



EFFECTOS DE VECINDAD DE LA RADIACIÓN IONIZANTE Y SUS IMPLICACIONES EN RADIOTERAPIA Y RADIOPROTECCIÓN

Prof. Dr. Fernando D. Saraví

Área de Física Biológica, Departamento de Morfofisiología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo y Fundación Escuela de Medicina Nuclear (FUESMEN)

RESUMEN

En el paradigma clásico, los efectos biológicos de la radiación ionizante se atribuyen al daño en el ADN inducido en cada célula irradiada. La demostración de efectos de vecindad causados por radiación ionizante (EVIR) ha generado un cambio profundo en la concepción actual de la radiobiología. Los EVIR son aquellos efectos causados por la radiación que se producen en células que no han sido irradiadas. Diversos avances técnicos, en particular el empleo de microhaces, han permitido estudiar los EVIR *in vitro*. Se conocen dos vías por las cuales las células irradiadas pueden comunicarse con las no irradiadas, a saber: mediante uniones especializadas (nexos) que comunican los citoplasmas de células adyacentes, y mediante la secreción de factores solubles al medio extracelular. Estos factores incluyen varias citocinas y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Las vías de señalización en las células afectadas involucran en particular la activación de proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK) y del factor de transcripción NF- κ B y de las enzimas ciclooxigenasa 2, sintasa de óxido nítrico 2 y NAD(P)H oxidasa. Los EVIR pueden causar mutaciones puntuales y cambios epigenéticos. Los efectos sobre las vías de señalización pueden persistir indefinidamente e incluso transmitirse a la descendencia. Paradójicamente, en ciertas condiciones los EVIR pueden ser adaptativos, es decir que tornan a las células afectadas más resistentes a la radiación. La adaptación exige síntesis de proteínas y mejora la capacidad celular de reparar el ADN y resistir el estrés oxidativo. Los EVIR también se han demostrado *in vivo*. Por tanto, pueden tener implicaciones importantes en radioterapia, tanto para mejorar la eficacia terapéutica como para reducir la incidencia de efectos adversos. Asimismo, su mejor conocimiento puede influenciar las normas internacionales de radioprotección.

Palabras claves: Efectos abscopales, efectos adaptativos, efectos de vecindad, radioprotección, radioterapia.

ABSTRACT

According to the classical paradigm, biological effects of ionizing radiation are attributed to DNA damage induced in each irradiated cell. Demonstration of ionizing radiation-induced bystander effects (RIBE) has generated a deep change in current understanding of radiobiology. RIBE are radiation-induced effects produced in cells that have not been actually irradiated. Several technical advances, particularly the use of microbeams, allowed *in vitro* study of RIBE. There are two known ways by which irradiated cells can communicate with non-irradiated cells, namely: through gap junctions connecting the cytoplasms of adjacent cells, and through the secretion of soluble factors to the extracellular medium. These factors include several cytokines and reactive species of oxygen and nitrogen. In the affected cells, signalling pathways mostly involve activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK), NF- κ B transcription factor and of the enzymes cyclooxygenase 2, nitric oxide synthase 2 and NAD(P)H oxidase. RIBE induce point mutations and epigenetic changes. Effects on cellular signalling pathways can persist indefinitely and even be transmitted to the progeny of affected cells. Paradoxically, under certain conditions RIBE may be adaptive, which means that they turn affected cells more resistant to ionizing radiation. Adaptation demands protein synthesis. It enhances DNA repair mechanisms and resistance to oxidative stress. RIBE have also been demonstrated *in vivo*. Thus, they may have important implications for radiotherapy, both to improve therapeutic efficacy and to reduce the incidence of adverse effects. Furthermore, a better understanding of RIBE may have an influence on international radioprotection standards.

Key words: Abscopal effects, adaptive effects, bystander effects, radioprotection, radiotherapy.

Introducción

Durante el medio siglo que siguió al descubrimiento de las radiaciones ionizantes en 1895, se acumuló un enorme caudal de datos sobre sus efectos biológicos. Sin embargo, los avances sobre modelos teóricos de acción radiobiológica que guiasen la experimentación básica y clínica comenzaron a producirse a mediados del siglo XX, y fueron propulsados en parte por el descubrimiento de la función y estructura del ADN.

Los modelos clásicos, llamados en conjunto de “blanco (diana) celular” suponen que la radiación ionizante provoca alteraciones en el ADN por interacción directa, o indirectamente a través de la radiólisis del agua solamente en las células donde se deposita la energía disipada por la radiación (1-3). Si bien se admitía que la alteración de otras macromoléculas podía modular la respuesta a la radiación, el daño causado por la radiación dependía en último extremo de las roturas de la doble hélice de ADN (4).

En los últimos años se ha acumulado evidencia de que los efectos de la radiación ionizante pueden afectar significativamente a células que no han recibido ninguna radiación pero se encuentran en contacto con células irradiadas o próximas a ellas. El fenómeno se ha denominado colectivamente “efecto de vecindad” (*bystander effect*) de las radiaciones ionizantes. El nombre se tomó prestado del campo de la oncología experimental. En 1993 se informó que la introducción en un tumor de un gen viral que tornaba a las células transfectadas sensibles a un fármaco antiviral, causaba también apoptosis de células que no habían incorporado el gen (5). Estas células no transfectadas eran alteradas por vecindad, y se empleó el término “*bystander effect*” para describir el fenómeno.

Poco antes (1992), Nagasawa y Little informaron que, en células sometidas *in vitro* a radiación alfa (núcleos de helio, He^{2+}) de modo que solamente 1 % de la población fuese alcanzado por las partículas ionizantes, se observaban intercambios

de cromátides hermanas (ICH) en aproximadamente 30 % de las células (6). La afectación de células no irradiadas causada por la irradiación de una pequeña fracción de la población se denominó luego “*bystander effect*” por analogía con el efecto de vecindad observado con la terapia génica. Los efectos de vecindad también se llaman “no dirigidos” (*non-targeted*) pues suceden en células que no son el blanco de la irradiación (**Fig. 1**). En radioterapia se conocen efectos similares fuera del campo irradiado, también llamados abscopales (7).

En los últimos años se ha acumulado evidencia de efectos de vecindad de la radiación ionizante en diferentes condiciones, tipos de células y tejidos *in vitro* e *in vivo*. Sus mecanismos son objeto de activa investigación, pero lo que hoy se sabe basta para motivar una revisión de los modelos clásicos, al punto que se habla de un nuevo paradigma en radiobiología (8). Además de los efectos sobre las propias células irradiadas, un modelo actual debe incorporar los efectos sobre la descendencia de las células irradiadas que sobreviven y conservan la capacidad de reproducirse – en particular la inestabilidad genómica (9) – y los efectos de vecindad (10). Los efectos de vecindad pueden ser mediados por comunicaciones intercelulares o por la secreción de factores solubles.

Retrospectivamente se descubrió que varios trabajos publicados entre las décadas de 1920 y 1950 ya sugerían la existencia de los hoy llamados efectos de vecindad. No obstante, como ocurre a menudo en ciencia (11), las implicaciones de esas investigaciones no fueron justipreciadas en su momento, y luego fueron olvidadas cuando se estableció el paradigma dominante durante la segunda mitad del siglo XX.

En la presente breve revisión se presentan algunos modelos empleados para estudiar los efectos de vecindad inducidos por radiación ionizante (EVIR) y se describen dichos efectos. A continuación se examina lo que hoy se sabe sobre los

mecanismos fisiológicos y moleculares involucrados. Finalmente, se trata su importancia en radioprotección y radioterapia.

EMPLEO DE MICROHACES

La existencia de EVIR provista por el trabajo pionero de Nagasawa y Little (6) descansaba sobre un argumento estadístico, a saber, que la proporción estimada de células que fue atravesada por una partícula alfa era muy inferior a la proporción de células que presentaron alteraciones cromosómicas.

Posteriormente, otros estudios proporcionaron evidencia directa de EVIR. Un avance técnico que posibilitó estas demostraciones fue el desarrollo de microhaces de radiación particulada (como partículas alfa y electrones) o electromagnética (radiación X y gamma). La tecnología de microhaces no solamente permite seleccionar precisamente las células a irradiar, sino incluso enfocar el haz a voluntad en el núcleo o en el citoplasma (12).

Con estas técnicas fue posible demostrar EVIR con la menor dosis posible, es decir cuando una sola célula es atravesada por una sola partícula alfa (13). Además, el efecto puede producirse cuando la única célula blanco es irradiada con una sola partícula que atraviesa el núcleo o el citoplasma sin tocar el núcleo (14). También se demostró que microhaces de radiación electromagnética ionizante producían efectos cualitativamente similares a los de microhaces de partículas ionizantes(15).

Las alteraciones causadas por EVIR *in vitro* incluyen intercambio de cromátides hermanas, formación de micronúcleos, mutaciones puntuales, deleciones, rearreglos de cromosomas, apoptosis, inestabilidad genómica y diversas respuestas de estrés celular (16).

LA RADIACIÓN IONIZANTE COMO ESTRÉS CELULAR

La respuesta celular a la radiación ionizante se concibe actualmente como un caso particular de reacción al estrés, una respuesta activa frente a un agente agresor que amenaza la integridad celular y altera la fisiología de la célula irradiada y la de sus vecinas. La organización específica de la respuesta, en extremo compleja, puede variar entre tipos de células diferentes, entre células normales y neoplásicas e incluso en un mismo tipo celular en diferentes condiciones o estados fisiológicos (por ejemplo, dependiendo de la fase del ciclo celular).

Un efecto importante del estrés radiante es la inducción de roturas de las dos hebras de ADN, consideradas las lesiones de mayor importancia genotóxica y muy bien correlacionadas con la letalidad celular de la radiación ionizante (2, 4). La presencia de quiebres de las dos hélices es detectada por la kinasa ATM (que está mutada en la ataxia telangiectasia) y otras macromoléculas, que ponen en marcha la respuesta celular al estrés inducido por radiación (**Fig. 2**) (17). Los mismos complejos macromoleculares que detectan las roturas ponen en marcha una cascada de otras kinasas y factores de transcripción que desencadenan la respuesta celular al estrés radiante (18).

La forma en que las lesiones de las dos hebras son marcadas para su eventual reparación involucra la kinasa relacionada con ataxia-telangiectasia, ATR (19) ATM, que fosforila la histona H2AX asociada al ADN. La forma fosforilada de esta histona se llama gamma-H2AX y es un marcador de lesiones de las dos hebras (20). Notablemente, en los núcleos de células no irradiadas es posible detectar gamma-H2AX (21) y su aparición permite monitorear la producción de EVIR (22). Si bien ATR y ATM contribuyen a la supervivencia de las células irradiadas, su bloqueo atenúa los efectos perjudiciales (muerte celular) causados por EVIR en las células no irradiadas (19).

LOS NEXOS PUEDEN MEDIAR EVIR

La existencia de EVIR implica que deben de existir vías por las cuales señales procedentes de las células efectivamente irradiadas produzcan efectos sobre las células no irradiadas. Las vías conocidas son las uniones comunicantes y la secreción de factores solubles.

Las uniones comunicantes, conexiones o nexos son poros que comunican el citoplasma de células adyacentes (23). Se encuentran en una gran variedad de tejidos y cumplen diversas funciones (24). Los nexos están constituidos por oligómeros de proteínas llamadas conexinas, de las cuales existen más de veinte clases diferentes en el ser humano. En cada célula, las conexinas se disponen en hexámeros que forman la pared del poro. La unión comunicante se establece cuando se acoplan hexámeros de células adyacentes (**Fig. 3**). El poro así formado permite la transferencia de agua, iones y moléculas de hasta 1500 Da (23, 24).

La evidencia de la participación de los nexos en EVIR ha sido revisada por Azzam y colaboradores (25, 26). Cuando se compararon cultivos confluentes de fibroblastos humanos con abundantes nexos con otros deficientes en nexos, se observó que los EVIR causado por dosis bajas de partículas alfa se producían en los primeros. Además, el bloqueo de los nexos con diversos agentes, como el pediculida neurotóxico lindano, suprimió los EVIR (27). La importancia de los nexos se demostró también en células epiteliales de rata y en cultivos fibroblastos embrionarios de ratones normales y ratones con supresión del gen de la conexina 43 (28). Otros autores confirmaron la importancia de los nexos empleando microhaces (29-31) y partículas de alta energía (32).

Asimismo, se observó que dosis bajas (desde 0.16 cGy; 1 Gy [gray] equivale a una energía absorbida de 1 joule/kilogramo) de partículas alfa inducen la expresión de conexina 43, con aumento de la transcripción y síntesis de la proteína en varios

tipos de células. El efecto también fue causado por rayos gamma y oxidantes (33). Esto indica que la expresión de la conexina puede ser parte integral de la respuesta al estrés radiante.

En conjunto la evidencia indica que, en células confluentes, al menos algunos EVIR son mediados por nexos, de modo que la población celular responde en conjunto al estrés radiante aunque no todas las células hayan sido irradiadas. Sin embargo, aún se desconoce qué factores específicos transferidos a través de las uniones comunicantes sean responsables de los EVIR observados.

EVIR MEDIADOS POR SEÑALES EXTRACELULARES

Además de los EVIR mediados por nexos, diversos estudios proporcionan evidencia de EVIR que no requieren contacto físico entre las células irradiadas y las no irradiadas.

Un modelo experimental involucra la irradiación de células en un medio de cultivo definido, con posterior exposición de células no irradiadas al medio de cultivo en ausencia de células irradiadas (34-36). Los efectos no requieren nexos e incluso pueden intensificarse cuando se bloquean las uniones comunicantes (37). En otro modelo, se colocan en el mismo medio las células a irradiar y las células en las que se desean estudiar EVIR, sin contacto entre ambos grupos (38, 39).

Algunos de los mediadores extracelulares de los EVIR y las vías intracelulares que son activadas por ellos en las células no irradiadas ya han sido identificados. Se trata de moléculas, receptores y sistemas de segundos mensajeros que no son específicos para la radiación ionizante, sino que participan en numerosos procesos fisiológicos y patológicos que involucran estrés celular.

Entre los factores extracelulares vinculados con EVIR están el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) (39), el factor transformante del crecimiento beta 1 (TGF β 1) (40), las interleukinas 6 y 8 (41, 42) y especies reactivas del oxígeno (34,

43) y del nitrógeno (44, 45). Ambas clases de especies reactivas pueden inducir en las células no irradiadas corrientes de Ca^{2+} cuyo bloqueo modifica los EVIR (46).

Tres enzimas centrales en la inducción de EVIR mediados por señales extracelulares son la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS2 = NOS2), la ciclooxigenasa 2 (COX2) y la NAD(P)H oxidasa (25, 47).

La expresión de COX2 y NOS2 es estimulada por las interleukinas, TNF α y TGF β 1 por interacción con sus respectivos receptores de membrana que intracelularmente causa activación de proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK) como ERK 1/2, Jnk y p38, y del factor de transcripción NF- κ B (39, 48-50). Las especies reactivas del oxígeno también activan la expresión de reguladores del ciclo celular y la apoptosis como p53 y factores asociados con su regulación y acción, como p21^{Waf1}, p34 y MDM2 (26, 48).

La NAD(P)H oxidasa es una enzima ligada a la membrana que cataliza la producción de anión superóxido (O_2^-) a partir de oxígeno y NADPH, y secundariamente de otras especies reactivas del oxígeno (51). Esta enzima puede ser activada por radiación ionizante y parece responsable de algunos EVIR que son evitados o atenuados por la presencia de superóxido dismutasa (52). La NAD(P)H oxidasa se asocia a microdominios de membrana llamadas "balsas lipídicas". Estos microdominios poseen alta concentración de colesterol, esfingomielina y una serie de proteínas asociadas (53). Las balsas lipídicas participan en diversos mecanismos de señalización, que además de la NAD(P)H oxidasa incluyen las conexinas. Existe evidencia de su importancia en la biología tumoral (54). También participan en los EVIR como mutaciones e intercambio de cromátides hermanas, formación de micronúcleos y fosforilación de H2AX. Su disrupción farmacológica atenúa estos EVIR (14, 55, 56).

Existe asimismo evidencia de la participación de las mitocondrias en los EVIR. Además de producir flujo de Ca^{2+} en la membrana plasmática y aumento de la concentración de especies reactivas del oxígeno, la radiación induce una reducción del potencial transmembrana de las mitocondrias (57). Se ha informado que los EVIR pueden afectar el ADN mitocondrial (58). Los fibroblastos con depleción de ADN mitocondrial muestran EVIR más intensos que los fibroblastos normales; sin embargo, cuando ambos tipos de fibroblastos coexisten y una sola clase es irradiada, los EVIR sobre ambos tipos se atenúan. La activación de NF- κ B y sus vías dependientes, COX2 y NOS2, participan en estos efectos (59). Recientemente se ha hallado que en las células afectadas por vecindad hay mayor activación de la proteína kinasa C que en las células irradiadas y controles (60). Se detectó un aumento de dos a tres veces en la isoforma epsilon de la proteína kinasa C. El bloqueo de la expresión de esta enzima redujo significativamente la formación de micronúcleos por EVIR consecutiva a la irradiación de partículas alfa y rayos gamma (61).

Si bien se ha demostrado la existencia de EVIR en numerosos tipos de célula, aún no está clara si su magnitud está determinada por las características de la célula irradiada, las de sus vecinas no irradiadas o ambas. La última posibilidad es indicada por la observación que células deficientes en una enzima central en el ciclo de las pentosas, la glucosa 6-fosfato dehidrogenasa, no generan EVIR al ser irradiadas, ni responden al medio proveniente de otros tipos de células irradiadas (62). En forma similar, células deficientes en Rad51 y factores asociados, que carecen de mecanismos eficientes de reparación del ADN mediante recombinación homóloga, son resistentes al intercambio de cromátides causados por partículas alfa (63). Por otra parte, células de ratón deficientes en el gen de radiorresistencia Rad9 sufren considerablemente mayor proporción de apoptosis y formación de micronúcleos por EVIR que las células normales (64).

En resumen, los EVIR involucran diversas vías extra e intracelulares (**Fig. 4**). Recientemente se ha propuesto un modelo unificado que incluye dichas vías y sus interrelaciones (65).

ADAPTACIÓN INDUCIDA POR EVIR

Un hecho importante, hasta aquí no mencionado, es que los EVIR pueden ser tanto desfavorables como favorables para las células no irradiadas (**Fig. 5**). Los efectos favorables se denominan en conjunto “adaptativos”. La noción de adaptación a la radiación ionizante se originó a raíz de que la irradiación con rayos X producía un número menor de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos si éstos eran primero incubados con timidina tritiada (66).

Se considera que existe adaptación cuando las células sometidas a una dosis baja de radiación (condicionante) presentan una respuesta menos intensa a una dosis mayor aplicada posteriormente. La adaptación se atribuye a la inducción, en las células condicionadas, de mecanismos más eficaces para reparar el ADN y resistir el estrés radiante (64). La existencia de adaptación ha sido demostrada en diversos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* y requiere síntesis de proteínas (8, 68-70).

Se ha demostrado en ciertas condiciones la existencia de EVIR adaptativos mediados por señales extracelulares. Fibroblastos normales toleran mejor una dosis de radiación si previamente son expuestos al medio de fibroblastos irradiados con bajas dosis (1 cGy) de rayos gamma (71) o de partículas alfa (72). El efecto se asoció con reducciones en p53 y aumento en especies reactivas del oxígeno y en la endonucleasa AP, una enzima reparadora del ADN. La exposición de keratinocitos a medio de células irradiadas con 5 Gy (pero no con dosis menores) causó un aumento importante de la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl2 (73). Otro grupo demostró que los EVIR (muerte celular y transformación oncógena) inducidos por co-cultivo de células no irradiadas con células irradiadas se atenuaban drásticamente si

las primeras eran previamente expuestas horas antes a 2 cGy de rayos X (74). Asimismo, la exposición de células híbridas (HeLa-fibroblasto) a bajas dosis de radiación con tasas de 1.4 mGy/día por tres meses redujo su transformación maligna inducida por dosis altas. El efecto no se observó si la tasa de radiación condicionante era inferior a 1 mGy/día (75).

La exposición de fibroblastos de pulmón al medio de células irradiadas produjo un aumento de su proliferación, aparentemente mediado por bajas concentraciones TGF β (76). De manera similar, en otro estudio hubo una relación inversa entre el grado de dilución del medio proveniente de células irradiadas y el aumento de capacidad clonogénica por EVIR (77). Asimismo, las diferencias en la tasa de disipación de energía (LET = *linear energy transfer*) pueden explicar respuestas diferentes (78). Esto sugiere que los mismos factores que causan EVIR perjudiciales para las células son responsables de algunos efectos adaptativos, según la concentración de factores, la calidad de la radiación y el tipo de célula estudiada.

Otro factor relevante es la interacción de las células según la geometría cuando forman parte de un tejido o son importantes las relaciones tridimensionales (79, 80). Los EVIR se han demostrado, por ejemplo, en tejido epidérmico humano (81). En un modelo de explante ureteral, se demostraron tanto apoptosis como inducción de diferenciación (82). En condiciones de irradiación de una porción bien delimitada del tejido predomina el efecto adaptativo, con un aumento de las células uroteliales diferenciadas (83). Se ha formulado un modelo de EVIR aplicable a tejidos con geometría tridimensional (84).

EVIR OBSERVADOS *IN VIVO*

La existencia de EVIR que pueden ser tanto nocivos como beneficiosos para las células plantea el interrogante de las consecuencias que puedan tener para el organismo (85, 86). Por ejemplo, un EVIR adaptativo para las células puede ser

bueno para el organismo si se trata de células normales, pero malos si las células beneficiadas son neoplásicas (excepto si induce su diferenciación). A la inversa, un EVIR nocivo para las células es bueno para el organismo si se trata de células transformadas, pero malo si afecta a células normales.

Las demostraciones más convincentes de la existencia de EVIR se han demostrado principalmente en estudios *in vitro* de cultivos de células o tejidos (8, 16, 26, 87, 88). Sin embargo, se está acumulando evidencia que indica la existencia de EVIR producidos en el organismo intacto (89-91).

En realidad, se sabe desde hace varias décadas que el plasma de personas irradiadas terapéutica o accidentalmente contiene uno o más factores capaces de inducir aberraciones cromosómicas en leucocitos normales de personas no expuestas (92, 93). Estos factores se han denominado “clastogénicos” y persisten en el plasma muchos años después de la irradiación (94). Su existencia también se ha demostrado en sobrevivientes del accidente de Chernobyl (95, 96). La intensidad de la acción clastogénica guarda relación con la dosis recibida, Se cree que en el efecto intervienen especies reactivas del oxígeno, pues la actividad clastogénica es inhibida por la presencia de superóxido dismutasa (94).

Experimentalmente se ha observado que la irradiación de parte de un órgano, como el hígado (97) o el pulmón (98, 99), también produce efectos citotóxicos en la parte blindada a la irradiación. La irradiación de un pulmón mientras el otro está protegido de la radiación produce de todos modos daño contralateral (98, 99). El daño es atenuado por tratamientos que procesan las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (99, 100). En la región afectada por vecindad se halló aumento de expresión de interleukinas y otras citocinas proinflamatorias como TNF α y TGF β (101). También se han informado efectos similares a distancia en otros modelos animales (102, 103).

Los radioisótopos incorporados en las células también pueden causar EVIR (104). En ratones atímicos, se emplearon células carcinomatosas no marcadas y marcadas con ^{125}I -iododeoxiuridina para formar tumores subcutáneos, y se halló que la inhibición del crecimiento tumoral no explicable por el efecto directo de la radiación del ^{125}I , que es de corto alcance, implicaba un EVIR (105). La existencia de EVIR inducidos por radiación interna (radioisótopos) es corroborada por otros estudios (106).

El sistema inmune parece tener un papel importante en la inducción de EVIR in vivo (107). La comparación de ratones normales y una cepa susceptible a la radiación que es un modelo para la inducción de leucemia mieloide aguda, muestra diferencias en sus macrófagos. En la cepa normal el fenotipo de los macrófagos es antiinflamatorio, mientras que en los susceptibles es pro-inflamatorio. En los macrófagos de estos últimos la radiación causa aumento de la expresión de p53 y producción sostenida de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (108). Además, los efectos persisten por meses, lo que significa una actividad proinflamatoria sostenida en la progenie de las células originalmente irradiadas (109).

Los efectos adaptativos han sido menos estudiados, pero se ha informado su existencia durante el desarrollo embrionario (110, 111) y en animales adultos (112). En embriones de ratón de 11 días, la dosis óptima para el efecto adaptativo fue de 0.3 Gy, aplicada con tasas de dosis específicas (111). La mortalidad de ratones irradiados con 8 Gy se redujo significativamente en los animales que recibieron una dosis condicionante de 0.25 ó 0.5 Gy entre 6 y 24 h antes de la dosis de 8 Gy. La dosis condicionante menor (0.25 Gy) fue más eficaz (112).

RELACIONES DOSIS-RESPUESTA PARA LOS EVIR

Una característica sobresaliente de los EVIR es su peculiar relación entre dosis y respuesta. Mientras que los efectos sobre las células irradiadas son más intensos

cuanto mayor es la dosis, en el caso de los EVIR puede obtenerse una magnitud similar en un amplio rango de dosis (113), en algunos casos inferiores a 2 mGy (114).

En otros casos se observó una dependencia de la dosis (115) pero generalmente se alcanza un efecto máximo con dosis relativamente bajas de 0.5 a 1 Gy (7, 8, 116). Cuando las dosis son bajas, la irradiación y los EVIR pueden causar efectos de similar magnitud (115), mientras que con dosis altas se reduce la importancia relativa de los EVIR, que muestran saturación con altas dosis (**Fig. 6**).

Las mutaciones del ADN causadas por EVIR difieren de las que se producen en las células cuyos núcleos son irradiados. Estas últimas son frecuentemente rotura de cromosomas y amplias deleciones, mientras que aquéllas son generalmente mutaciones puntuales. Es interesante que en células irradiadas solamente en el citoplasma también se predominan las mutaciones puntuales (8, 32).

Asimismo, una fracción importante de los EVIR puede ser mediada por mecanismos epigenéticos (117, 118). Se llaman epigenéticos a los cambios heredables (transmitidos a la progeñie) que no involucran cambios en la secuencia de bases del ADN; por ejemplo, patrones de metilación del ADN, modificación de histonas o expresión de ARN reguladores (119). Es pertinente notar que se han detectado defectos epigenéticos (como también aberraciones cromosómicas) en las crías no irradiadas de progenitores irradiados (120).

Una razón de la naturaleza atípica de la relación entre dosis y respuesta para los EVIR es que la radiación afecte la comunicación intercelular mediada por nexos o por factores solubles (117). En este caso, un efecto más intenso en las células que son blancos de la radiación no se traduciría necesariamente en un EVIR mayor en las células no irradiadas. Al respecto, se ha informado que la irradiación con rayos X de muy baja energía causa un cierre de las uniones comunicantes de las células

irradiadas (causada por hiperfosforilación de la conexina 43) que resultaría protector para las células vecinas (121).

IMPLICACIONES DE LOS EVIR EN RADIOTERAPIA

La existencia de EVIR ha proporcionado nuevas perspectivas sobre los mecanismos de acción de la radioterapia (116, 121). Actualmente se incluyen entre los EVIR los efectos denominados “abscopales” por Robin H. Mole en 1953 (123). La palabra viene del latín *ab* (fuera de) y *scopos* (blanco o diana de tiro).

Los avances recientes en radiobiología han tenido lugar principalmente en el ámbito experimental, pero pueden tener consecuencias importantes para la radioterapia. Lamentablemente, como subraya Munro (124), muchos especialistas en radioterapia clínica no están al tanto de tales avances. En el contexto de la radioterapia, los EVIR pueden ser perjudiciales o beneficiosos, pero en todos los casos implican una mayor complejidad conceptual (**Tabla 1**).

Los EVIR permitirían explicar, entre otras cosas, las consecuencias de la irradiación local sobre el crecimiento de metástasis, que en diferentes modelos pueden ser estimulantes o inhibitorios. El resultado dependería del balance entre el efecto sobre la secreción de citokinas tumorales que inhiben el desarrollo de metástasis y la estimulación del sistema inmune para producir un estado inflamatorio que tiene el efecto opuesto (125).

Otro efecto abscopal concierne la inducción de neumonitis bilateral cuando un solo pulmón es irradiado. La irradiación causa neumonitis clásica, dependiente de la dosis, en el pulmón que se irradia. Existe además una forma esporádica bilateral, que tiene las características de una reacción de hipersensibilidad y se acompaña de activación de linfocitos T (126). El estudio de los mecanismos de injuria y su consecuente prevención es importante para atenuar o impedir las secuelas tardías de la radioterapia (127).

La inducción de EVIR no solamente es potencialmente importante con respecto a la eficacia del tratamiento para eliminar células neoplásicas, sino también por sus posibles efectos sobre células normales. Aunque éstas reciben generalmente una dosis menor que el tumor, debe recordarse que los EVIR se producen con dosis inferiores a las típicas para radioterapia (en torno a 2 Gy por fracción). Esto puede ser de especial interés para modalidades modernas de irradiación externa como la radioterapia modulada por intensidad, que reduce la dosis en el tejido normal pero aumenta el volumen de tejido normal irradiado (7). Experimentalmente se han observado importantes efectos epigenéticos en el bazo de ratas irradiadas en el cerebro con dosis comparables a las empleadas en radioterapia clínica (128).

Sin intentar agotar la lista, otra área donde los EVIR son de interés es la de la radioterapia interna mediante radiofármacos dirigidos específicamente contra las células tumorales (por ejemplo, anticuerpos marcados). Los EVIR posiblemente tienen un papel importante en la eficacia de tales tratamientos. Además, se plantea la posibilidad de combinar esta radioterapia dirigida con quimioterapia o terapia génica para aumentar la eficiencia (7).

IMPLICACIONES DE LOS EVIR EN RADIOPROTECCION

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes se clasifican clásicamente en estocásticos y determinísticos (2, 4, 129). Los efectos determinísticos presentan un umbral de dosis y su intensidad es creciente por encima de dicho umbral. Un ejemplo es la mortalidad celular inducida por radiación. Por su parte, los efectos estocásticos (aleatorios) carecen de umbral de dosis conocido pero la probabilidad aumenta con la dosis. Cuando se producen, su intensidad no guarda relación con la dosis. Un ejemplo es la carcinogénesis inducida por radiación.

La regla general en radioprotección es evitar todo efecto determinístico y reducir al mínimo factible la probabilidad de efectos estocásticos. Aunque los efectos

biológicos de dosis muy bajas de radiación no pueden medirse directamente, en las normas internacionales de seguridad (130, 131) se supone que la probabilidad de efectos estocásticos aumenta según un modelo lineal sin umbral (LNT = *Linear, No Threshold*). En este modelo el riesgo medido con dosis mayores se extrapola linealmente hasta dosis cero.

Los EVIR nocivos y los efectos adaptativos (inducidos por EVIR o por otro mecanismo) se producen con bajas dosis, y no se adaptan a los modelos clásicos para efectos determinísticos y estocásticos. Esto origina una incertidumbre que requerirá más investigación para ser resuelta. En principio, si predominan los EVIR perjudiciales la extrapolación lineal subestimaría el riesgo de bajas dosis, mientras que lo sobreestimaría si predominaran los efectos adaptativos. Como no existe evidencia concluyente para una u otra posibilidad (y probablemente predomine una u otra según un número de variables complejas) por el momento parece prudente mantener la extrapolación lineal a dosis cero (132).

Conclusión

La demostración de la existencia de EVIR y el avance en el conocimiento de sus mecanismos representa el avance más importante en radiobiología de la última década. El principal desafío persistente es hallar la forma de aplicar estos datos a las áreas de radioterapia y radioprotección.

Conflicto de interés: El autor declara no tener ningún conflicto de interés relacionado con el tema tratado.

Referencias bibliográficas

1. Thames HD, Hendry JH. *Fractionation in radiotherapy*. London: Taylor and Francis, 1987.
2. Niass AHW. *An introduction to radiobiology*, 2nd Ed. London: Wiley, 1998.
3. Haustermanns K, Withers HR. The biological basis of fractionation. *Rays* 2004; 29 (2): 231-236.
4. Suntharalingam N, Podgorsak EB, Hendry JH. Basic radiobiology. En Podgorsak EB (Ed), *Review of radiation oncology physics: A handbook for teachers and students*. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2005, pp. 485-504.
5. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The “bystander effect”: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; 53 (21): 5274-5283.
6. Nagasawa H, Little JB. Induction of sister chromatide exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res* 1992; 52 (22): 6394-6396.
7. Prise KM, O’Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2009; 9 (5): 351-360.
8. Matsumoto H, Hamada N, Takahashi A, Kobayashi Y, Ohnishi T. Vanguard of paradigm shift: Radiation-induced adaptive and bystander effects. *J Radiat Res* 2007; 48 (2): 97-106.
9. Aguilera A, Gómez-González B. Genomic instability: A mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* 2008; 9 (3): 204-217.
10. Morgan WF, Sowa MB. Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (40): 14127-14128.
11. Kuhn TS. *The structure of scientific revolutions*. Chicago: The University of Chicago Press, 1962.

12. Prise KM, Schettino G, Vojnovic B, Belyakov O, Shao C. Microbeam studies of the bystander response. *J Radiat Res* 2009; 50 (Suppl): A1-A6.
13. Sawant SG, Zheng W, Hopkins KM, Randers-Pehrson G, Lieberman HB, Hall EJ. The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. *Radiat Res* 2002; 157 (4): 361-364.
14. Shao C, Folkard M, Michael BD, Prise KM. Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101 (37): 13495-13500.
15. Sokolov MV, Smilenov LB, Hall Ej, Panyutin IG, Bonner WM, Sedelnikova OA. Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* 2005; 24 (49): 7257-7265.
16. Morgan WF. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro*. *Radiat Res* 2003; 159 (5): 567-580.
17. Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G, Boothman DA. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene* 2003; 22 (37): 5813-5827.
18. Lavin MF, Birrell G, Chen P, Kozlov S, Scott S, Gueven N. ATM signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res* 2005; 569: 123-132.
19. Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K, Prise KM. ATM acts downstream of ATR in the DNA damage response signaling of bystander cells. *Cancer Res.* 2008; 68 (17):7059-7065.
20. Kuo LJ, Yang LX. Gamma-H2AX – a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 2008; 33 (3): 305-309.
21. Sokolov MV, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA. Gamma-H2AX in bystander cells: not just a radiation-triggered event, a cellular response to stress mediated by intercellular communication. *Cell Cycle* 2007; 6 (18): 2210-2212.

22. Dickey JS, Baird BJ, Redon CE, Sokolov MV, Sedelnikova OA, Bonner WM. Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction. *Carcinogenesis* 2009; 30 (10): 1686-1695.
23. Evans WH, Martin PEM. Gap junctions: Structure and function. *Mol Membrane Biol* 2002; 19 (2): 121-136.
24. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 2006; 394 (3): 527-543.
25. Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* 2003; 22 (45): 7050-7057.
26. Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells. *Curr Cancer Drug Targ* 2004; 4 (1):53-64. Azzam EI, de Toledo SM, Gooding T, Little JB. Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 1998; 150 (4): 497-504.
27. Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (2): 473-478.
28. Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Vannais D, Hall EJ, Hei TK. Induction of a bystander effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (5): 2099-2104.
29. Zhou H, Suzuki M, Randers-Pehrson G, Vannais D, Chen G, Trosko JE, Waldren CA, Hei TK. Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(25):14410-14415.
30. Suzuki M, Tsuruoka C. Heavy charged particles produce a bystander effect via cell-cell junctions. *Biol Sci Space* 2004; 18 (4): 241-246.

31. Hamada N, Ni M, Funayama T, Sakashita T, Kobayashi Y. Temporally distinct response of irradiated normal human fibroblasts and their bystander cells to energetic heavy ions. *Mutation Res* 2008; 639: 35-44.
32. Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Expression of CONNEXIN43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Res* 2003; 63 (21): 7128-7135.
33. Lehnert BE, Goodwin EH. Extracellular factor(s) following exposure to α -particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res* 1997; 57 (11): 2164-2171.
34. Mothersill C, Seymour C. Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 1997; 71 (4): 421-427.
35. Suzuki M, Zhou H, Geard CR, Hei TK. Effect of medium on chromatin damage in bystander mammalian cells. *Radiat Res* 2004; 162 (3): 264-269.
36. Mothersill C, Seymour CB. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat Res*. 1998; 149 (3):256-262.
37. Wang R, Coderre JA. A bystander effect in alpha-particle irradiations of human prostate tumor cells. *Radiat Res* 2005; 164 (6): 711-722.
38. Zhou H, Ivanov VN, Gillespie J, Geard CR, Amundson SA, Brenner DJ, Yu Z, Lieberman HB, Hei TK. Mechanism of radiation-induced bystander effect: Role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (41): 14641-14646.
39. Iyer R, Lehnert BE, Svensson R. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res* 2000; 60(5):1290-1298.

40. Chou CH, Chen PJ, Lee PH, Cheng AL, Hsu HC, Cheng JC. Radiation-induced hepatitis B virus reactivation in liver mediated by the bystander effect from irradiated endothelial cells. *Clin Cancer Res* 2007; 13(3): 851-857.
41. Narayanan PK, LaRue KE, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles induce the production of interleukin-8 by human cells. *Radiat Res* 1999;152(1):57-63.
42. Narayanan PK, Goodwin EH, Lehnert BE. Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res* 1997; 57(18):3963-3971.
43. Shao C, Stewart V, Folkard M, Michael BD, Prise KM. Nitric oxide-mediated signaling in the bystander response of individually targeted glioma cells. *Cancer Res* 2003; 63 (23): 8437-8442.
44. Shao C, Aoki M, Furusawa Y. Bystander effect in lymphoma cells vicinal to irradiated neoplastic epithelial cells: nitric oxide is involved. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2004; 45 (1): 97-103.
45. Shao C, Lyng FM, Folkard M, Prise KM. Calcium fluxes modulate the radiation-induced bystander responses in targeted glioma and fibroblast cells. *Radiat Res* 2006; 166 (3): 479-487.
46. Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y. Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res* 2007; 48 (2): 87-95.
47. Azzam EI, de Toledo SM, Waker AJ, Little JB. High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 2000; 60 (10): 2623-2631.
48. Lyng FM, Maguire P, McClean B, Seymour C, Mothersill C. The involvement of calcium and MAP kinase signaling pathways in the production of radiation-induced bystander effects. *Radiat Res* 2006; 165(4):400-409.

49. Lin SJ, Shyue SK, Hung YY, et al. Superoxide dismutase inhibits the expression of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular cell adhesion molecule-1 induced by tumor necrosis factor-alpha in human endothelial cells through the JNK/p38 pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (2): 334-340.
50. Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004;16 (1): 42-47.
51. Azzam EI, de Toledo SM, Spitz DR, Little JB. Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res* 2002; 62 (19):5436-5442.
52. Silvius JR. Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains: insights from model-membrane studies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1746 (3):193-202.
53. Patra SK. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1785 (2):182-206.
54. Nagasawa H, Cremesti A, Kolesnick R, Fuks Z, Little JB. Involvement of membrane signalling in the bystander effect in irradiated cells. *Cancer Res* 2002; 62 (9): 2531-2534.
55. Burdak-Rothkamm S, Short SC, Folkard M, Rothkamm K, Prise KM. ATR-dependent radiation-induced g-H2AX foci in bystander primary human astrocytes and glioma cells. *Oncogene* 2007; 26 (7): 993-1002.
56. Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C. Oxidative stress in cells exposed to low levels of ionizing radiation. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (Pt 2):350-353.
57. Murphy JE, Nugent S, Seymour C, Mothersill C. Mitochondrial DNA point mutations and a novel deletion induced by direct low-LET radiation and by medium from irradiated cells. *Mutat Res* 2005; 585 (1-2):127-136.

58. Zhou H, Ivanov VN, Lien YC, Davidson M, Hei TK. Mitochondrial function and nuclear factor- κ B-mediated signalling in radiation-induced bystander effects. *Cancer Res* 2008; 68 (7): 2233-2240.
59. Baskar R, Balajee AS, Geard CR, Hande MP. Isoform-specific activation of protein kinase c in irradiated human fibroblasts and their bystander cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40 (1):125-134.
60. Hu B, Shen B, Su Y, Geard CR, Balajee AS. Protein kinase C epsilon is involved in ionizing radiation induced bystander response in human cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(12):2413-2421.
61. Vines AM, Lyng FM, McClean B, Seymour C, Mothersill CE. Bystander signal production and response are independent processes which are cell line dependent. *Int J Radiat Biol* 2008; 84 (2): 83-90.
62. Nagasawa H, Wilson PF, Chen DJ, Thompson LH, Bedford JS, Little JB. Low doses of alpha particles do not induce sister chromatid exchanges in bystander Chinese hamster cells defective in homologous recombination. *DNA Repair (Amsterdam)* 2008; 7(3):515-522.
63. Zhu A, Zhou H, Leloup C, Marino SA, Geard CR, Hei TK, Lieberman HB. Differential impact of mouse Rad9 deletion on ionizing radiation-induced bystander effects. *Radiat Res* 2005; 164 (5): 655-661.
64. Hei TK, Zhou H, Ivanov VN, Hong M, Lieberman HB, Brenner DJ, Amundson SA, Geard CR. Mechanism of radiation-induced bystander effects: a unifying model. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60 (8): 943-950.
65. Olivier G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* 1984; 223 (4636): 594-597.
66. Wolff S. The adaptive response in radiobiology: Evolving insights and implications. *Environ Health Persp* 1998; 106 (Suppl 1): 277-283.

67. Kadhim MA, Moore SR, Goodwin EH. Interrelationships amongst radiation-induced genomic instability, bystander effects, and the adaptive response. 2004; *Mutat Res* 2004; 568: 21-32.
68. Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. Damaging and protective cell signaling in the untargeted effects of ionizing radiation. *Mutat Res* 2004; 568: 5-20
69. Kakinuma S, Yamauchi K, Amasaki Y, Nishimura M, Shimada Y. Low-dose radiation attenuates chemical mutagenesis in vivo. *J Radiat Res (Tokyo)* 2009; 50 (5):401-405.
70. Iyer R, Lehnert BE. Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells. *Mutat Res* 2002; 503: 1-9.
71. Iyer R, Lehnert BE. Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiat Res* 2002; 157 (1): 3-7.
72. Maguire P, Mothersill C, Seymour C, Lyng FM. Medium from irradiated cells induces dose-dependent mitochondrial changes and BCL2 responses in unirradiated human keratinocytes. *Radiat Res* 2005; 163 (4): 384-90.
73. Mitchell SA, Marino SA, Brenner DJ, Hall EJ. Bystander effect and adaptive response in C3H 10T(1/2) cells. *Int J Radiat Biol* 2004; 80 (7): 465-472.
74. Elmore E, Lao XY, Kapadia R, Giedzinski E, Limoli C, Redpath JL. Low doses of very low-dose-rate low-LET radiation suppress radiation-induced neoplastic transformation in vitro and induce an adaptive response. *Radiat Res* 2008; 169 (3): 311-318.
75. Iyer R, Lehnert BE, Svensson R. Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res* 2000; 60(5):1290-1298
76. Baskar R, Balajee AS, Geard CR. Effects of low and high LET radiations on bystander human lung fibroblast cell survival. *Int J Radiat Biol* 2007; 83 (8): 551-559.

77. Frankenberg D, Greif KD, Giesen U. Radiation response of primary human skin fibroblasts and their bystander cells after exposure to counted particles at low and high LET. *Int J Radiat Biol* 2006; 82 (1):59-67.
78. Persaud R, Zhou H, Baker SE, Hei TK, Hall EJ. Assessment of low linear energy transfer radiation-induced bystander mutagenesis in a three-dimensional culture model. *Cancer Res* 2005; 65 (21): 9876-9882.
79. Sedelnikova OA, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell SA, Marino SA, Brenner DJ, Bonner WM. DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models. *Cancer Res* 2007; 67 (9):4295-4302.
80. Belyakov OV, Mitchell SA, Parikh D, Randers-Oehrson G, Marino SA, Amundson SA, Geard CR, Brenner DJ. Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102 (40): 14203-14208.
81. Belyakov OV, Folkard M, Mothersill C, Prise KM, Michael BD. Bystander-induced apoptosis and premature differentiation in primary urothelial explants after charged particle microbeam irradiation. *Radiat Protect Dosimetry* 2002; 99 (1-4):249-251.
82. Belyakov OV, Folkard M, Mothersill C, Prise KM, Michael BD. Bystander-induced differentiation: A major response to targeted irradiation of a urothelial explant model. *Mutat Res* 2006; 597: 43-49.
83. Little MP, Filipe JAN, Prise KM, Folkard M, Belyakov OV. A model for radiation-induced bystander effects, with allowance for spatial position and the effects of cell turnover. *J Theor Biol* 2005; 232 (3): 329-338.
84. Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects and adaptive responses – the Yin and Yang of low dose radiobiology? *Mutat Res* 2004; 568: 121-128.

85. Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: Evidence for an adaptive response to low dose exposures? *Dose Response* 2006; 4 (4): 283-290.
86. Hall EJ. The bystander effect. *Health Phys* 2003; 85 (1): 31-35.
87. Azzam EI, Little JB. The radiation-induced bystander effect: Evidence and significance. *Hum Exp Toxicol*. 2004; 23(2):61-65.
88. Goldberg Z, Lehnert BE. Radiation-induced effects in unirradiated cells: A review and implications for cancer. *Int J Oncol* 2002; 21 (3): 337-349.
89. Morgan WF. Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vivo*, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat Res* 2003; 159 (5): 581-596.
90. Kassis AI. *In vivo* validation of the bystander effect. *Hum Exp Toxicol* 23 (1): 71-73, 2004.
91. Goh K, Sumner S. Breaks in normal human chromosomes: Are they induced by a transferable substance in the plasma of irradiated persons exposed to total body irradiation? *Radiat Res* 1968; 35 (1): 171-181.
92. Pant GS, Kamada N. Chromosome aberrations in normal leukocytes induced by the plasma of exposed individuals. *Hiroshima J Med Sci* 1977; 26 (2-3): 149-154.
93. Goh KO. Total-body irradiation and human chromosomes. V. Additional evidence of a transferable substance in the plasma of irradiated persons to induce chromosomal breakage. *J Med* 1975; 6 (1): 51-60.
94. Emerit I, Levy A, Vernjavski L, Arutyunyan R, Oganessian N, Pogosian A, Mejlumian H et al. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor. *J Cancer Res Clin Oncol* 1994; 120 (9): 558-561.

95. Marozik P, Mothersill C, Seymour CB, Mosse I, Melnov S. Bystander effects induced by serum from survivors of the Chernobyl accident. *Exp Hematol* 2007; 35 (Suppl 1): 55-63.
96. Brooks AL, Rutherford JC, McClellan RO. Effect of $^{239}\text{PuO}_2$ particle number and size on the frequency and distribution of chromosome aberrations in the liver of the Chinese hamster. *Radiat Res* 1974; 59 (3): 639-709.
97. Khan MA, Hill RP, Van Dyk J. Partial volume rat lung irradiation: An evaluation of early DNA damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40 (2): 467-476.
98. Khan MA, Van Dyk J, Yeung IW, Hill RP. Partial volume rat lung irradiation: Assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers. *Radiother Oncol* 2003; 66 (1): 95-102.
99. Langan AR, Khan MA, Yeung IW, Van Dyk J, Hill RP. Partial volume rat lung irradiation: The protective/mitigating effect of Eukarion-189, a superoxide dismutase-catalase mimetic. *Radiother Oncol* 2006; 79 (2): 231-238.
100. Calveley VL, Khan MA, Yeung IW, Van Dyk J, Hill RP. Partial volume rat lung irradiation: Temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation. *Int J Radiat Biol* 2005; 81 (12): 887-899.
101. Koturbash I, Rugo RE, Hendricks CA, Loree J, Thibault B, Kutanzi K et al. Irradiation induces DNA damage and modulates epigenetic effectors in distant bystander tissue *in vivo*. *Oncogene* 2006; 25 (31): 4267-4275.
102. Koturbash I, Boyko A, Rodríguez-Juárez R, McDonald RJ, Tryndyak VP, Kovalchuk I et al. Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen *in vivo*. *Carcinogenesis* 2007; 28 (8): 1831-1838.
103. Bishayee A, Hill HZ, Stein D, Rao DV, Howell RW. Free radical-initiated and gap junction-mediated bystander effect due to nonuniform distribution of incorporated

radioactivity in a three-dimensional tissue culture model. *Radiat Res* 2001; 155 (2): 335-344.

104.Xue LY, Butler NJ, Makrigiorgos GM, Adelstein SJ, Kassis AI. Bystander effect produced by radiolabeled tumor cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(21):13765-13770.

105.Boyd M, Sorensen A, McCluskey AG, Mairs RJ. Radiation quality-dependent bystander effects elicited by targeted radionucleides. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60 (8): 951-958.

106.Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, Milne G, Wright EG. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene* 2001; 20 (48): 7085-7095.

107.Coates PJ, Rundle JK, Lorimore SA, Wright EG. Indirect macrophage responses to ionizing radiation: implications for genotype-dependent bystander signaling. *Cancer Res* 2008; 68 (2):450-456.

108.Coates PJ, Robinson JI, Lorimore SA, Wright EG. Ongoing activation of p53 pathway responses is a long-term consequence of radiation exposure in vivo and associates with altered macrophage activities. *J Pathol* 2008; 214(5): 610-616.

109.Wang B, Ohyama H, Nose T, Itsukaichi H, Nakajima T, Yukawa O et al. Adaptive response in embryogenesis. I. Dose and timing of radiation for reduction of prenatal death and congenital malformation during the late period of organogenesis. *Radiat Res* 1998; 150 (1): 120-122.

110.Wang B, Ohyama H, Haginoya K, Okada T, Itsukaichi H, Nose T et al. Adaptive response in embryogenesis. II. Retardation of postnatal development of prenatally irradiated mice. *Radiat Res* 1999; 152 (1): 119-123.

111.Tiku AB, Kale RK. Adaptive response and split-dose effect of radiation on the survival of mice. *J Biosci* 2004; 29 (1): 111-117.

112. Belyakov OV, Malcolmson AM, Folkard M, Prise KM, Michael BD. Direct evidence for a bystander effect of ionizing radiation in primary human fibroblasts. *Br J Cancer* 2001; 84 (5): 674-9.
113. Ojima M, Ban N, Kai M. DNA double-strand breaks induced by very low X-ray doses are largely due to bystander effects. *Radiat Res* 2008; 170 (3): 365-371.
114. Schettino G, Folkard M, Prise KM, Vojnovic B, Held KD, Michael BD. Low-dose studies of bystander cell killing with targeted soft X rays. *Radiat Res* 2003; 160 (5): 505-511.
115. Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol* 2005; 6 (7): 520-528.
116. Trosko JE, Chang CE, Upham BL, Tai MH. Low-dose ionizing radiation: Induction of differential intracellular signaling possibly affecting intercellular communication. *Radiat Environ Biophys* 2005; 44 (1): 3-9.
117. Kovalchuk O, Baulch JE. Epigenetic changes and nontargeted radiation effects – Is there a link? *Environ Mol Mutagen* 2008; 49 (1): 16-25.
118. Lotem J, Sachs L. Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. *Oncogene* 2006; 25 (59): 7663-7672.
119. Koturbash I, Baker M, Loree J, Kutanzi K, Hudson D, Pogribny I et al. Epigenetic dysregulation underlies radiation-induced transgenerational genome instability in vivo. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66 (2): 327-330.
120. Edwards GO, Botchway SW, Hirst G, Wharton CW, Chipman JK, Meldrum RA. Gap junction communication dynamics and bystander effects from ultrasoft X-rays. *Br J Cancer* 2004; 90 (7):1450-1456.
121. Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, Niermann KJ, Morimoto A, Brousal J. The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev* 2005; 31 (2): 159-172.

- 122.Mole RH. Whole body irradiation: Radiobiology or medicine? *Br J Radiol* 1953; 26 (305): 234-241.
- 123.Munro AJ. Bystander effects and their implications for clinical radiotherapy. *J Radiol Protect* 2009; 29 (2A): A133-A142.
- 124.Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 2009; 10 (7): 718-726.
- 125.Morgan GW, Breit SN. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31 (2):361-369.
- 126.Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 2006; 6 (9): 702-713.
- 127.Koturbash I, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, McDonald RJ, Tryndyak VP, Kovalchuk O et al. Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo. *Carcinogenesis* 2007; 28 (8):1831-1838.
- 128.Steele GG. *Basic clinical radiobiology for radiation oncologists*. London: Edward Arnold, 1993.
- 129.National Research Council. *Health risks from exposure to low levels of ionizing radiation (BEIR VII Phase 2)*. Washington, DC: National Academic Press, 1999.
- 130.International Commission of Radiological Protection. *Recommendations of the ICRP (Publication 103)*. New York: Elsevier, 2007.
- 131.Mullenders L, Atkinson M, Paretzke H, Sabatier L, Bouffler S. Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nat Rev Cancer* 2009; 9 (8): 596-604.
- 132.Martin CJ, Sutton DG, West CM, Wright EG. The radiobiology/radiation protection interface in healthcare. *J Radiat Protect* 2009; 29 (2A): A1-A20.

Tabla 1:

**Potenciales ventajas y desventajas de los efectos de vecindad en radioterapia clínica
(según Munro, Ref. 124).**

Ventajas clínicas	Desventajas clínicas
Eliminación de células premalignas adyacentes	Neoplasias secundarias (inestabilidad genómica, factores clastogénicos)
Aumento de la letalidad para células troncales tumorales	Aumento de la toxicidad aguda por mayor mortalidad de células normales
Diferenciación de células tumorales indiferenciadas	Daño tardío a órganos sensibles
Aumento de la proliferación de células normales	Aumento de la proliferación de células tumorales
Aumento en la radiorresistencia de células normales	Aumento de radiorresistencia de células tumorales
Rápido alivio de los síntomas	Efectos sistémicos más intensos

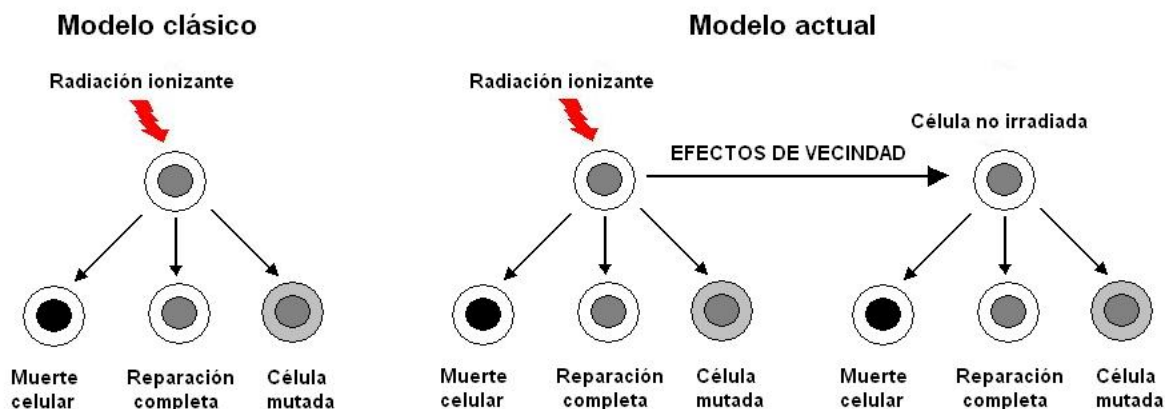


Figura 1: Comparación del modelo clásico de acción de la radiación ionizante (*izquierda*) con el modelo actual que incorpora los efectos de vecindad (*derecha*).

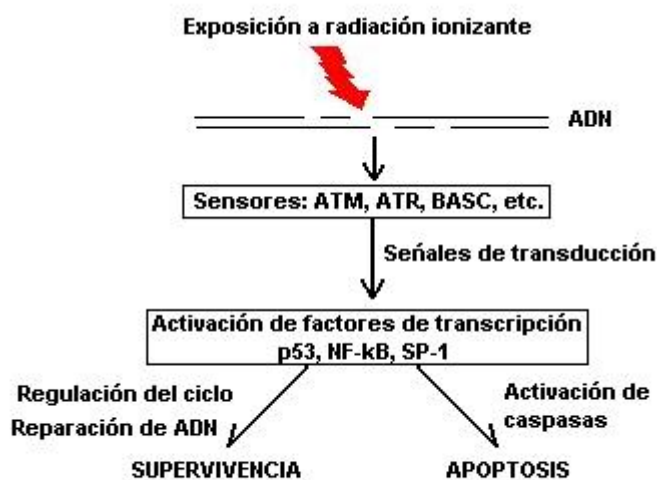


Fig. 2: Detección del estrés radiante y sus consecuencias. Basado en Ref. 17.

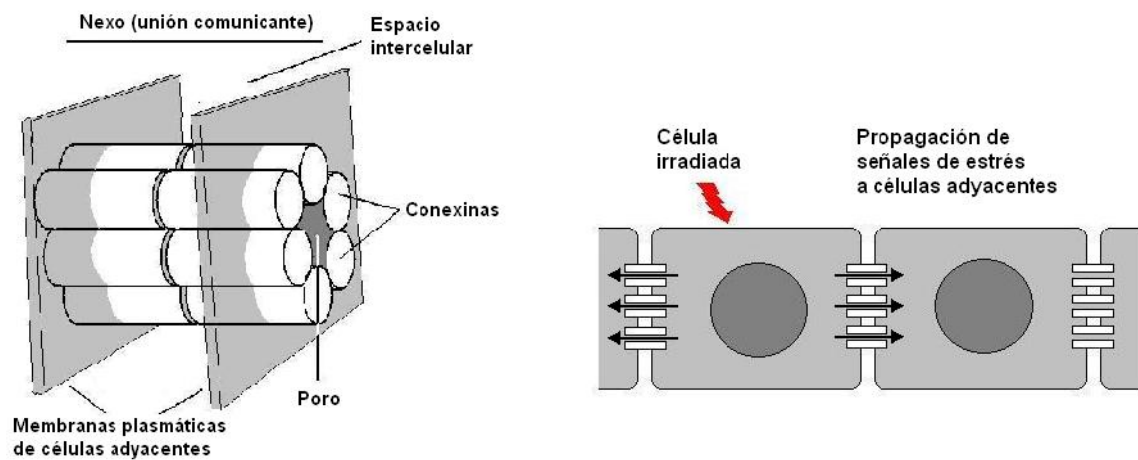


Fig. 3: Estructura de un nexo o unión comunicante (*izquierda*) y esquema de efectos de vecindad mediados por nexos (*derecha*).

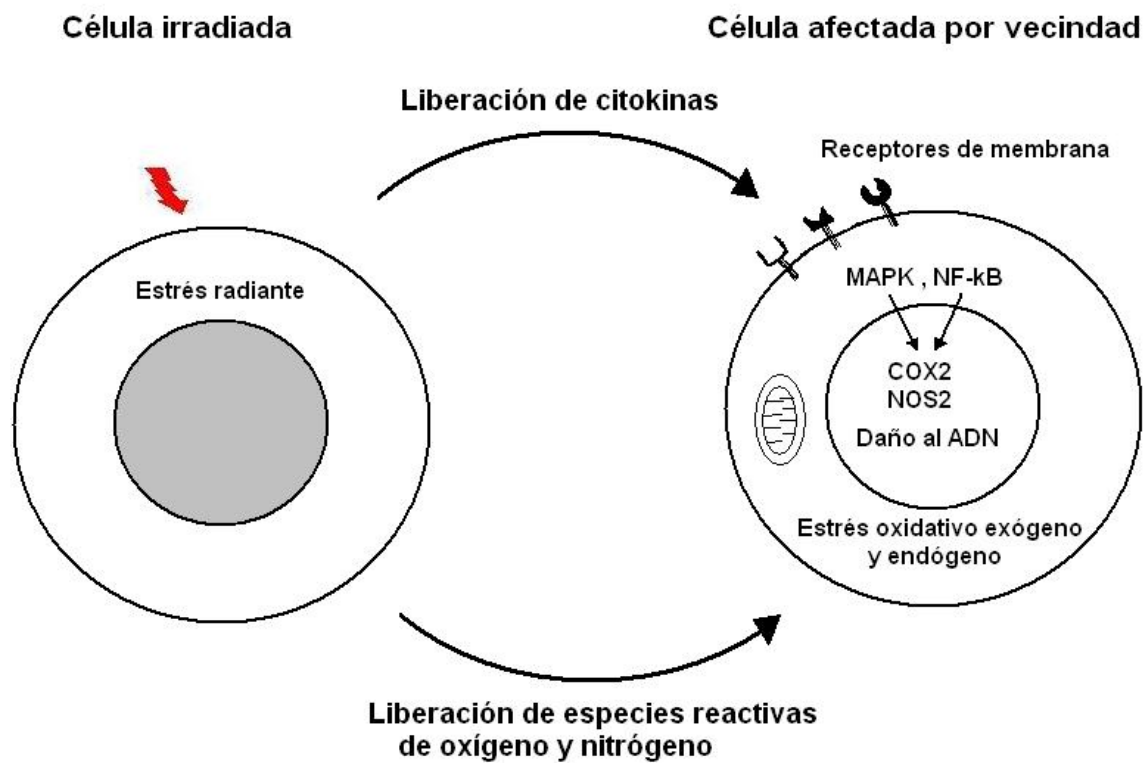


Fig. 4: Vías de señalización extracelular de los efectos de vecindad.

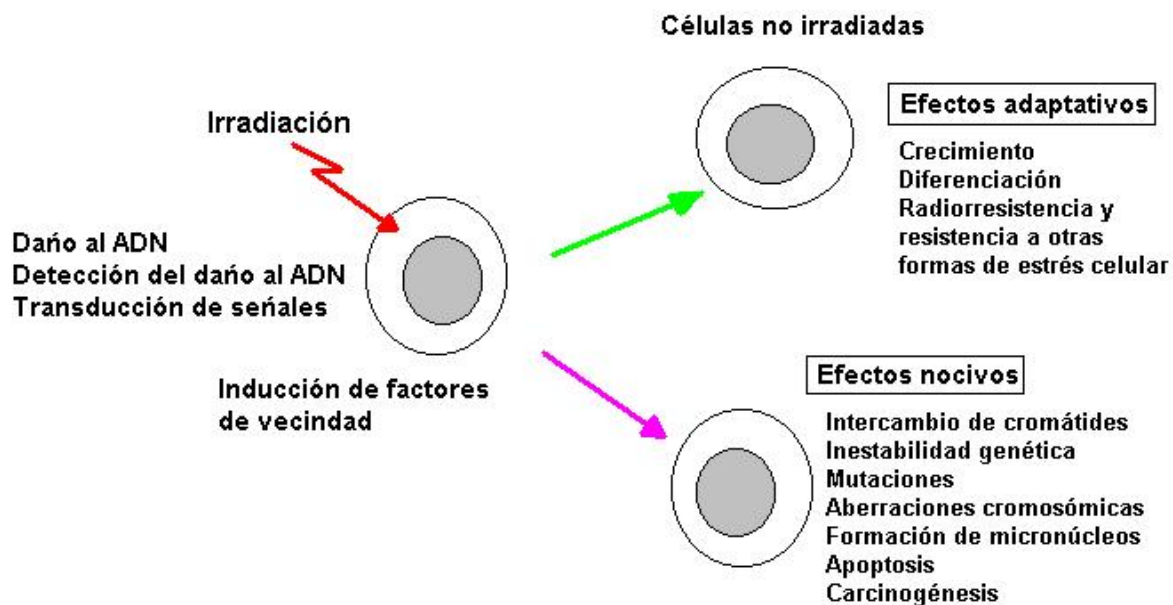


Fig. 5: Los efectos de vecindad pueden causar tanto efectos nocivos como adaptativos para las células no irradiadas.

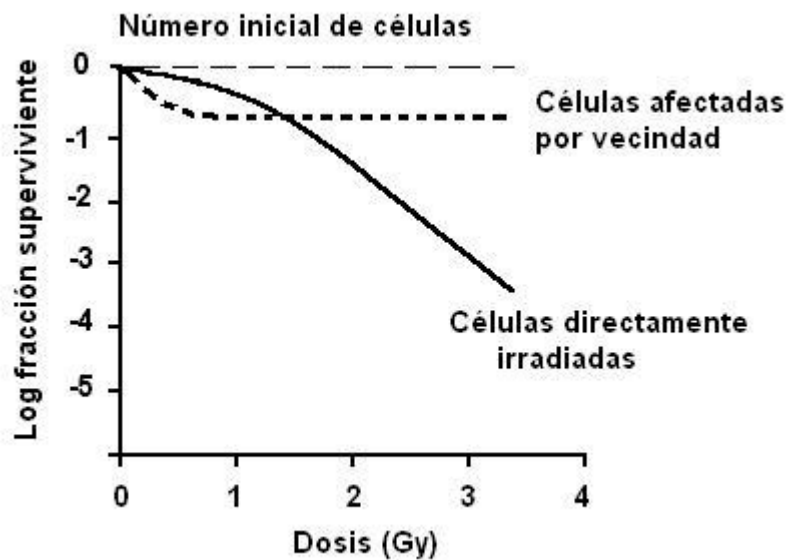


Fig. 6: Los efectos directos de la radiación ionizante (en el ejemplo la mortalidad celular) crecen continuamente con la dosis. Los efectos de vecindad alcanzan un máximo (saturación) con dosis bajas, de 1 Gy o menores.