

MUTAGÉNESIS POR RX DE DIFERENTES ENERGÍAS USADAS EN RADIOTERAPIA.

Viera P.¹, Dufrechou G.¹, Vega C.¹, Rodríguez L.¹, Paolini G.², Lillo O¹.

¹ Radiobiología-Biofísica, Fac. de Medicina. Universidad de la República, Uruguay.

² Instituto Nacional del Cáncer, Uruguay.

RESUMEN

En el área de la protección radiológica se ha atribuido el mismo riesgo biológico a todas las energías de rayos-X. Sin embargo se han observado importantes diferencias entre la eficacia biológica relativa (EBR) de rX usados en diagnóstico (decenas de KeV) y en radioterapia (MeV). En el presente trabajo se evaluó sobrevida y mutagénesis en función de dosis crecientes de rX (50,80 y 110 Gy) con energías usadas en la práctica Radio-Oncológica (6 y 10 MeV). Adicionalmente se evaluó EBR, tomando como radiación de referencia: γ ⁶⁰Co [1.25 MeV], esperando encontrar diferencias entre energías tan cercanas principalmente nivel mutagénico. Se utilizó como modelo celular el eucariota *Saccharomyces cerevisiae*, cepa SC7K (auxotrófica para lisina en el locus lys2-3). Para las dos energías de rX seleccionadas se determinó la frecuencia relativa de sobrevivientes [$S = N^{\circ} \text{sobrevivientes} / N^{\circ} \text{sembradas} (No)$] y la frecuencia mutagénica (reversión a prototrofia) con las dosis arriba señaladas. La frecuencia mutagénica [M] se obtuvo mediante la expresión $M(x) = Y(x) / S(x)$, donde Y(x) es el rendimiento mutagénico ($Y = N^{\circ} \text{mut} / No$); x es dosis. Las funciones de sobrevida presentaron diferencia significativa, entre 6 y 10 MeV, solamente para 110 Gy. La mutagénesis presentó diferencia significativa a partir de 80 Gy. La EBR fue cercana a 1 hasta 30% de sobrevida y en el rango de frecuencia mutagénica estudiado: 1.5×10^{-6} a 1×10^{-5} para ambas energías de rX. A nivel molecular, los resultados sugieren diferente intensidad de inducción de las mismas vías de reparación del ADN, por 6 y 10 MeV de rX. Se requieren experimentos con dosis mayores a las del presente trabajo para optimizar el ajuste de las pendientes de las curvas dosis-efecto, evaluando diferencias entre EBR de 6 y 10 MeV para mayor letalidad y mutagénesis. No hemos encontrado diferencias significativas entre 6 y 10 MeV que justifiquen un análisis diferencial, en relación a letalidad y mutagénesis, durante la planificación de tratamientos radiantes.

1. INTRODUCCIÓN

En Biomedicina se estudian los procesos moleculares y celulares vinculados a efectos determinísticos y estocásticos de las radiaciones ionizantes. Así mismo en Radioterapia Oncológica se jerarquiza el balance entre actividad antitumoral y efectos adversos de los diferentes planes de irradiación. Los efectos adversos resultan del grado de letalidad generado en tejidos nobles (exposiciones superiores a la dosis de tolerancia) y de los efectos mutagénicos (potencialmente carcinogénicos) debidos a bajas dosis. En el área de Protección Radiológica se ha atribuido el mismo riesgo biológico para rayos X de todas las energías (1,2). Sin embargo se han observado importantes diferencias entre la eficacia biológica relativa (EBR) de rX usados en diagnóstico (energía de decenas de KeV) y la EBR de rX usados en terapia oncológica (energías del orden de MeV) (3, 4, 5, 6). El observable biológico principalmente evaluado en las publicaciones ha sido la letalidad a nivel celular y las aberraciones cromosómicas a nivel citogenético. En el presente trabajo se evaluará fundamentalmente la mutagénesis (a nivel celular) en función de la dosis de rayos X de diferentes energías usadas en la práctica Radio-Oncológica (6 y 10 MeV). Estudios a nivel

¹E-mail del Autor. olgalillo@fmed.edu.uy

celular y molecular sobre mutagénesis inducida por radiaciones ionizantes dan solidez al conocimiento de la carcinogénesis radioinducida en humanos, con especial importancia en el estudio de segundos tumores primarios inducidos por el tratamiento radiante exitoso de un primer tumor.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Población a estudiar.

Se usó como modelo celular el eucariota *Saccharomyces cerevisiae*. La utilidad de este modelo es la regularidad en resultados experimentales, la cantidad de individuos pasibles de ser tratados (tamaño muestral del orden de 10^7 - 10^8) y la gran homología estructural y funcional que presentan con células humanas, generando así, estimaciones estadísticas de alta precisión respecto de los procesos moleculares radioinducidos. La cepa fue SC7K (autotrófica para lisina en el locus *lys2-3*) proveniente de SC7K RAD+ (7,8,9).

2.2. Medios de cultivo.

- a) Medio líquido YPD conteniendo 1% de extracto de levadura, 2% bactopectona y 2% de dextrosa. Para solidificarlo se agrega agar al 2% (YPDA).
- b) OM (medio de omisión) conteniendo .67% de base nitrogenada, 2% de dextrosa, 2% de peptona y 2% de agar.

2.3. Equipos radiantes.

Fuente de rX: CLINAC 2100 C (Instituto Nacional del Cancer), tasa de dosis (\dot{D}): 200 cGy/min.

Fuente de $r\gamma$ (^{60}Co): Gamma Chamber 4000 A (Centro de Investigaciones Nucleares). \dot{D} : 177 cGy/min.

La dosimetría se realizó de acuerdo a los estándares internacionales (10).

2.4. Diseño experimental, procedimientos y tratamientos.

Muestras celulares son tomadas de cultivos mantenidos a 4°C, en medio sólido inclinado, realizándose un primer pasaje de células con asa de platino, en YPD, que se deja crecer hasta fase estacionaria a 30°C y bajo agitación continua. Se realiza un segundo pasaje en YPD, conociendo la concentración mediante conteo en cámara de Neubauer. En fase de crecimiento exponencial del segundo pasaje, se extraen muestras de cultivo para ser tratadas con dosis

crecientes de radiaciones gamma (γ), radiaciones X (rX) ($0 \text{ Gy} \geq D \leq 110 \text{ Gy}$), en equipos de similar \dot{D} .

De la suspensión celular tratada se extraen muestras: éstas son lavadas por el método de centrifugación-resuspensión en agua desionizada (pH:7). La frecuencia relativa de sobrevivientes (S) es determinada sembrando sobre YPDA en cajas de Petri del orden de 200-1000 células por caja (3 cajas por punto). La frecuencia mutagénica (M) se determina por el número de revertantes a auxotrofia (lys2 a LYS) en cada caja de Petri con OM ($5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ células/caja). Las siembras en medio sólido se mantienen a 30°C hasta la obtención de macrocolonias.

2.5. Análisis matemático.

2.5.1. Sobrevida.

De acuerdo a la distribución de Poisson, la probabilidad de sobrevida puede ser estimada por:

$$S(x) = e^{-H_k(x)} \quad (1)$$

donde H_k es el número de eventos letales y x representa la dosis del agente X.

El número teórico de eventos letales es:

$$- \ln S(x) = H_k(x) \quad (2)$$

La fracción de sobrevida se obtiene experimentalmente mediante:

$$S(x) = N_s / N_o \quad (3)$$

Donde N_s es el N° de macrocolonias provenientes de células sobrevivientes y N_o es el N° de células sembradas

2.5.2. Mutagénesis.

La frecuencia mutagénica se define como:

$$M(x) = Y(x) / S(x) \quad (4)$$

donde $Y(x)$ es el rendimiento mutagénico ($Y = N_{mut}/N_0$) (11, 12).

Análisis estadístico de sobrevida y mutagénesis: los intervalos de confianza para los valores promedio de sobrevida y mutagénesis se construirán en base a la distribución binomial para un nivel de significación de 95%.

2.5.3. Eficacia Biológica Relativa.

Se calculó como la razón de dosis de dos radiaciones de diferentes energías para un isoeffecto letal y/o mutagénico (13).

$$EBR = D(r\gamma)/D(rX) \quad (5)$$

Se utilizará $D(r\gamma)$ como valor conocido de referencia.

3. RESULTADOS

Tabla 1. Sobrevida (rayos X de 6MeV)

	50 Gy (Fraccion sobrevida)	80 Gy (Fraccion sobrevida)	110 Gy (Fraccion sobrevida)
Primer exp	0.78	0.38	0.34
segundo exp	0.72	0.43	0.3
tercer exp	0.49	0.3	0.23
Promedio	0.66 ± 0.03	0.37 ± 0.031	0.29 ± 0.029

Tabla 2. Mutagenesis (Rayos X de 6MeV)

	Control	50 Gy	80 Gy	110 Gy
Primer exp	$1.2 \cdot 10^{-7}$	$6.28 \cdot 10^{-7}$	$1.92 \cdot 10^{-6}$	$3.29 \cdot 10^{-6}$
segundo exp	$1.67 \cdot 10^{-6}$	$4.9 \cdot 10^{-6}$	$7.3 \cdot 10^{-6}$	$2.18 \cdot 10^{-5}$
tercer exp	$2 \cdot 10^{-9}$	$8.71 \cdot 10^{-8}$	$1.81 \cdot 10^{-7}$	$4.17 \cdot 10^{-7}$
Promedio	$5.97 \cdot 10^{-7}$ ± $1.73 \cdot 10^{-7}$	$1.87 \cdot 10^{-6}$ ± $3.06 \cdot 10^{-7}$	$3.13 \cdot 10^{-6}$ ± $3.96 \cdot 10^{-7}$	$8.5 \cdot 10^{-6}$ ± $6.52 \cdot 10^{-7}$

Tabla 3. Sobrevida (Rayos X de 10MeV)

1ml/(2*10 ⁴)	50 Gy (colonias)	80 Gy (colonias)	110 Gy (colonias)
Primer exp	0.59	0.3	0.14
segundo exp	0.63	0.3	0.24
tercer exp	0.57	0.38	0.32
Promedio	0.6 ± 0.031	0.33 ± 0.03	0.24 ± 0.027

Tabla 4. Mutagenesis (Rayos X de 10MeV)

	Control	50 Gy	80 Gy	110 Gy
Primer exp	2.33*10 ⁻⁸	8.24*10 ⁻⁸	3.9*10 ⁻⁷	6.36*10 ⁻⁷
Segundo exp	8.25*10 ⁻⁸	2.7*10 ⁻⁷	7.0*10 ⁻⁷	7.8*10 ⁻⁷
Tercer exp	3.53*10 ⁻⁷	8.02*10 ⁻⁷	4.03*10 ⁻⁶	1.0*10 ⁻⁵
Promedio	1.53*10 ⁻⁷ ± 8.75*10 ⁻⁸	3.85*10 ⁻⁷ ± 1.39*10 ⁻⁷	1.71*10 ⁻⁶ ± 2.92*10 ⁻⁷	3.81*10 ⁻⁶ ± 4.36*10 ⁻⁷

Tabla 5. Sobrevida (Rayos Gamma)

	50 Gy	80 Gy	110 Gy
Referencia γ	0.52 ± 0.032	0.46 ± 0.031	0.36 ± 0.03

Tabla 6. Mutagenesis (Rayos Gamma)

	Control	50 Gy	80 Gy	110 Gy
Referencia γ	1.49*10 ⁻⁶ ± 2.73*10 ⁻⁷	4.04*10 ⁻⁶ ± 4.49*10 ⁻⁷	8.9*10 ⁻⁶ ± 6.67*10 ⁻⁷	9.62*10 ⁻⁶ ± 6.94*10 ⁻⁷

La frecuencia mutagénica de la cepa SC7K-lys2 presentó gran variabilidad (como en trabajos previos: 11, 12). A los efectos de calcular EBR para mutagénesis, los valores medios experimentales hallados con rX de 6 y 10 MeV fueron normalizados de acuerdo al valor de la mutagénesis espontánea obtenida en el experimento de referencia con $r\gamma$. Dicho valor de mutagénesis espontánea no presenta diferencia significativa con los valores publicados anteriormente para la misma cepa y en iguales condiciones experimentales (11, 12).

Tabla 7. Valores normalizados de frecuencia mutagenica

	50 Gy	80 Gy	110 Gy
6MeV	$4.68 \cdot 10^{-6}$ $\pm 4.84 \cdot 10^{-7}$	$7.83 \cdot 10^{-6}$ $\pm 6.26 \cdot 10^{-7}$	$2.12 \cdot 10^{-5}$ $\pm 1.03 \cdot 10^{-6}$
10MeV	$3.75 \cdot 10^{-6}$ $\pm 4.33 \cdot 10^{-7}$	$1.66 \cdot 10^{-5}$ $\pm 9.11 \cdot 10^{-7}$	$3.71 \cdot 10^{-5}$ $\pm 1.36 \cdot 10^{-6}$

Los resultados del presente trabajo muestran que los valores de sobrevida para dosis crecientes de rX de 10 MeV se separan progresivamente (con mayor pendiente) de los valores de 6 MeV hasta presentar una diferencia estadísticamente significativa a nivel de 110 Gy, correspondiente a una sobrevida de 24% para 10 MeV y de 29% para 6 MeV (Tablas 1, 3 y 5). Para igual rango de dosis, las frecuencias mutagénicas obtenidas experimentalmente presentaron diferencias entre 6 y 10 MeV (Tablas 2 y 4). Los valores de mutagénesis para 6 y 10 MeV diferente mutagénesis espontánea dada la gran variabilidad existente en los resultados experimentales de reversión a prototrofia. Se normalizaron los valores de mutagénesis de las Tablas 2 y 4 tomando como referencia el valor de mutagénesis espontánea de $1.49 \cdot 10^{-6}$ (Tabla 6). Los valores de sobrevida y mutagénesis de $r\gamma$ para el mismo rango de dosis se muestra en Tablas 5 y 6. Las frecuencias mutagénicas normalizadas (Tabla 7) muestran valores mayores para 10 MeV que para 6 MeV a partir de 80 Gy. Se destaca que el nivel de significación estadística es mucho mayor para sobrevida que para mutagénesis.

3.1. Resultados de EBR

Los valores de referencia para calcular la EBR fueron los de letalidad y mutagénesis por dosis (D) crecientes de rayos- γ ($0 \text{ Gy} \geq D \leq 110 \text{ Gy}$). En relación a los eventos letales la EBR fue de aproximadamente 1 para rX de 6 y 10 MeV en el rango de fracción de sobrevida (S) hallado ($1 \leq S \leq 0.3$). Así mismo, y a diferencia de lo esperado, fue también cercana a 1 la EBR encontrada para el rango $1.5 \cdot 10^{-6} \leq M \leq 1 \cdot 10^{-5}$. Para evaluar la EBR se tuvieron en cuenta también los valores de letalidad y mutagénesis generados por rayos- γ en la cepa SC7K-lys2 publicados previamente (12).

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos son preliminares. Si bien las curvas dosis-efecto para las energías de 6 y 10 MeV se superpusieron en gran parte del rango de dosis estudiado, las mismas se

separan con el aumento de la dosis hasta presentar una diferencia estadísticamente significativa, tanto para eventos letales como para eventos mutagénicos. A nivel molecular, explicamos nuestros resultados en base a la inducción de vías de reparación de lesiones del ADN con similar probabilidad de error por ambas energías de rX. Los resultados sugieren globalmente diferente intensidad de inducción de las mismas vías de reparación del ADN por parte de las energías de rX estudiadas. En relación a letalidad y mutagénesis, no hemos encontrado diferencias significativas que justifiquen por si mismos un análisis diferencial, en relación a las energías estudiadas durante la planificación de tratamientos radiantes. Sin embargo estos hallazgos preliminares brindan una base para estudios adicionales, con mayor rango de dosis, que permita optimizar el ajuste de las pendientes de letalidad y mutagénesis a los efectos de realizar una mejor evaluación de la EBR de diferentes energías de rX utilizadas en Radio-Oncología.

Se agradece el apoyo técnico del Centro de Investigaciones Nucleares de la Facultad de Ciencias-UdelaR y del Servicio de Radioterapia del Instituto Nacional del Cáncer-Uruguay. La financiación del presente trabajo fue realizada por la Comisión Sectorial de Investigación Científica-Uruguay.

5. REFERENCIAS

1. ICRP. *Annals of the ICRP*, Pub. N°60. 1991.
2. ICRP. *Annals of the ICRP*, publication N°103. 2007.
3. Brenner DJ, C. S. Leu, J. F. Beatty y col. Clinical relative biological effectiveness of low-energy x-rays emitted by miniature x-ray devices. *Physics in Medicine and Biology* **Volume 44** Number 2:323, 1999.
4. Kellerer AM. "Electron spectra and the RBE of X rays". *Radiat Res.* **158**: 13-22, 2002.
5. Hill MA. "The variation in biological effectiveness of X-rays and gamma rays with energy." *Radiat Prot Dosimetry.***112(4)**:471-81, 2004.
6. Mestres M1, Caballín MR, Barrios L, y col. "RBE of X rays of different energies: a cytogenetic evaluation by FISH". *Radiat Res;***170(1)**:93-100, 2008.
7. Benathen A, Beam CA. "The genetic control of X-Ray resistance in budding yeast cells". *Radiation Research* **69**:99–116, 1977.
8. Nunes EM, Brum G, Candreva C, Schenberg Frascino AC. "Common repair pathways acting upon UV- and Xray induced damage in diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*". *International Journal of Radiation Biology* **45**: 593–606, 1984.
9. Hall EJ. *Radiobiology for the Radiologist*. J.B. Lippincott Company, 2012.
10. International Atomic Energy Agency (IAEA). "International Code of Practice for Dosimetry based on Standards of Absorbed Dose to Water." *Technical reports series*: No. **398**, 2002.
11. Lillo OL, Severgnini AA, Nunes EM. 1997. "Interactive lethal and mutagenic effects of ultraviolet light and bleomycin in yeast: Sinergism or antagonism?" *Radiation Research* **148**:476–480.

12. Lillo O., Bracesco N. y Nunes E. "Lethal and Mutagenic Interaction Between γ -rays, Cisplatin and Etoposide at the cellular and molecular levels". *Int J Radiat Biol.* **87**, pp 222-230, 2011.
13. Hunter N, Muirhead CR. "Review of relative biological effectiveness dependence on linear energy transfer for low-LET radiations". *J Radiol Prot.* **29(1)**:5-21, 2009.