

LA PREDICCIÓN DEL DAÑO AL TEJIDO SANO CAUSADO POR LA RADIACIÓN COMO PARTE DE LA INDIVIDUALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO

Luis Alberto Henríquez-Hernández^{1,2}, Elisa Bordón Rodríguez^{1,2}, Beatriz Pinar Sedeño^{1,2}, Marta Lloret Sáez-Bravo^{1,2}, Almudena Valenciano¹, Carlos Rodríguez Gallego^{1,3} y Pedro C. Lara Jiménez^{1,2}

¹Instituto Canario de Investigación del Cáncer (ICIC).

²Servicio de Oncología Radioterápica. Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín"

³Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr. Negrín".

ÍNDICE:

- 1. INTRODUCCIÓN**
 - 2. FACTORES DE RIESGO DE TOXICIDAD DEL TEJIDO SANO A LA RADIACIÓN**
 - 2.1. Relacionados con el tratamiento
 - 2.2. Relacionados con el paciente
 - 3. ESTUDIOS EN FIBROBLASTOS**
 - 4. ESTUDIOS SOBRE LINFOCITOS**
 - 4.1. Daño inicial al ADN
 - 4.2. Apoptosis radioinducida
 - 4.2.1. Predicción de la toxicidad clínica a la radiación mediante la determinación de la apoptosis radioinducida en pacientes con cáncer de cérvix
 - 4.2.2. Predicción de la toxicidad clínica a la radiación mediante la determinación de la apoptosis radioinducida en pacientes con cáncer de cabeza y cuello
 - 4.2.3. Papel de los linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B y células Natural Killer en la predicción de la toxicidad tardía radioinducida en pacientes con cáncer cervical
 - 4.3. Relación entre el daño inicial al ADN y la apoptosis radioinducida
 - 4.3.1. El daño inicial del ADN y la apoptosis radioinducida están inversamente relacionados en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado
 - 4.3.2. Vías genómicas involucradas en el daño inicial al ADN y la apoptosis radioinducida
 - 5. CONCLUSIONES**
 - 6. BIBLIOGRAFÍA**
-

1. INTRODUCCIÓN

En cualquier grupo de pacientes, se presentan una serie de efectos en el tejido sano como respuesta a un protocolo idéntico de tratamiento con radioterapia (RT). Esto es, pacientes tratados de la misma manera desarrollan fenómenos de toxicidad diferentes. Desde hace tiempo se debate si esto es el resultado de una variación determinista en la respuesta a la RT o aleatorio (estocástico) debido a la variación en la inducción y el procesamiento de los daños provocados por el tratamiento.

Actualmente, la prescripción de la dosis adecuada para cada paciente obedece al principio de minimizar las complicaciones severas de los tejidos normales y maximizar la probabilidad de control tumoral local (Burnet, Wurm et al. 1996). La existencia de una variabilidad inter-paciente en la radiosensibilidad, implica que la dosis utilizada en los tratamientos convencionales esté determinada fundamentalmente por esos pacientes más radiosensibles. La identificación de estos pacientes más radiosensibles permitiría ajustar de manera personalizada la dosis de radioterapia a administrar.

La comunidad científica ha invertido mucho tiempo y esfuerzo en desarrollar ensayos predictivos que permitan identificar aquellos pacientes más radiosensibles antes del inicio del tratamiento radioterápico. La individualización del tratamiento radioterápico, basado en ensayos predictivos de radiosensibilidad del tejido normal, puede conducir a la mejora en los resultados del tratamiento. Los resultados obtenidos hasta ahora parecen indicar que (1) existen factores biológicos del riesgo de toxicidad del tejido normal que además, varían entre los individuos y (2) estos factores pueden ser específicos para una patogenia determinada. Un ensayo predictivo ideal debe ser barato, rápido, con poder predictivo independiente, con pocos falsos positivos o negativos y lo más inocuo posible para el paciente. El conocimiento de la radiosensibilidad del tejido normal antes del tratamiento radioterápico se ha convertido en un objetivo fundamental para el desarrollo de las terapias individualizadas en cáncer.

Durante las dos últimas décadas, se han realizado importantes estudios con fibroblastos y linfocitos de pacientes para analizar la posible relación entre la radiosensibilidad celular y la respuesta clínica (Dorr and Hendry 2001). En la era genómica, son numerosos los estudios que intentan descubrir aquellos genes más importantes en el desarrollo de la toxicidad del tejido sano a la radiación, destacando los estudios con polimorfismos y los estudios de expresión génica (Andreassen and Alsner 2009; Henríquez Hernández, Lara et al. 2009).

En el presente estudio se revisarán los principales hallazgos encontrados, con especial atención a los realizados por el grupo de investigación del Departamento de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.

2. FACTORES DE RIESGO DE TOXICIDAD DEL TEJIDO SANO A LA RADIACIÓN

Éstos pueden ser divididos en dos grandes grupos: relacionados con el tratamiento o relacionados con el paciente (Azria, Betz et al., 2010).

2.1. Relacionados con el tratamiento:

- Dosis total de radiación
- Fraccionamiento de la radiación
- Duración del tratamiento

2.2. Relacionados con el paciente:

- Factores de predisposición (edad, quimioterapia concomitante, tabaco, escleroderma, diabetes,...)
- Factores genéticos (inherentes y propios de cada individuo)

Aunque todos los factores nombrados son importantes en mayor o menor medida, son los factores genéticos los que se consideran más importantes, porque además explican la amplia variabilidad inter-personal observada en la práctica clínica.

3. ESTUDIOS EN FIBROBLASTOS

Los fibroblastos son utilizados frecuentemente como modelo experimental en el estudio de la radiosensibilidad del tejido normal. La determinación de la radiosensibilidad *in vitro* de fibroblastos de piel humana surgió como una técnica prometedora como un ensayo de radiosensibilidad clínica en la década de 1980. Aunque muchos estudios habían encontrado una correlación entre reacciones del tejido normal tardías y radiosensibilidad de fibroblastos (Geara, Peters et al. 1993; Johansen, Bentzen et al. 1996; Oppitz, Denzinger et al. 1999; Oppitz, Baier et al. 2001), cuando los grandes estudios confirmatorios se llevaron a cabo, no se encontró asociación significativa entre ambas variables (Bentzen 2008).

4. ESTUDIOS SOBRE LINFOCITOS

Los linfocitos se han convertido en el tipo celular más usado para desarrollar test predictivos de toxicidad a la radioterapia. Los linfocitos son células que presentan una elevada sensibilidad a la irradiación, son fáciles de obtener por venopunción y en grandes cantidades, siendo un proceso inocuo para el paciente, además de ofrecer una mayor rapidez en la obtención de resultados. Debido a que el proceso de obtención de fibroblastos es largo, tedioso

y no es posible en el 100% de los casos, las células más utilizadas en los ensayos predictivos de toxicidad han sido los linfocitos de sangre periférica (PBLs).

4.1. Daño inicial al ADN

En principio, se acepta que las radiaciones ionizantes matan a las células eucariotas dañando estructural y funcionalmente al ADN. Se han realizado numerosos estudios a este respecto para intentar entender la respuesta de las células a ese daño en el ADN y su habilidad para recuperar la integridad genómica y sobrevivir. A este respecto se han publicado diversos estudios en los que se ha observado una fuerte correlación entre los parámetros de supervivencia celular y el daño al ADN. La supervivencia celular parece venir determinada por i) el número de roturas doble de cadena al ADN, ii) el ratio de reparación de ese daño y iii) el nivel residual de daño que quede acumulado (Ruiz de Almodovar, Guirado et al. 2002; Hoeller, Borgmann et al. 2003).

A este respecto, nuestro grupo analizó las roturas doble de cadena radioinducidas en PBLs, medidas por PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) en pacientes diagnosticadas de cáncer de mama avanzado, tratadas con radioterapia hiperfraccionada y seguidas durante 14 años y su posible relación con la toxicidad aguda y tardía. En ese estudio se demostró una relación significativa entre mayores tasas de roturas dobles de cadena y toxicidad tardía grado 3, en el subgrupo de pacientes (29 pacientes) tratadas a dosis de 81,6 Gy (Pinar, Lara et al. 2007). Observamos, en el mencionado estudio, una amplia variabilidad en torno a la cantidad de roturas dobles de cadena (DSB) producidas por la radiación en PBLs (media $1,61 \pm 0,76$ DSB/Gy de dosis por cada 200 MBp, rango 0,63-4,08). La dosis de radiación fue, como era de esperar, el principal factor predictivo de toxicidad tardía. Así, aquellas pacientes que recibieron una dosis de radiación superior a los 81,4 Gy tenían mayor riesgo de desarrollar toxicidad tardía al tratamiento. La toxicidad tardía de tipo subcutáneo aparecía en mayor proporción en aquellas pacientes que habiendo recibido dosis alta de radiación, presentaban niveles de ADN DSB superiores a 1,69 DSB/Gy/unidad de ADN.

Aunque esos resultados sugerían que la determinación del daño inicial al ADN en linfocitos podría ser una herramienta útil en la práctica clínica para predecir la toxicidad a la RT (especialmente cuando ésta se administraba a alta dosis), otra serie de estudios no mostraban dicha relación (López, Guerrero et al. 2005).

4.2. Apoptosis radioinducida

Así como el uso del daño inicial de la radiación sobre el ADN no ha tenido una traslación a la práctica clínica, debido fundamentalmente a la disparidad de resultados, la

determinación de la apoptosis radioinducida en PBLs ha tenido una mayor implantación. En este campo de investigación, nuestro grupo de investigación ha realizado importantes aportes.

Las células que mueren por apoptosis sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos característicos como son: la fragmentación del ADN, cambios en la simetría de la membrana, activación de caspasas o alteración en los niveles de las proteínas relacionadas con la muerte celular. Los resultados iniciales de la señalización apoptótica son intracelulares, mientras que la membrana plasmática permanece intacta.

La citometría de flujo ha sido una herramienta usada para determinar la apoptosis radioinducida en este tipo de células, con un éxito nada despreciable en cuanto a su capacidad para predecir la toxicidad del tejido sano a la radiación. La técnica de análisis de la apoptosis radioinducida en linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo se desarrolló en un intento de acelerar la obtención de resultados para el desarrollo de un test predictivo factible y útil en la práctica clínica rutinaria (Ozsahin, Ozsahin et al. 1997; Crompton, Miralbell et al. 1999; Barber, West et al. 2000; Crompton, Shi et al. 2001). Salvo en el estudio de Barber et al. (2000), se ha demostrado una correlación inversa entre la tasa de apoptosis radioinducida y la toxicidad del paciente.

Nuestro grupo de investigación ha publicado diversos estudios en este campo que se detallan a continuación (Bordón, Henríquez-Hernández et al. 2009; Bordón, Henríquez Hernández et al. 2010).

4.2.1. Predicción de la toxicidad clínica a la radiación mediante la determinación de la apoptosis radioinducida en pacientes con cáncer de cérvix

Se incluyeron en el estudio 94 pacientes con cáncer de cérvix. La evaluación de la toxicidad se hizo según la escala LENT-SOMA. Se aislaron los PBLs de los pacientes y tras cultivarlos, se irradiaron a 0, 1, 2 y 8 Gy de dosis. Tras esto, se dejaron en cultivo 24, 48 o 72 horas y tras ese periodo, se evaluó la apoptosis por citometría de flujo.

Tabla 1. Toxicidad de los 94 pacientes incluidos en el estudio

Toxicidad	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Sexual	15 (16,0%)	31 (33,0%)	32 (34,0%)	12 (14,9%)	2 (2,1%)
Intestinal	67 (71,3%)	21 (22,3%)	3 (3,2%)	2 (2,1%)	1 (1,1%)
Rectal	70 (74,5%)	11 (11,7%)	9 (9,6%)	3 (3,2%)	1 (1,1%)
Urinaria	67 (71,3%)	16 (17,0%)	8 (8,5%)	2 (2,1%)	1 (1,1%)

Observamos que la apoptosis radioinducida (RIA) aumentaba proporcionalmente a la dosis de radiación administrada y al tiempo de incubación y que éste parámetro se ajustaba a una curva semilogarítmica definida por la ecuación siguiente: $RIA = b \ln(Gy) + a$; donde la constante a determina la muerte celular espontánea (origen de la curva) y la constante b determina el porcentaje de células muertas por unidad de dosis (pendiente de la curva).

Tabla 2. Datos de apoptosis y apoptosis radio-inducida en PBLs tratados con 0, 1, 2, y 8 Gy de radiación tras 24, 48 y 72 horas de incubación. Los datos de apoptosis radio-inducida presentaban una distribución normal y se ajustaban a un modelo semilogarítmico. La tabla incluye valores de media \pm desviación estándar.

Dosis(Gy)	Apoptosis			Apoptosis radio-inducida (RIA)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0	25.32 \pm 21.31	28.33 \pm 21.30	24.03 \pm 19.13			
1	31.88 \pm 20.24	40.29 \pm 20.34	41.58 \pm 21.20	6.29 \pm 5.39	12.23 \pm 7.67	17.02 \pm 9.79
2	35.52 \pm 20.78	46.68 \pm 20.74	49.18 \pm 21.78	10.13 \pm 6.72	18.36 \pm 9.78	24.68 \pm 11.87
8	46.02 \pm 21.11	62.63 \pm 20.44	69.09 \pm 19.06	20.44 \pm 11.47	34.30 \pm 15.06	44.48 \pm 17.59

Aquellos pacientes que presentaban mayores niveles de b presentaban un menos riesgo de sufrir toxicidad sexual ($Exp(B) = 0,83$, C.I. 95% (0,73-0,95), $p = 0,007$; $Exp(B) = 0,88$, C.I. 95% (0,82-0,94), $p = 0,001$; $Exp(B) = 0,93$, C.I. 95% (0,88-0,99), $p = 0,026$ a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente). Esta relación inversa entre la apoptosis radioinducida y la toxicidad se observó para la toxicidad rectal ($Exp(B) = 0,89$, C.I. 95% (0,81-0,98), $p = 0,026$; $Exp(B) = 0,95$, C.I. 95% (0,91-0,98), $p = 0,013$ a las 48 y 72 horas, respectivamente) y urinaria ($Exp(B) = 0,83$, C.I. 95% (0,71-0,97), $p = 0,021$ tras 24 horas de incubación).

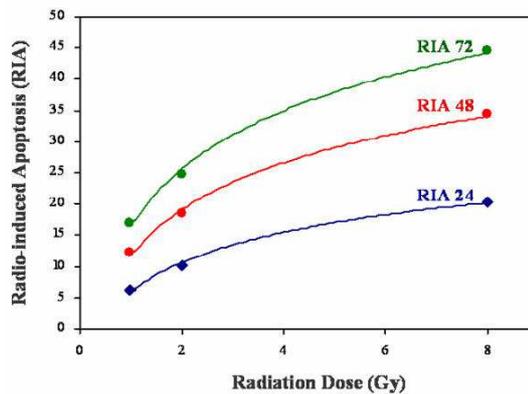


Figura que representa como los niveles de apoptosis radioinducida aumentan en función de la dosis de radiación administrada y el tiempo de incubación y como esos datos se ajustan a una curva semilogarítmica definida por las constantes a (origen de la curva en el eje Y) y b (pendiente de la curva). Imagen extraída de Bordón et al. *Radiation Oncology* 2009, **4**:58.

La apoptosis radioinducida, ajustada a un modelo matemático, proporcionaba un valor individual de radiosensibilidad que podría ser útil en la predicción de la toxicidad tardía a la RT (Bordón, Henriquez Hernández et al. 2009).

Tabla 3. Correlación entre la constante b a 24, 48 y 72 horas y la toxicidad tardía (regresión de Cox simple). La tabla incluye el valor p de significación, el Exp(B) y el intervalo de confianza 95%. *: grados 0 vs. 1-4, #: grados 0-2 vs. 3-4

Constante	Toxicidad intestinal *	Toxicidad rectal *	Toxicidad urinaria *	Toxicidad sexual # /Relaciones sexuales
p_24	p = 0,073 0,916 (0,832-1,008)	p = 0,063 0,908 (0,821-1,005)	p = 0,021 0,835 (0,717-0,973)	p = 0,007 0,834 (0,730-0,951) p = 0,001 0,884 (0,828-0,944)
p_48	p = 0,071 0,914 (0,830-1,008)	p = 0,026 0,897 (0,816-0,987)	p = 0,053 0,855 (0,729-1,002)	p = 0,026 0,935 (0,882-0,992)
p_72	p = 0,834 0,984 (0,843-1,147)	p = 0,013 0,951 (0,913-0,989)	p = 0,376 0,946 (0,837-1,069)	

4.2.2. Predicción de la toxicidad clínica a la radiación mediante la determinación de la apoptosis radioinducida en pacientes con cáncer de cabeza y cuello

En este estudio se incluyeron 79 pacientes (91% hombres) diagnosticados con cáncer de cabeza y cuello: cavidad oral y orofaringe, 36,7%; hipofaringe y laringe, 32,9%; nasofaringe/origen desconocido, 30,4%. En este caso, la toxicidad se evaluó siguiendo la escala RTOG. De la sangre de los pacientes se aislaron sus PBLs, que fueron irradiados con 0, 1, 2 y

Gy. Tras la irradiación, se mantuvieron en cultivo 24 horas y pasado ese tiempo, se evaluó la apoptosis radioinducida mediante citometría de flujo.

Tabla 4. Toxicidad de los 79 pacientes incluidos en el estudio

Toxicidad tardía	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Cutánea	26 (31,9%)	35 (44,3%)	17 (21,5%)	1 (1,3%)
Mucosa	44 (55,7%)	32 (40,5%)	2 (2,5%)	1 (1,3%)
Subcutanea	33 (41,8%)	34 (43,0%)	11 (13,9%)	1 (1,3%)
Xerostomia	17 (21,6%)	28 (35,4%)	25 (31,6%)	9 (11,4%)
Laringe	54 (68,3%)	24 (30,4%)	1 (1,3%)	0 (0,0%)
Esófago	54 (68,3%)	18 (22,8%)	3 (3,8%)	4 (5,1%)

Como era de esperar, la apoptosis radioinducida incrementó en función de la dosis de radiación, ajustándose a una curva semilogarítmica definida por las constantes a y b.

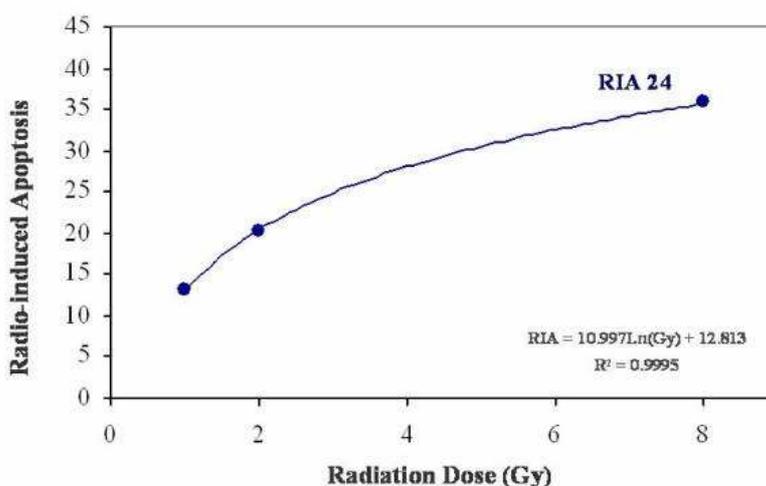
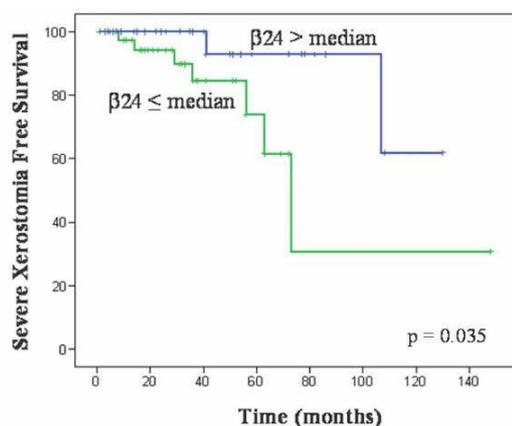


Figura que representa como los niveles de apoptosis radioinducida aumentan en función de la dosis de radiación administrada, y como esos datos se ajustan a una curva emilogarítmica. Imagen extraída de Bordón et al. *Radiation Oncology* 2010, **5**:4

La constante β se asoció significativamente a la predicción de toxicidad en términos de xerostomía (11,4% de pacientes sufrieron xerostomía severa (grado 3) vs. 88,6% de pacientes que sufrieron grado 0-2). La xerostomía es un efecto secundario a la radiación, caracterizado por sequedad en la boca (en mayor o menor grado según la severidad). Aquellos pacientes que presentaban altos niveles de apoptosis radioinducida tenían un menor riesgo de sufrir xerostomía ($p = 0,035$; $\text{Exp}(B) 0,224$, I.C.95% (0,060-0,904)).



Análisis de Kaplan-Meier que muestra como aquellos pacientes con mayores niveles de apoptosis radioinducida ($\beta_{24} > \text{mediana}$) presentaban mayores niveles de supervivencia libre de xerostomía severa. Imagen extraída de Bordón et al. *Radiation Oncology* 2010, **5**:4

Tabla 5. Relación entre supervivencia libre de xerostomía y otras variables clínica (Log Rank test)

Variables	Supervivencia a 60 meses (%)	Exp(B), CI 95%; p value
Edad (años)		
< 58	89,7	
>58	68,4	0,460 (0,109-1,702); 0,160
Género		
Masculino	82,0	
Femenino	80,0	1,676 (0,261-10,22); 0,601
Localización tumoral		
OC + Or a	73,1	(a vs. b) 2,166 (0,306-13,04); 0,524
L + H b	100	(a vs. c) 1,146 (0,281-4,712); 0,845
N + U/M c	84,4	(b vs. c) 0,960 (0,101-9,101); 0,970
Protocolo de RT		
Convencional	88,9	
Hiperfraccionado	77,6	3,950 (0,955-13,88); 0,058
CMT		
Sí	87,2	
No	80	0,755 (0,188-2,926); 0,669
Cirugía		
Sí	94,7	
No	76,8	3,910 (0,670-11,16); 0,161
Amifostine		
Sí	81,5	
No	85,5	0,617 (0,071-3,726); 0,510
beta24		
< 11,32	92,9	
> 11,32	73,9	0,224 (0,060-0,904); 0,035

OC: cavidad oral, Or: orofaringe, L: laringe, H: hipofaringe; N: nasofaringe; U/M: origen desconocido/múltiple, RT: radioterapia, CMT: quimioterapia

Estos datos estaban de acuerdo con lo previamente descrito en pacientes de cérvix, y apoyaba la teoría de que la constante b era útil en la caracterización de la sensibilidad intrínseca de cada paciente a la radiación, siendo útil como factor predictivo de xerostomía en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Bordón, Henríquez-Hernández et al. 2010).

Los estudios de Ozsahin y colaboradores, se diferenciaban de los publicados por nuestro grupo en que ellos realizaban la determinación de la apoptosis radioinducida en diferentes poblaciones linfocitarias, y no en el total de PBLs. Los estudios de Ozsahin (1997) y Crompton (1999) mostraban que dentro de controles sanos e individuos con enfermedades genéticas, se producían claras diferencias entre la radiosensibilidad de las subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y T CD8+ (Ozsahin, Ozsahin et al. 1997; Crompton, Miralbell et al. 1999). Analizaron la apoptosis radioinducida a los 2 y 8 Gy para los linfocitos T CD4+ y CD8+ de 45 donantes sanos. Se observó una buena correlación entre la apoptosis a los 2 y 8 Gy, tanto para los TCD4+ como para los CD8+ sin embargo, se observaron correlaciones inferiores cuando se relacionaba la apoptosis entre ambos tipos celulares, lo que sugiere que la muerte celular inducida dependía del tipo celular. La radiosensibilidad absoluta era también diferente entre los linfocitos T siendo los CD8+ más radiosensibles que los CD4+. Con la intención de averiguar qué población linfocitaria tenía un mayor poder predictivo en relación a la toxicidad en los pacientes con cáncer de cérvix.

4.2.3. Papel de los linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B y células Natural Killer en la predicción de la toxicidad tardía radioinducida en pacientes con cáncer cervical

Se incluyeron en el estudio 94 pacientes con cáncer de cérvix. La evaluación de la toxicidad se hizo según la escala LENT-SOMA. Se aislaron los PBLs de los pacientes y tras cultivarlos, se irradiaron a 0, 1, 2 y 8 Gy de dosis. Tras esto, se dejaron en cultivo 24, 48 o 72 horas. Tras ese periodo se evaluó la apoptosis por citometría de flujo de las distintas poblaciones linfocitarias en estudio.

De nuevo, la apoptosis radioinducida incrementó en función de la dosis de radiación y el tiempo de incubación. Los datos se ajustaron a una curva semilogarítmica en todas las poblaciones linfocitarias. Observamos que aquellos pacientes con mayores niveles de apoptosis radioinducida en sus linfocitos TCD8+ y linfocitos B, tenían un menor riesgo de desarrollar toxicidad tardía de tipo intestinal (hazard ratio (HR)=0,96, p=0,002 para linfocitos B). Lo mismo ocurría con la toxicidad rectal (HR=0,96, p=0,020; HR=0,93, p=0,05 para linfocitos B y linfocitos TCD8+, respectivamente), la toxicidad urinaria (HR=0,93, p=0,003 para linfocitos B) y sexual (HR=0,93, p=0,010 para linfocitos TCD8+).

Tabla 6. Asociación entre la constante a 24 y 48 horas y toxicidad tardía. En negrita se especifica la subpoblación linfocitaria). La tabla incluye el valor p de significación, el Exp(B) y el intervalo de confianza 95%

Constante	Toxicidad intestinal *	Toxicidad rectal *	Toxicidad urinaria *	Relaciones sexuales #
B_24	B p = 0,002 HR = 0,961 (0,924-0,982)	B p = 0,020 HR = 0,961 (0,929-0,994)	B p = 0,003 HR = 0,933 (0,892-0,977)	N.S.
B_48	N.S.	CD8 p = 0,05 HR = 0,932 (0,869-1,000)	N.S.	CD8 p = 0,010 HR = 0,935 (0,888-0,984)

*: grados 0 vs. 1-4, #: grados 0-2 vs. 3-4.

El grupo de Ozsahin ya había publicado el papel predictivo de los linfocitos TCD8+. Lo novedoso de este trabajo era el importante rol predictivo de los linfocitos B, dato que no había sido previamente descrito, así como el descarte del uso de los linfocitos TCD4+ y de las células *natural killer* (Bordón, Henríquez-Hernández et al. 2011).

4.3. Relación entre el daño inicial al ADN y la apoptosis radioinducida

Dos tipos de test parecen ser útiles en la predicción clínica de la toxicidad del tejido sano subsecuente a la radiación. Altos niveles de daño inicial al ADN se asociaban a mayores niveles de toxicidad; por el contrario, bajos niveles de apoptosis radioinducida se asociaban con altos niveles de toxicidad. El siguiente trabajo de investigación se planteó con el objetivo de estudiar las asociaciones estadísticas que pudieran existir entre ambos test predictivos.

4.3.1. El daño inicial del ADN y la apoptosis radioinducida están inversamente relacionados en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado

En este estudio se incluyeron 26 pacientes consecutivos diagnosticados con carcinoma de mama localmente avanzado. Se tomó una muestra de sangre tras la firma del consentimiento informado y se aislaron sus PBLs. La radiosensibilidad de los linfocitos se estimó mediante el número de roturas dobles de cadena (Pinar, Lara et al. 2007) y la apoptosis radioinducida. Ésta se estimó por citometría de flujo tras ser los PBLs irradiados a 1, 2 y 8 Gy. Tal y como se había establecido previamente, la media DSB/Gy/unidad de ADN fue de $1,70 \pm 0,83$ (rango 0,63-4,08; mediana 1,46). Tal y como era de esperar, la apoptosis radioinducida aumentó en función de la dosis de radiación y los datos se ajustaron a una curva

semilogarítmica. Observamos una correlación positiva entre los valores de apoptosis radioinducida en las diferentes dosis ($p < 0,0001$ en todos los casos).

Observamos una correlación inversa estadísticamente significativa entre el daño inicial al ADN y la apoptosis radioinducida a 1 Gy de dosis ($p = 0,034$). Esto mismo parecía ocurrir para 2 y 8 Gy, aunque no se alcanzó significación estadística ($p = 0,057$ y $p = 0,067$, respectivamente).

Tabla 7. Datos de apoptosis obtenidos tras la irradiación de PBL a 1, 2 y 8 Gy

	Media \pm SD	Mediana (rango)
Apoptosis Radio-inducida	13.33 \pm 7.26	12.36 (2.51-29.00)
1 Gy		
Apoptosis Radio-inducida	18.20 \pm 7.82	17.79 (4.17-32.08)
2 Gy		
Apoptosis Radio-inducida	29.70 \pm 10,05	30.44 (9.02-44.10)
8 Gy		
Coefficiente α	13.08 \pm 7.21	12.64 (1.64-26.63)
Coefficiente β	7.93 \pm 2.68	7.85 (3.18-12.57)
Coefficiente de regression	98.18 \pm 4.58	99.58 (82.49-100)

En este trabajo se mostró por vez primera que ambos test predictivos estaban relacionados, sugiriendo la posibilidad de combinar ambos para seleccionar a los pacientes más sensibles (o resistentes) a los tratamientos radioterápicos (Pinar, Henríquez-Hernández et al. 2010). En este sentido, hemos sido capaces de proponer un perfil de paciente resistente a la radiación, caracterizado por poseer bajos niveles de daño inicial al ADN y altos niveles de apoptosis radioinducida, que presentaba un menor riesgo de sufrir toxicidad tardía subcutánea tras haber recibido radioterapia a alta dosis. Estos datos aún no han sido publicados aunque el manuscrito ha sido enviado y está en revisión.

4.3.2. Vías genómicas involucradas en el daño inicial al ADN y la apoptosis radioinducida

Una vez establecimos que el daño inicial al ADN y la apoptosis radioinducida estaban relacionadas, y que incluso conjuntamente definían a un subgrupo de pacientes con cáncer de mama con mayor radio-resistencia, decidimos estudiar los mecanismos moleculares detrás de ambos procesos, con la intención de averiguar el por qué de esa relación.

Tabla 8. Vías de señalización comúnmente reguladas

Nombre de la vía	Toxicidad	DNA DSB	β 24
Acute myeloid leukemia			$p < 0,01$
Alzheimer's disease			$p < 0,01$
Antigen processing and presentation			$p < 0,01$
Apoptosis			$p < 0,001$
Axon guidance	$p < 0,01$		
Colorectal cancer			$p < 0,05$
Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori			
Infection	$p < 0,001$		
ErbB signaling pathway	$p < 0,01$	$p < 0,05$	
Focal adhesion	$p < 0,01$		$p = 0,05$
Huntington's disease			$p < 0,05$
MAPK signaling pathway	$p < 0,001$		
Natural killer cell mediated cytotoxicity	$p < 0,01$		$p < 0,01$
Non-homologous end-joining			$p < 0,05$
p53 signaling pathway			$p < 0,001$
Pathways in cancer			$p < 0,01$
Phosphatidylinositol signaling system	$p < 0,001$	$p < 0,05$	
Protein export	$p < 0,001$		
Regulation of actin cytoskeleton	$p < 0,01$	$p < 0,001$	
Regulation of autophagy	$p < 0,001$		$p = 0,057$
Renal cell carcinoma	$p < 0,001$		
T cell receptor signaling pathway	$p < 0,001$		
Vibrio cholerae infection	$p < 0,001$		
Wnt signaling pathway			$p < 0,05$

Se incluyeron en el estudio 12 pacientes consecutivos diagnosticados con cáncer de mama localmente avanzado y tratados con radioterapia radical hiperfraccionada. Este tipo de pacientes se caracteriza por tener un estado avanzado de la enfermedad, por no haber respondido a la quimioterapia neoadyuvante y por tanto, por no ser operables. La única opción terapéutica que les queda es la radioterapia a alta dosis. Se obtuvieron datos de daño inicial, de apoptosis radioinducida y se procedió al estudio de expresión génica mediante la tecnología de DNA microarray. Tanto el daño inicial como la apoptosis radioinducida (constante b), fueron categorizados en función de los tertiles de la distribución (tertiles 1 a 3). El análisis de microarrays se realizó utilizando el programa informático *Statistical Analysis for Microarrays* (SAM); los análisis de agrupamiento se llevaron a cabo en el programa *MultiExperiment Viewer* (MeV); y los análisis de regulación de vías de señalización se llevaron a cabo en los programas *OntoExpress* y *PathwayExpress*.

Observamos que 34 genes eran capaces de segregar a los pacientes en base a su daño inicial (categorizado por tertiles); y que 42 genes hacían lo mismo en relación a la apoptosis radioinducida ($p < 0,01$ en ambos casos). Encontramos 16 vías de señalización comúnmente reguladas en ambos procesos; destacando las siguientes: *B cell homeostasis*, *Lymphocyte*

homeostasis, Metabolic process, Post-translational protein modification, Regulation of cell cycle o Regulation of cellular process.

Previamente habíamos publicado en esta misma serie, cómo determinado perfil de expresión génica segregaba a estos pacientes según su toxicidad a la radiación (aguda y crónica) (Henríquez Hernández, Lara et al. 2009). Al realizar el análisis combinado entre las tres variables, encontramos vías de señalización reguladas comunes. Estos datos ayudan a entender por qué ambos procesos están conectados y como esto se traduce en la aparición de una determinada toxicidad. Hasta ahora, no se habían explorado estos mecanismos a un nivel genómico. Aunque se encuentran en un estado de revisión avanzado, los datos no han sido oficialmente publicados.

5. CONCLUSIONES

Las reacciones de toxicidad a la radioterapia condicionan la aplicación y el éxito del tratamiento. Es por tanto deseable conocer de antemano la sensibilidad a la radiación que tienen los pacientes individualmente. Aunque son varios los test predictivos que se han desarrollado, la estimación del daño inicial al ADN y, sobretodo, de la apoptosis radio inducida en linfocitos de sangre periférica, parecen ser los ensayos más prometedores, máxime cuando se ha demostrado que ambos eventos están relacionados entre sí y que comparten vías de señalización comunes a nivel genómico. No obstante, estos test aún necesitan ser validados a nivel clínico para una futura implementación en la práctica clínica diaria.

6. BIBLIOGRAFÍA

Andreassen, C. N. and J. Alsner (2009). "Genetic variants and normal tissue toxicity after radiotherapy: a systematic review." *Radiother Oncol* **92**(3): 299-309.

Azria, D., M. Betz, et al. (2010) "Identifying patients at risk for late radiation-induced toxicity." *Crit Rev Oncol Hematol*. Sept. 23.

Barber, J. B., C. M. West, et al. (2000). "Detection of individual differences in radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes in normal individuals, ataxia telangiectasia homozygotes and heterozygotes, and breast cancer patients after radiotherapy." *Radiat Res* **153**(5 Pt 1): 570-8.

Bentzen, S. M. (2008). "From cellular to high-throughput predictive assays in radiation oncology: challenges and opportunities." *Semin Radiat Oncol* **18**(2): 75-88.

Bordón, E., L. A. Henriquez-Hernández, et al. (2011) "Role of CD4 and CD8 T-lymphocytes, B-lymphocytes and Natural Killer cells in the prediction of radiation-induced late toxicity in cervical cancer patients." *Int J Radiat Biol* **87**(4): 424-31.

Bordón, E., L. A. Henriquez-Hernández, et al. (2010) "Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs)." *Radiat Oncol* **5**: 4.

Bordón, E., L. A. Henriquez Hernández, et al. (2009). "Prediction of clinical toxicity in localized cervical carcinoma by radio-induced apoptosis study in peripheral blood lymphocytes (PBLs)." *Radiat Oncol* **4**: 58.

Burnet, N. G., R. Wurm, et al. (1996). "Normal tissue radiosensitivity--how important is it?" *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **8**(1): 25-34.

Crompton, N. E., R. Miralbell, et al. (1999). "Altered apoptotic profiles in irradiated patients with increased toxicity." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**(3): 707-14.

Crompton, N. E., Y. Q. Shi, et al. (2001). "Sources of variation in patient response to radiation treatment." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **49**(2): 547-54.

Dorr, W. and J. H. Hendry (2001). "Consequential late effects in normal tissues." *Radiother Oncol* **61**(3): 223-31.

Geara, F. B., L. J. Peters, et al. (1993). "Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **27**(5): 1173-9.

Henriquez Hernández, L. A., P. C. Lara, et al. (2009). "Constitutive gene expression profile segregates toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy." *Radiat Oncol* **4**: 17.

Hoeller, U., K. Borgmann, et al. (2003). "Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer." *Radiother Oncol* **69**(2): 137-44.

Johansen, J., S. M. Bentzen, et al. (1996). "Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, telangiectasia, and skin erythema after radiotherapy." *Radiother Oncol* **40**(2): 101-9.

Lopez, E., R. Guerrero, et al. (2005). "Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes." *Breast Cancer Res* **7**(5): R690-8.

Oppitz, U., K. Baier, et al. (2001). "The in vitro colony assay: a predictor of clinical outcome." *Int J Radiat Biol* **77**(1): 105-10.

Oppitz, U., S. Denzinger, et al. (1999). "Radiation-induced comet-formation in human skin fibroblasts from radiotherapy patients with different normal tissue reactions." *Strahlenther Onkol* **175**(7): 341-6.

Ozsahin, M., H. Ozsahin, et al. (1997). "Rapid assay of intrinsic radiosensitivity based on apoptosis in human CD4 and CD8 T-lymphocytes." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **38**(2): 429-40.

Pinar, B., L. A. Henríquez-Hernández, et al. (2010) "Radiation induced apoptosis and initial DNA damage are inversely related in locally advanced breast cancer patients." *Radiat Oncol* **5**: 85.

Pinar, B., P. C. Lara, et al. (2007). "Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with highdose hyperfractionated radical radiotherapy." *Radiat Res* **168**(4): 415-22.

Ruiz de Almodovar, J. M., D. Guirado, et al. (2002). "Individualization of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity." *Radiother Oncol* **62**(3): 327-33.