupo de LMA (media 80; DE: 24,7; $P=0,495$).

La mediana de viabilidad celular corregida para las LLA fue de 66,5% (media 68,4%, Desviación Estándar [DE] 6,4), mientras que para las LMA, la mediana fue de 73,0% (media 74,2%, DE 10,3). A pesar de las diferencias observadas en las medianas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P=0,149$) (figura 1).

Cuando se compararon las medianas dentro del grupo de LMA, se observó que la mediana de viabilidad para la LMA M2 fue de 71,9%; para M3, de 72,5%; para M4, de 78,1% y para M5 de 69,7% (figura 2).

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la radiosensibilidad de diferentes linajes de leucemias agudas mediante tinción vital con azul de tripán para determinar diferencias en las tasas de viabilidad celular en los diferentes tipos de leucemias. Este estudio no pretende evaluar la muerte celular inducida por la activación de genes blanco de P53, cuya expresión se manifiestan aproximadamente una hora después de la irradiación⁷, pues ya existe en la literatura muchos estudios de este tipo. En cambio, nuestra intención fue evaluar la muerte celular producida por la toxicidad aguda de la radiación gama.

En nuestro estudio pudimos observar que, a pesar de observarse una discreta diferencia en las tasas de viabilidad celular, observándose que las LMA son más radioresistentes, no existieron diferencias estadísticamente significativas, y quizá esto ocurra porque las leucemias agudas de estirpe mieloide son más heterogéneas, evidenciándose en una mayor desviación estándar en la viabilidad celular cuando se compara con las LLA. Dentro de las LMA, observamos que las leucemias M4 son más radioresistentes.

Un sesgo de este estudio es el reducido número de subtipos de LMA, no obstante, este trabajo aporta datos interesantes con respecto a lo que ocurre con estos tumores hematológicos, evidenciándose una diferencia con respecto a las células mononucleares normales. En un estudio reciente se ha reportado que la mortalidad celular en células normales no ocurre inmediatamente, sino más bien se pueden observar diferencias en la mortalidad (irradiados versus control) a partir de las 72 horas, siendo directamente proporcional a la dosis de radiación absorbida.⁸ Probablemente, la maquinaria de reparación del DNA que trabaje en un corto plazo es menos eficiente en las células leucémicas que en las células normales.

En conclusión, se observa una mayor radioresistencia en las células de leucemia mieloide aguda que en la leucemia linfoblástica aguda, aunque sin observarse diferencias significativas, constituyendo el grupo de leucemias mieloides, un grupo de radiosensibilidad heterogénea.

REFERENCIAS

- Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341:1051-1062
- Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006 Jan 12;354:166-78.
- Lobrich M, Jeggo PA, The Two Edges Of The ATM Sword: Co-Operation Between Repair And Checkpoint Functions. *Radiother Oncol*. 2005;76:112-8.

4. Khune M, Riballo E, Rief N, Rothamm K, et al. A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res* 2004;64:500-8
5. Szumiel I. Adaptive response: stimulated DNA repair or decreased damage fixation? *Int J Radiat Biol.* 2005;81:233-41.
6. Pawlik TM, Kayomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59:928-42.
7. Brayner M, Galvão AP, de Freitas R, Amaral A. P53 protein expression and cell viability in irradiated peripheral blood mononuclear cells as bioindicators of radiosensitivity *J Biophys Chem* 2011;2:63-67.
8. Batchelor E, Loewer A, Mock C, Lahav G. Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Mol Syst Biol.* 2011;7:488.

Declaración de conflictos de intereses: Los autores declaran que no existen potenciales conflictos de intereses con esta investigación.

Financiación: El presente trabajo fue financiado por un *Grant* del INEN.