

## **5.- RESULTADOS**

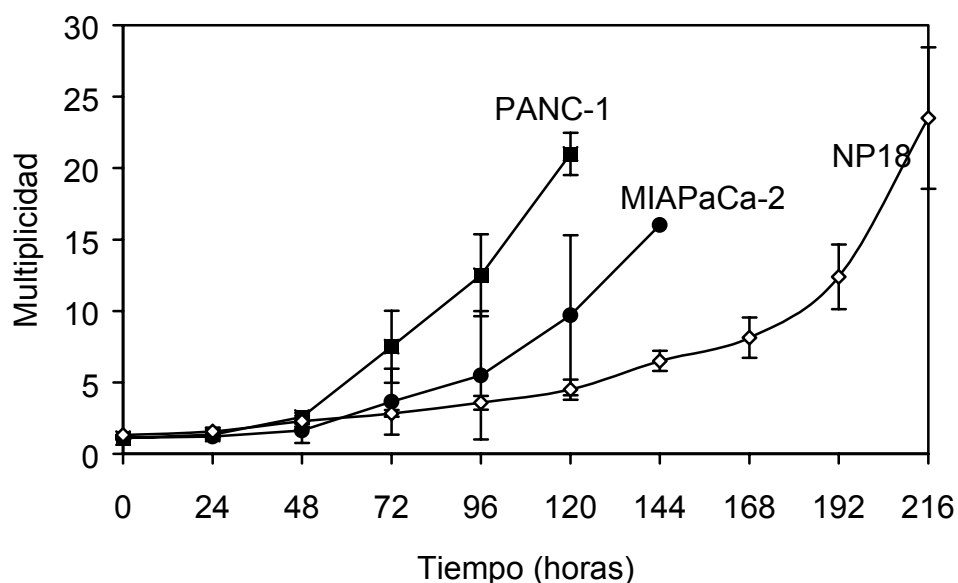
### **A) CRECIMIENTO TUMORAL**

#### **5.1.- FORMACIÓN DE COLONIAS**

Las células MIA PaCa-2, PANC-1, NP-18 y HCT-15 formaron colonias fácilmente visibles antes de 15 días. En cambio, las células BxPc-3, AsPC-1 y CAPAN-1 no formaron colonias en este plazo de tiempo.

#### **5.2.- CRECIMIENTO CELULAR**

Las células pancreáticas utilizadas en los experimentos de radiosensibilidad presentaron un crecimiento característico de las células en cultivo (Figura 18 y Tabla 3). Se observó una fase inicial de latencia o LAG, de duración variable, seguida de un crecimiento exponencial. Puesto que la fase LAG de las células MIA PaCa-2 y PANC-1, en estas condiciones, similares a las de los experimentos de quimio y radiosensibilidad duró aproximadamente 48 horas, y dada la necesidad de tratar las células durante la fase de crecimiento exponencial, estas células se trataron a las 48 horas de la siembra. Las células HCT-15, con una fase de LAG de 24 h, se trataron 24 h después de la siembra.



**Figura 18. Crecimiento de las células pancreáticas**

Curvas de crecimiento de las células MIA PaCa-2, PANC-1 y NP-18 cultivadas *in vitro* como células aisladas. Se representa la multiplicidad media observada en los distintos intervalos de tiempo. Las barras indican la desviación estándar.

**Tabla 3. Crecimiento de las células pancreáticas y de colon**

	Tiempo de latencia (LAG)	Tiempo de duplicación	ñ ( h )
<b>CÁNCER DE PÁNCREAS</b>			
MIA PaCa-2	48	36	1,13 (2) - 1,64 (48 )
PANC-1	36	24	1,10 (2) - 2,58 ( 48 )
NP-18	24	72	1,33 (2) - 2,29 (48 )
<b>CÁNCER DE COLON</b>			
HCT-15	< 24	24	1,05(2) - 1,87 (24 )

El Tiempo de latencia (LAG) y Tiempo de duplicación se midieron en horas. La ñ (h) indica la multiplicidad celular en el tiempo entre paréntesis medido en horas a partir de la siembra.

### 5.3.- TUMORIGENICIDAD

Se inocularon células MIA PaCa-2 y HCT-15. La tumorigenicidad de las células MIA PaCa-2 fue del 83,3 % (sobre 78 inoculaciones). Característicamente, se observó una tumoración inmediatamente después de la inoculación que, sin embargo, desapareció a los 10 días en la mayoría de los casos. Seguidamente, tras esta primera tumoración espúrea, apareció un tumor que creció exponencialmente. El intervalo entre la inoculación y el inicio del crecimiento exponencial fue de  $21,3 \pm 11$  días. En los tumores no tratados ( $n = 9$ ) el tiempo para pasar de un tumor de 100 a 200 mm<sup>3</sup> fue de 4,8 días.

La tumorigenicidad de las células HCT-15 fue del 100 %. A los  $7,8 \pm 0,4$  días de la inoculación se constató un crecimiento tumoral exponencial. Los tumores no tratados ( $n = 3$ ) requirieron 4 día para pasar de 100 a uno 200 mm<sup>3</sup>, un tiempo ligeramente inferior al del xenotrasplante MIA PaCa-2.

---

## B) RADIOSENSIBILIDAD *IN VITRO*

El estudio de la radiosensibilidad de las células pancreáticas MIA PaCa-2, PANC-1 y de las células de origen cólico HCT-15 se realizó con células aisladas y con células en monocapa. La radiosensibilidad se determinó bajo estas dos condiciones distintas puesto que el efecto de la radiación puede variar de una a otra. Las células NP-18 sólo se irradiaron en monocapa. La radiosensibilidad se cuantificó mediante los parámetros SF2 y  $\alpha$  que miden la sensibilidad de las células ante dosis bajas de radiación y el parámetro  $\bar{D}$  que mide la radiosensibilidad global.

### 5.4.- RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA MIA PaCa-2

#### 5.4.1.- Células MIA PaCa-2 aisladas

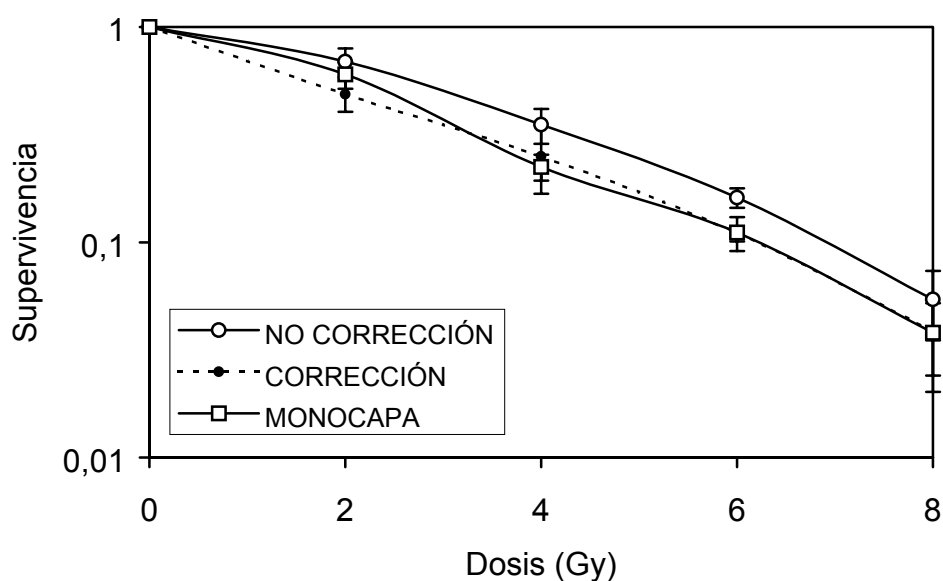
La CE basal fue  $0,58 \pm 0,2$ . La SF2 fue de  $0,69 \pm 0,106$  y la  $\bar{D}$  de  $3,460 \pm 0,283$  Gy (Figura 19). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fueron  $0,137 \pm 0,012 \text{ Gy}^{-1}$  y  $0,029 \pm 0,002 \text{ Gy}^{-2}$ , respectivamente, con un valor del coeficiente  $R^2$  de 0,989 (Figura 20 y Tabla 4). Se realizaron 7 experimentos independientes con 3 discos por dosis.

Dado que las células fueron incubadas durante 48 horas antes de la irradiación y que en este intervalo se incrementó la población celular, se consideró adecuado realizar una corrección de la multiplicidad según el método de Gerweck. La multiplicidad en el momento de la siembra fue 1,2 (debido a una disgregación incompleta de dobletes, tripletes, etc) y de 1,8 en el momento de la irradiación (pasadas 48 horas). Una vez aplicada la corrección por la multiplicidad, la SF2 fue de  $0,487 \pm 0,084$  y la  $\bar{D}$  de  $2,735 \pm 0,311$  Gy (Figura 19). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fue de  $0,335 \pm 0,027 \text{ Gy}^{-1}$  y  $0,008 \pm 0,004 \text{ Gy}^{-2}$ , respectivamente. El coeficiente  $R^2$  fue de 0,597 (Figura 20 y Tabla 4)

#### 5.4.2.- Células MIA PaCa-2 en monocapa

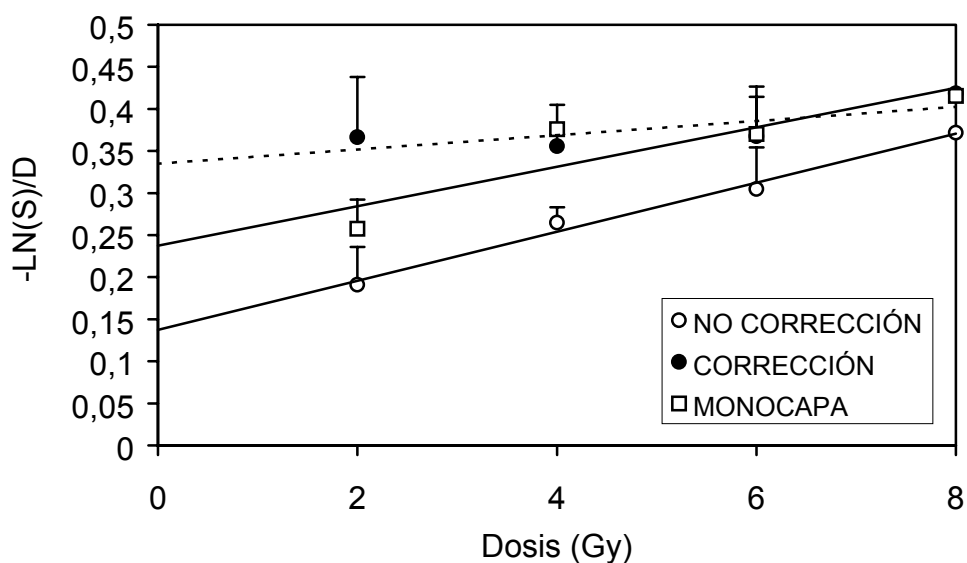
La CE basal fue  $0,23 \pm 0,05$ . La SF2 fue de  $0,602 \pm 0,085$  y la  $\bar{D}$  fue de  $2,940 \pm 0,144$  Gy (Figura 19). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fueron  $0,237 \pm 0,046$  Gy<sup>-1</sup> y  $0,023 \pm 0,008$  Gy<sup>-2</sup>, respectivamente. El coeficiente R<sup>2</sup> fue de 0,794 (Figura 20 y Tabla 4). Se realizaron 5 experimentos independientes con 3 discos por dosis.

La radiación inhibió la capacidad clonogénica de las células MIA PaCa-2, independientemente de la preparación de las células (aisladas o en monocapa). La magnitud del efecto fue dependiente de la dosis de radiación. La relación entre la dosis de radiación y la supervivencia celular se ajustó al modelo L-Q.



**Figura 19. Curvas de radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2**

Representación gráfica de la supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas aisladas o en monocapa. Además, se representa la curva tras la corrección por la multiplicidad. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 20. Determinación de alfa y beta en la línea MIA PaCa-2**

Los coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q se calcularon por el método de los mínimos cuadrados a partir de la transformación logarítmica de la ecuación L-Q en una ecuación lineal, en la que  $E = (-\ln S/D) = \alpha + \beta D$  y en donde  $S$  es la supervivencia y  $D$  la dosis. La  $S$ , tras una dosis de 2, 4, 6 u 8 Gy, se determinó experimentalmente en las células MIA PaCa-2 aisladas y en monocapa (Figura 19). Las ecuaciones L-Q fueron: No corrección:  $E = 0,137 + 0,029D$ ; Corrección:  $E = 0,335 + 0,008D$ ; Monocapa:  $E = 0,237 + 0,023D$ . Las hemibarras positivas corresponden al error estándar.

## 5.5.- RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA PANC-1

La radiosensibilidad de la línea PANC-1, al igual que en la línea MIA PaCa-2, se determinó en células aisladas y en monocapa.

### 5.5.1.- Células PANC-1 aisladas

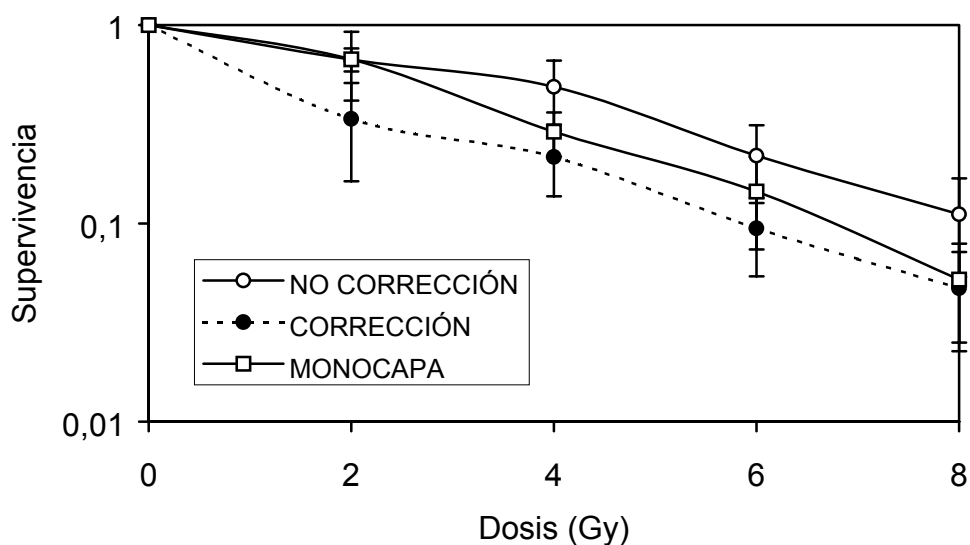
La CE basal fue  $0,31 \pm 0,11$ . La SF2 fue de  $0,670 \pm 0,255$  y la  $\bar{D}$  fue de  $3,866 \pm 0,912$  Gy (Figura 21). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fueron  $0,181 \pm 0,041$  Gy<sup>-1</sup> y  $0,012 \pm 0,007$  Gy<sup>-2</sup>, respectivamente. El coeficiente R al cuadrado fue de 0,601 (Figura 22 y Tabla 4). Se realizaron un total de 4 experimentos independientes.

De modo similar a los experimentos realizados con las células MIA PaCa-2, las células PANC-1 fueron incubadas durante 48 horas antes de la irradiación. En este intervalo se produjo multiplicidad celular por lo que se consideró adecuado realizar una corrección de la multiplicidad según el método de Gerweck. La multiplicidad tras la siembra fue 1,1 y en el momento de la irradiación (a las 48 horas) fue de 2,58. Una vez aplicada la corrección por la multiplicidad, la SF2 fue de  $0,336 \pm 0,174$  y la  $\bar{D}$  de  $2,245 \pm 0,553$  Gy (Figura 21). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fue de  $0,597 \pm 0,093$  Gy<sup>-1</sup> y  $-0,029 \pm 0,017$  Gy<sup>-2</sup>, respectivamente. El coeficiente R<sup>2</sup> al cuadrado fue de 0,579 (Figura 22 y Tabla 4)

### **5.5.2.- Células PANC-1 en monocapa**

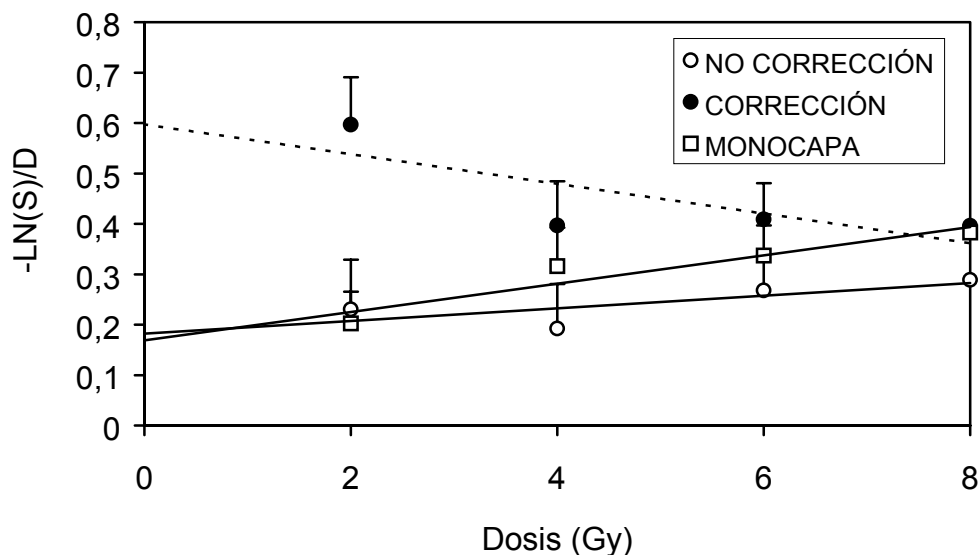
La CE basal fue  $0,19 \pm 0,07$ . La curva de supervivencia se muestra en la Figura 22. La SF2 fue de  $0,672 \pm 0,089$  y la  $\bar{D}$  fue de  $3,267 \pm 0,434$  Gy. El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fueron  $0,169 \pm 0,037$  Gy<sup>-1</sup> y  $0,0283 \pm 0,007$  Gy<sup>-2</sup>, respectivamente. El coeficiente R<sup>2</sup> fue de 0,894 (Figura 22 y Tabla 4). Se realizaron 7 experimentos independientes con 3 discos por dosis.

De forma parecida a las células MIA PaCa-2, la radiación inhibió la capacidad clonogénica de las células PANC-1, tanto aisladas como en monocapa, siendo la magnitud del efecto dependiente de la dosis de radiación. La relación entre la dosis de radiación y la supervivencia celular se ajustó al modelo L-Q.



**Figura 21. Curvas de radiosensibilidad de las células PANC-1**

Representación gráfica de la supervivencia de las células PANC-1 irradiadas aisladas o en monocapa. Además, se representa la curva tras la corrección por la multiplicidad. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 22. Determinación de alfa y beta en la línea PANC-1**

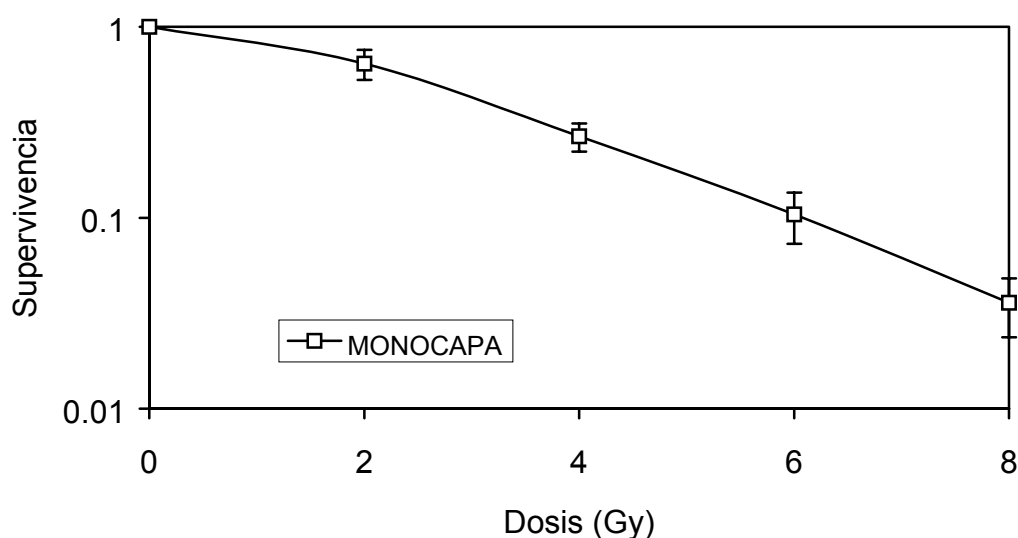
Los coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q se calcularon por el método de los mínimos cuadrados a partir de la transformación logarítmica de la ecuación L-Q en una ecuación lineal, en la que  $E = (-\ln S/D) = \alpha + \beta D$  y en donde S es la supervivencia y D la dosis. La S, tras una dosis de 2, 4, 6 u 8 Gy, se determinó experimentalmente en las células PANC-1 aisladas y en monocapa (Figura 21). Las ecuaciones L-Q fueron: No corrección:  $E = 0,181 + 0,012D$ ; Corrección:  $E = 0,597 - 0,029D$ ; Monocapa:  $E = 0,169 + 0,028D$ . Las hemibarras positivas corresponden al error estándar.



## 5.6.- RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA NP-18

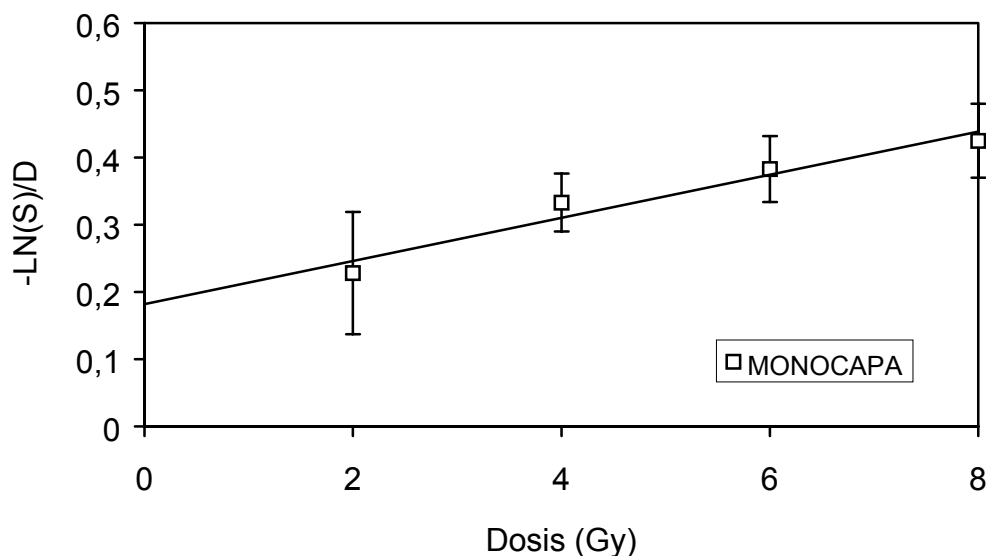
La CE basal fue  $0,094 \pm 0,05$ . La SF2 fue de  $0,642 \pm 0,115$  y la  $\bar{D}$  fue de  $3,057 \pm 0,307$  Gy (Figura 23). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fueron  $0,183 \pm 0,062$  Gy<sup>-1</sup> y  $0,0319 \pm 0,005$  Gy<sup>-2</sup>, respectivamente. El coeficiente R<sup>2</sup> fue de 0,949 (Figura 24 y Tabla 4). Se realizaron 7 experimentos independientes con 3 discos por dosis.

La radiación inhibió la capacidad clonogénica de las células NP-18 siendo la magnitud del efecto dependiente de la dosis de radiación. La relación entre la dosis de radiación y la supervivencia celular se ajustó con exactitud al modelo L-Q.



**Figura 23. Curva de radiosensibilidad de las células NP-18**

Representación de la supervivencia de las células NP-18 irradiadas en monocapa. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 24. Determinación de alfa y beta en la línea NP-18**

Los coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q se calcularon por el método de los mínimos cuadrados a partir de la transformación logarítmica de la ecuación L-Q en una ecuación lineal, en la que  $E = (-\ln S/D) = \alpha + \beta D$  y en donde S es la supervivencia y D la dosis. La S, tras una dosis de 2, 4, 6 u 8 Gy, se determinó experimentalmente en las células NP-18 irradiadas en monocapa (Figura 23). La ecuación L-Q fue  $E = 0,183 + 0,032D$ . Las barras indican el error estándar.

## 5.7.- RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA HCT-15

La radiosensibilidad de la línea de colon HCT-15 se determinó, como en los experimentos con líneas pancreáticas, en células aisladas y en monocapa.

### 5.7.1.- Células HCT-15 aisladas

La CE basal fue  $0,25 \pm 0,05$  ( $n = 8$ ). La SF2 fue de  $0,817 \pm 0,147$  y la  $\bar{D}$  fue de  $3,436 \pm 0,574$  Gy (Figura 25). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fueron  $-0,054 \pm 0,02$   $\text{Gy}^{-1}$  y  $0,085 \pm 0,004$   $\text{Gy}^{-2}$ , respectivamente. El coeficiente  $R^2$  al cuadrado fue de 0,995 (Figura 26 y Tabla 4)

---

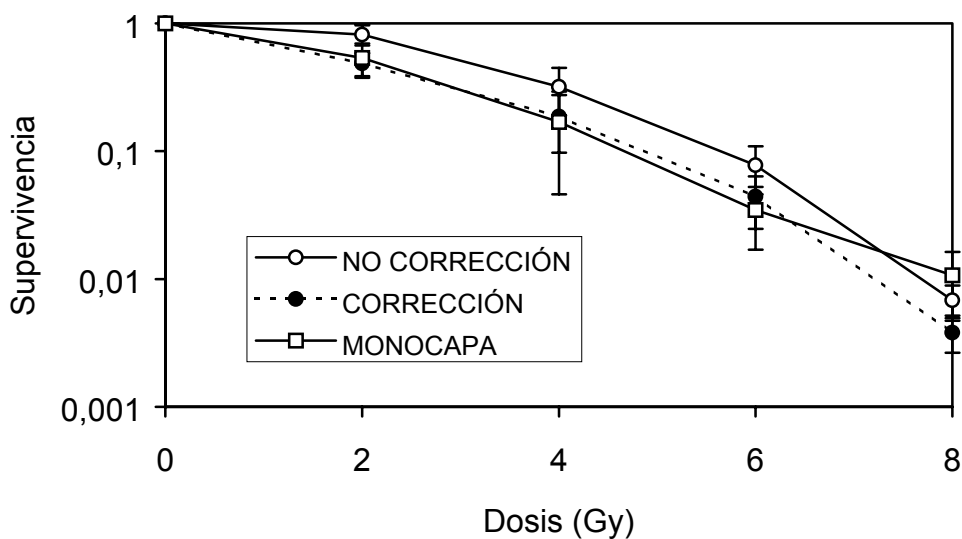
Se corrigió por la ñ teniendo en cuenta que la multiplicidad tras la siembra fue 1,05 y en el momento de la irradiación (24 h después de sembradas) fue de 1,8. La SF2 fue de  $0,486 \pm 0,099$  y la  $\bar{D}$  de  $2,437 \pm 0,4$  Gy (Figura 25). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fue de  $0,241 \pm 0,032$  Gy<sup>-1</sup> y  $0,054 \pm 0,007$  Gy<sup>-2</sup>, respectivamente. El coeficiente R<sup>2</sup> fue de 0,965 (Figura 26 y Tabla 4).

### 5.7.2.- Células HCT-15 en monocapa

La CE basal fue  $0,28 \pm 0,09$  (n = 5). La SF2 fue de  $0,536 \pm 0,16$  y la  $\bar{D}$  fue de  $2,476 \pm 0,555$  Gy (Figura 25). El valor de  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q fueron  $0,312 \pm 0,074$  Gy<sup>-1</sup> y  $0,040 \pm 0,016$  Gy<sup>-2</sup>, respectivamente. El coeficiente R<sup>2</sup> al cuadrado fue de 0,723 (Figura 26 y Tabla 4)

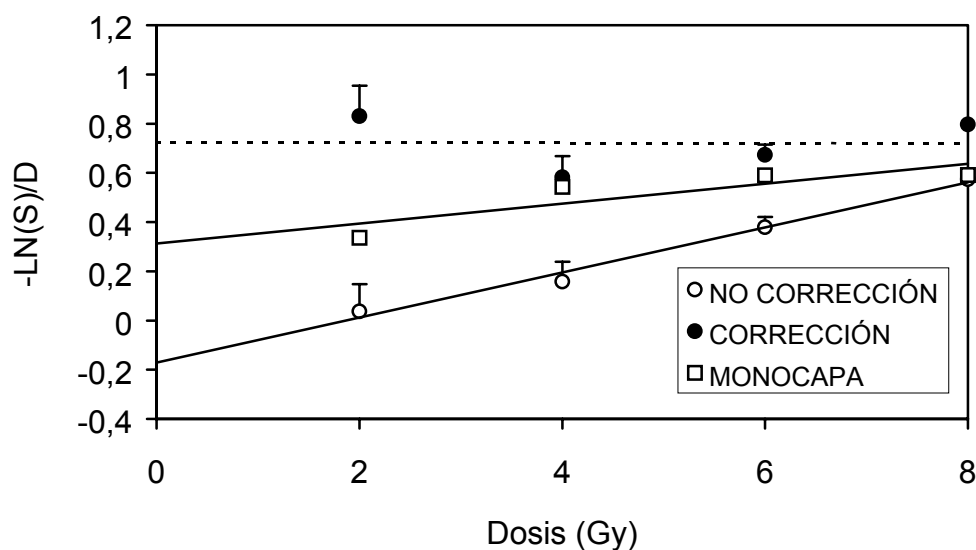
De forma similar a la células pancreáticas, MIA PaCa-2, PANC-1 y NP-18, la radiación inhibió la capacidad clonogénica de las células HCT-15 siendo la magnitud del efecto dependiente de la dosis de radiación. La relación entre la dosis de radiación y la supervivencia celular se ajustó al modelo L-Q.

La radiosensibilidad, medida por SF2 y  $\alpha$ , de las células pancreáticas aisladas fue mayor que la de las células colónicas. En monocapa, la radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2 y HCT-15 fue similar. PANC-1 y NP-18 mostraron una radiosensibilidad menor que HCT-15 (Tabla 4).



**Figura 25. Curvas de radiosensibilidad de las células HCT-15**

Representación de la curva de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas aisladas y en monocapa. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 26. Determinación de alfa y beta de las células HCT-15**

Los coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$  del modelo L-Q se calcularon por el método de los mínimos cuadrados a partir de la transformación logarítmica de la ecuación L-Q en una ecuación lineal, en la que  $E = (-\ln S/D) = \alpha + \beta D$  y en donde S es la supervivencia y D la dosis. La S, tras una dosis de 2, 4, 6 u 8 Gy, se determinó experimentalmente (Figura 25). Las ecuaciones L-Q fueron: No corrección:  $E = -0,054 + 0,085D$ ; Corrección:  $E = 0,241 + 0,054D$ ; Monocapa:  $E = 0,237 + 0,023D$ . Las hemibarras indican el error estándar.

**Tabla 4.** Comparación de la radiosensibilidad de las células pancreáticas y de las células HCT-15

	SF2	$\alpha$	$\bar{D}$
<b>CÉLULAS IRRADIADAS AISLADAS</b>			
MIA PaCa-2 versus PANC-1	0,690 vs 0,670 (0,850) <i>0,487 vs 0,336</i> (0,186)	0,137 vs 0,181 (1) <i>0,335 vs 0,597</i> (0,257)	3,460 vs 3,866 (0,705) <i>2,735 vs 2,245</i> (0,131)
MIA PaCa-2 versus HCT-15	0,690 vs 0,817 (0,068) <i>0,487 vs 0,486</i> (0,20)	0,137 vs -0,054 <b>(0,015)</b> <i>0,335 vs 0,241</i> (0,0641)	3,460 vs 3,436 (0,908) <i>2,735 vs 2,437</i> (0,817)
PANC-1 versus HCT-15	0,670 vs 0,817 (0,396) <i>0,336 vs 0,486</i> <b>(0,041)</b>	0,181 vs -0,054 (0,062) <i>0,597 vs 0,241</i> (0,496)	3,866 vs 3,436 (0,497) <i>2,245 vs 2,437</i> (0,125)
<b>CÉLULAS IRRADIADAS EN MONOCAPA</b>			
MIA PaCa-2 versus PANC-1	0,602 vs 0,672 (0,257)	0,237 vs 0,169 (0,256)	2,940 vs 3,267 (0,257)
MIA PaCa-2 versus NP-18	0,602 vs 0,642 (0,571)	0,237 vs 0,183 (0,256)	2,940 vs 3,057 (0,257)
PANC-1 versus NP-18	0,6722 vs 0,642 (0,749)	0,169 vs 0,183 (0,949)	3,267 vs 3,057 (0,654)
MIA PaCa-2 versus HCT-15	0,602 vs 0,536 (0,805)	0,237 vs 0,312 (0,149)	2,940 vs 2,476 (0,141)
PANC-1 versus HCT-15	0,672 vs 0,536 (0,224)	0,169 vs 0,312 <b>(0,002)</b>	3,267 vs 2,476 <b>(0,028)</b>
NP-18 versus HCT-15	0,642 vs 0,536 (0,222)	0,183 vs 0,312 (0,058)	3,057 vs 2,476 <b>(0,028)</b>

**SF2:** Supervivencia tras 2 Gy.  $\bar{D}$  : Dosis Media de Inactivación.  $\alpha$ : Coeficiente alfa del modelo L-Q.  
**Entre paréntesis:** Valor de p (U de Mann-Whitney). **En negrita:** Valor de p estadísticamente significativo. **En cursiva:** Radiosensibilidad de las células aisladas corregida por la multiplicidad.

## C) RADIOSENSIBILIDAD *IN VIVO*

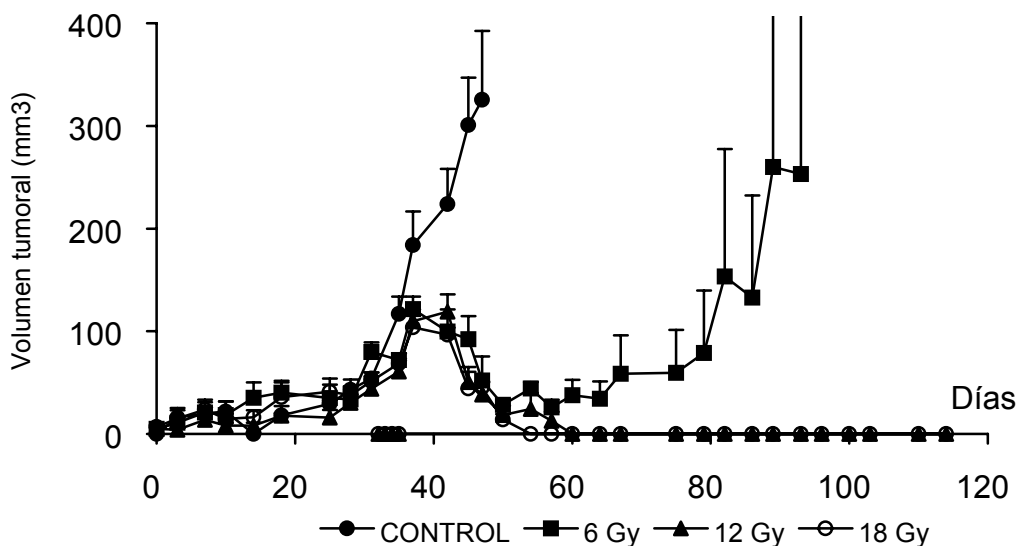
La radiosensibilidad se determinó *in vivo* a partir de la inhibición del crecimiento de los tumores producidos en ratones atímicos tras la inoculación de células MIA PaCa-2 y HCT-15.

### 5.8.- XENOTRASPLANTE MIA PaCa-2

La irradiación inhibió el crecimiento tumoral del xenotrasplante MIA PaCa-2. La inhibición se relacionó con la dosis de radiación dada. Todos los tumores MIA PaCa-2 respondieron a dosis de 6 Gy o mayores. Seis Gy provocaron un growth delay de 65,7 días. El volumen tumoral tras la irradiación pasó de 121,7 a 29 mm<sup>3</sup>,  $p = 0,014$ . Una dosis igual o mayor de 12 Gy causó la desaparición de todos los tumores de origen pancreático, hecho que se confirmó histológicamente (Figura 27).

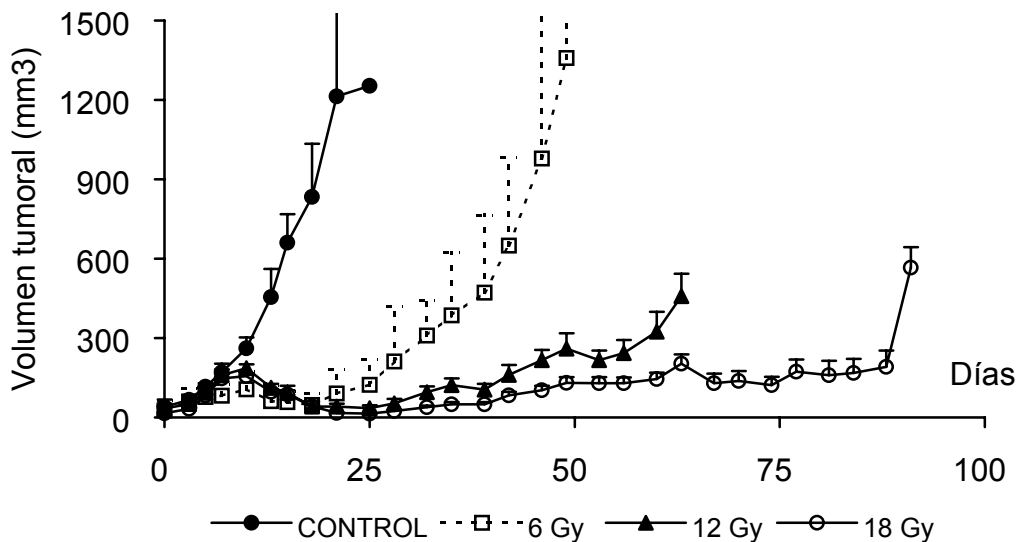
### 5.9.- XENOTRASPLANTE HCT-15

La irradiación tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento tumoral del xenotrasplante HCT-15 (Figura 28). Al igual que ocurrió con el xenotrasplante MIA PaCa-2, dosis crecientes de radiación inhibieron su crecimiento. El xenotrasplante MIA PaCa-2 fue más radiosensible que el HCT-15. En el xenotrasplante HCT-15, una dosis de 6 Gy produjo un growth delay sólo en 2 tumores de 6 irradiados. Por contra, en el xenotrasplante MIA PaCa-2 una dosis de 6 Gy causó un growth delay cuatro veces superior en todos los tumores (Tabla 5). En el xenotrasplante HCT-15, una dosis de 12 Gy causó un growth delay de 34,8 días y una disminución del volumen tumoral inicial de 120 a 35,2 mm<sup>3</sup> ( $p = 0,02$ ). Una dosis de 18 Gy causó un growth delay de 54,7 días y una disminución del volumen tumoral inicial de 120 a 14 mm<sup>3</sup> ( $p = 0,0007$ .) El efecto antitumoral de la radiación fue claramente mayor en los tumores de origen pancreático comparado con los de colon (Tabla 5). Las diferencias entre el volumen inicial (previo a la irradiación) de los tumores MIA PaCa-2 y el de los HCT-15 no fueron estadísticamente significativas.



**Figura 27. Radiosensibilidad del xenotrasplante MIA PaCa-2**

Representación del crecimiento del xenotrasplante MIA PaCa-2 tras la inoculación de  $2 \times 10^6$  células en el tejido subcutáneo de la región escapular. Los tumores se irradiaron con un haz de RX de 50 kV. La dosis administrada fue de 6, 12 o 18 Gy. La radiación se administró cuando los tumores presentaban un crecimiento exponencial. Se representan los valores promedio del volumen tumoral. Las hemibarras indican el error estándar. Todos los tumores MIA PaCa-2 respondieron a una dosis  $\geq 6$  Gy. Tras 6 Gy el growth delay fue de 65,7 días ( $n = 4$ ). Tras 12 y 18 Gy desaparecieron los tumores ( $n = 6$ ;  $n = 4$ , respectivamente).



**Figura 28. Radiosensibilidad del xenotrasplante HCT-15**

Representación del crecimiento del xenotrasplante HCT-15 tras la inoculación de  $2 \times 10^6$  células en el tejido subcutáneo de la región escapular. Los tumores se irradiaron con un haz de RX de 50 kV. La dosis administrada fue de 6, 12 o 18 Gy. La radiación se administró cuando los tumores presentaban un crecimiento exponencial. Se representan los valores promedio del volumen tumoral. Las hemibarras indican el error estándar. Tras 6 Gy sólo respondieron 2 tumores y el growth delay fue de 5,2 días, (curva de trazo discontinuo). Tras 12 y 18 Gy el growth delay fue 34,8 días ( $n = 7$ ) y de 54,7 días ( $n = 8$ ), respectivamente.

**Tabla 5.** Efecto antitumoral de la irradiación sobre los xenotrasplantes MIA PaCa-2 y HCT-15

	<b>6 Gy</b>	<b>12 Gy</b>	<b>18 Gy</b>
<b>MIA PaCa-2</b>			
Volumen inicial (mm <sup>3</sup> )	121,7 ± 24	109 ± 13,5	104 ± 11,6
Volumen final (mm <sup>3</sup> )	28 ± 5,3	0	0
<i>Growth delay</i> (días)	65,7 ± 18,9	≥ 80	≥ 80
<b>HCT-15</b>			
Volumen inicial (mm <sup>3</sup> )	119 ± 33,8	120 ± 20,1	120 ± 52,3
Volumen final (mm <sup>3</sup> )	47 ± 22 {a}	35,2 ± 11	14 ± 3
<i>Growth delay</i> (días)	5, 2 ± 8,4	34,8 ± 12	54,7 ± 22,1

**Medias** ± error estándar. **Volumen inicial:** mm<sup>3</sup> del tumor al iniciar el tratamiento; **Volumen final:** volumen tumoral más pequeño después del tratamiento; **{a}**: sólo 2 tumores de 6 respondieron a 6 Gy.



## D) SENSIBILIDAD AL 5-FU *IN VITRO*

Las células pancreáticas MIA-PaCa-2, PANC-1 y NP-18 y las células de origen colónico HCT-15 fueron tratadas con 5-FU sin irradiación con el objetivo de evaluar exclusivamente su quimiosensibilidad. Las células, al igual que en los experimentos de irradiación, se trataron aisladas o en monocapa, ya que, como se ha comentado, ambos métodos de tratamiento pueden influir en la respuesta frente a un citostático.

### 5.10.- CÉLULAS MIA PaCa-2

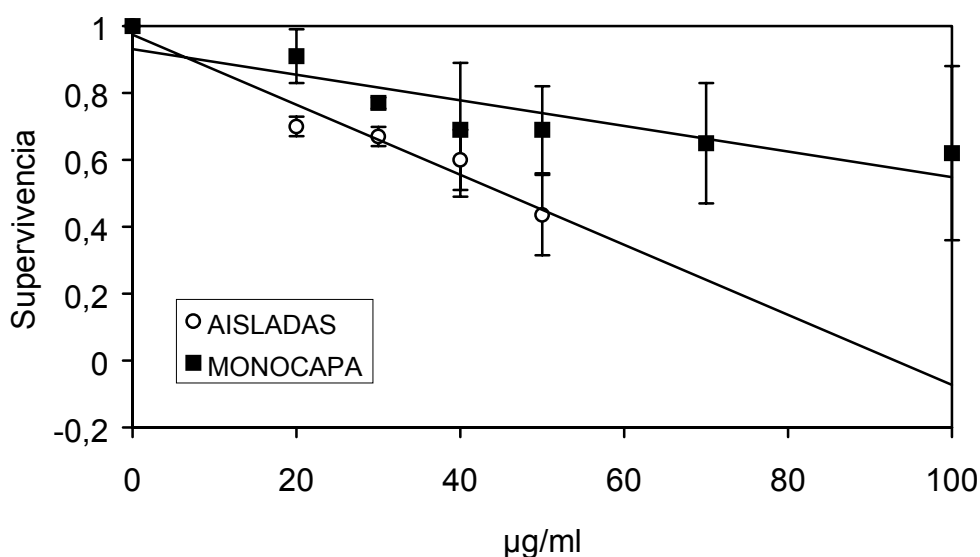
La supervivencia de las células MIA PaCa-2 expuestas al 5-FU durante 30 minutos -exposición en bolus- fue en células aisladas de  $0,7 \pm 0,029$  y de  $0,435 \pm 0,12$  tras una dosis de 20 y de 50  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Figura 29). En monocapa, la supervivencia fue de  $0,91 \pm 0,08$  y de  $0,62 \pm 0,26$  tras una dosis de 20 y de 100  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Figura 29).

Después de 48 h de exposición al 5-FU -exposición en incubación continua-, la supervivencia de las células MIA PaCa-2 aisladas fue de  $0,63 \pm 0,118$  y de  $0,3 \pm 0,064$  tras una dosis de 0,5 y de 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Figura 30). En monocapa, la supervivencia fue de  $0,74 \pm 0,16$  y de  $0,6 \pm 0,32$  tras una dosis de 0,5 y de 1  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (Figura 30).

El 5-FU, administrado en bolus o en incubación continua, a células aisladas o en monocapa, inhibió el crecimiento de las células MIA PaCa-2. La supervivencia fue dosis-dependiente. La relación entre la dosis y el efecto se ajustó a una regresión lineal.

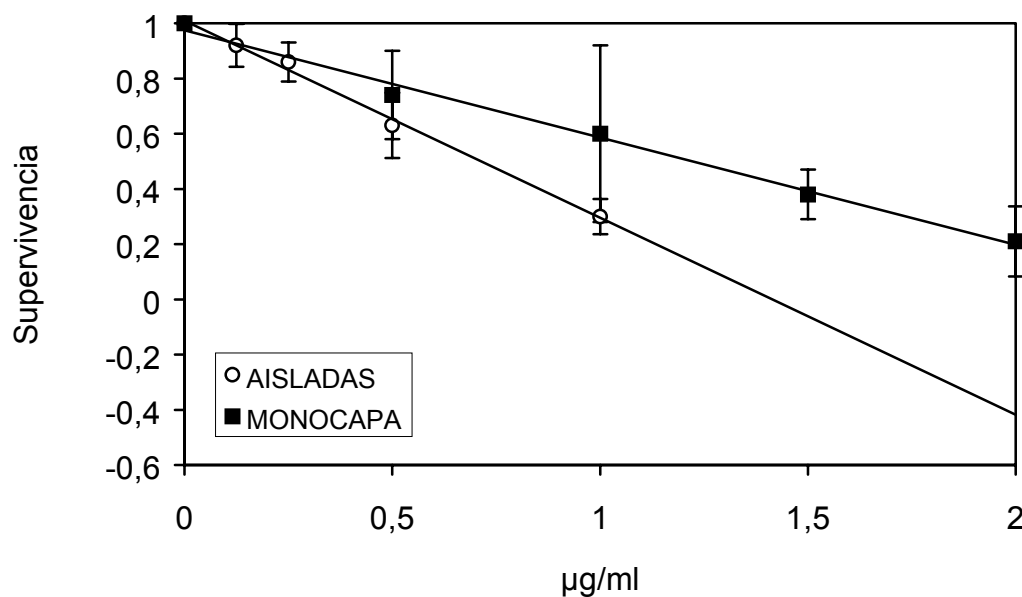
Las células aisladas fueron más sensibles que las células en monocapa, sobre todo en incubación continua en donde una dosis de 5-FU de 1  $\mu\text{g/ml}$  tuvo un efecto 2 veces mayor sobre células aisladas que sobre células en monocapa, aunque el análisis estadístico sólo indicó una tendencia a la significación ( $p = 0,075$ ).

Si consideramos el efecto como el producto de la concentración por el tiempo, el 5-FU administrado en incubación continua fue más activo que en bolus. Así, para un mismo efecto se requirieron más  $\mu\text{g/ml}$  por hora si el 5-FU fue administrado en bolus que si lo fue en incubación continua. Por ejemplo, en células aisladas, una supervivencia de 0,6 fue tanto el resultado de un tratamiento con una dosis de 5-FU de 30  $\mu\text{g/ml}$  administrados durante 0,5 horas como el de una dosis de 0,5  $\mu\text{g/ml}$  durante 48 horas. En este ejemplo, cada hora fueron necesarios 60  $\mu\text{g/ml}$  de 5-FU en bolus y 0,01  $\mu\text{g/ml}$  de 5-FU en incubación continua para un mismo efecto.



**Figura 29. Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 tratadas con 5-FU en bolus**

Representación de la supervivencia de las células MIA PaCa-2 tratadas con 5-FU durante 30 minutos. En el tratamiento de células aisladas, se sembraron 200 células aisladas por disco de 21  $\text{cm}^2$ . Cuarenta y ocho horas después se trataron con 5-FU. La dosis administrada fue de 20, 30, 40 o 50  $\mu\text{g/ml}$ . Las células se incubaron durante 10 días y se contaron las colonias. En el tratamiento en monocapa, se administró el 5-FU a células en semiconfluencia a dosis de 20, 30, 40, 50, 70 o 100  $\mu\text{g/ml}$  de 5-FU. A continuación, las células se incubaron durante 6 horas y se disgregaron para ser sembradas en discos de 21  $\text{cm}^2$   $\text{cm}$ . Se depositaron 1.000 células por disco. Al cabo de 10 días, se contaron las colonias. Los experimentos se realizaron por triplicado con 3 discos por dosis. Las barras indican la desviación estándar.



**Figura 30. Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 con 5-FU en incubación continua**

Representación de la supervivencia de las células MIA PaCa-2 aisladas tratadas con 5-FU durante 48 horas. En el tratamiento de células aisladas, se sembraron 200 células aisladas por disco de 21 cm<sup>2</sup>. Cuarenta y ocho horas después se trataron con 5-FU. La dosis administrada fue de 0,13, 0,25, 0,5 o 1 µg/ml de 5-FU. Las células se incubaron durante 10 días y se contaron las colonias. En el tratamiento en monocapa, se administró el 5-FU a células en semiconfluencia a dosis de ,5, 1, 1,5 o 2 µg/ml de 5-FU. Las células se incubaron durante 6 horas y se disgregaron para ser sembradas en discos de 21 cm<sup>2</sup> cm. Se depositaron 1.000 células por disco. Al cabo de 10 días, se contaron las colonias. Los experimentos se realizaron por triplicado con 3 discos por dosis. Las barras indican la desviación estándar.

### 5.11.- CÉLULAS PANC-1 Y NP-18

Las células PANC-1 y NP-18 se trataron con 5-FU siguiendo protocolos similares a los descritos con las células MIA PaCa-2. Sin embargo, ni PANC-1 ni NP-18, fueron sensibles al 5-FU, incluso cuando se aumentaron significativamente las dosis de 5-FU.

### 5.12.- CÉLULAS HCT-15

Las células HCT-15 se trataron aisladas con una única dosis de 5-FU de 20 µg/ml durante 30 minutos o con 0,5 µg/ml de 5-FU durante 48 horas. Se realizaron 4 experimentos de tratamiento en bolus y 4 de tratamiento en incubación continua. Se sembraron 1.500 células por disco. El 5-FU, administrado en bolus o en incubación continua, inhibió el crecimiento de las células HCT-15. En bolus, la supervivencia fue de  $0,781 \pm 0,098$ ; en incubación continua fue de  $0,644 \pm 0,25$ .

Las células MIA PaCa-2 fueron más sensibles al 5-FU que las células HCT-15 cuando el 5-FU se administró en bolus (20 µg/ml): MIA PaCa-2 =  $0,7 \pm 0,029$  versus HCT-15 =  $0,781 \pm 0,098$ ;  $p = 0,037$ .

## E) SENSIBILIDAD AL 5-FU *IN VIVO*

La sensibilidad al 5-FU se determinó *in vivo* a partir de la inhibición del crecimiento tumoral.

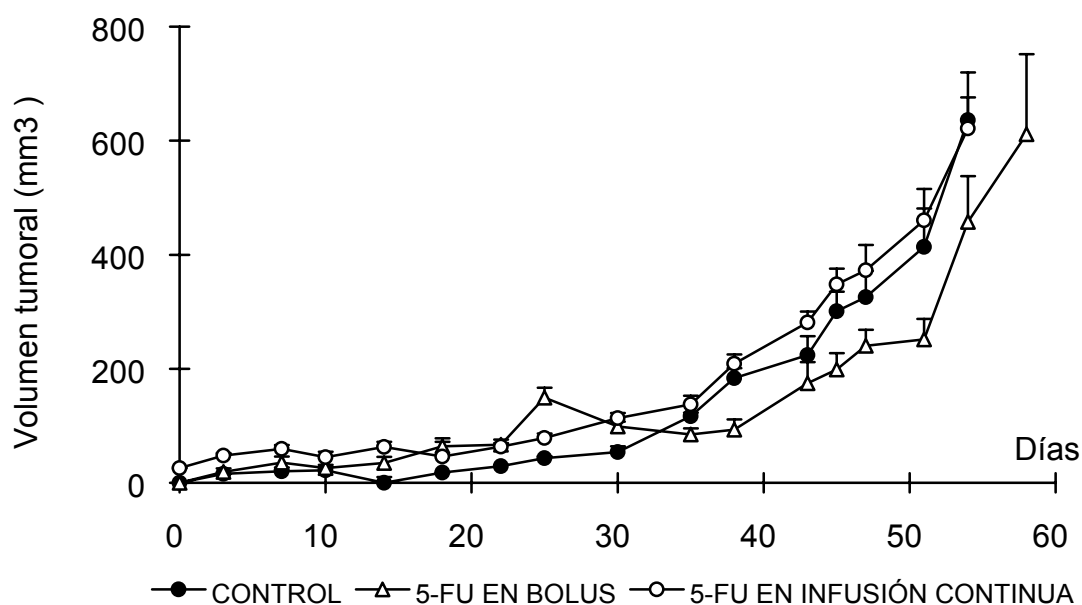
### 5.13.- XENOTRASPLANTE MIA PaCa-2

La administración de 5-FU en forma de bolus inhibió el crecimiento tumoral del xenotrasplante MIA PaCa-2 (Figura 31). En el momento de la administración del bolus, los tumores medían  $150 \pm 48,5 \text{ mm}^3$  y los animales pesaban  $26,9 \pm 1,98 \text{ g}$ . El tratamiento con 5-FU administrado en bolus disminuyó el volumen en 8 de 9 tumores. La regresión tumoral máxima llegó a casi la mitad del volumen inicial,  $p = 0,006$  (Tabla 6). El growth delay fue de 20 días. La disminución media del peso de los animales fue del 16%. Esta disminución fue máxima a los 10 días.

A diferencia del 5-FU en bolus, la administración de 5-FU en forma de infusión continua no inhibió el crecimiento tumoral del xenotrasplante MIA PaCa-2 (Figura 31). Al inicio de la administración del 5-FU en infusión, el volumen tumoral era de  $174,5 \pm 36,6 \text{ mm}^3$  y el peso de los animales de  $27,5 \pm 2,6 \text{ g}$ , características similares a los animales tratados con 5-FU en bolus,  $p = 0,4$  (Tabla 6). A pesar de que la dosis total de 5-FU dada en infusión continua fue similar a la del bolus, no se observó una disminución del volumen tumoral en ninguno de los 16 tumores tratados. Ningún animal murió. La disminución media del peso de los animales fue del 13% y se registró durante el tratamiento. La prolongación del tiempo en el que se administró el 5-FU tuvo un efecto negativo sobre el control de los tumores.

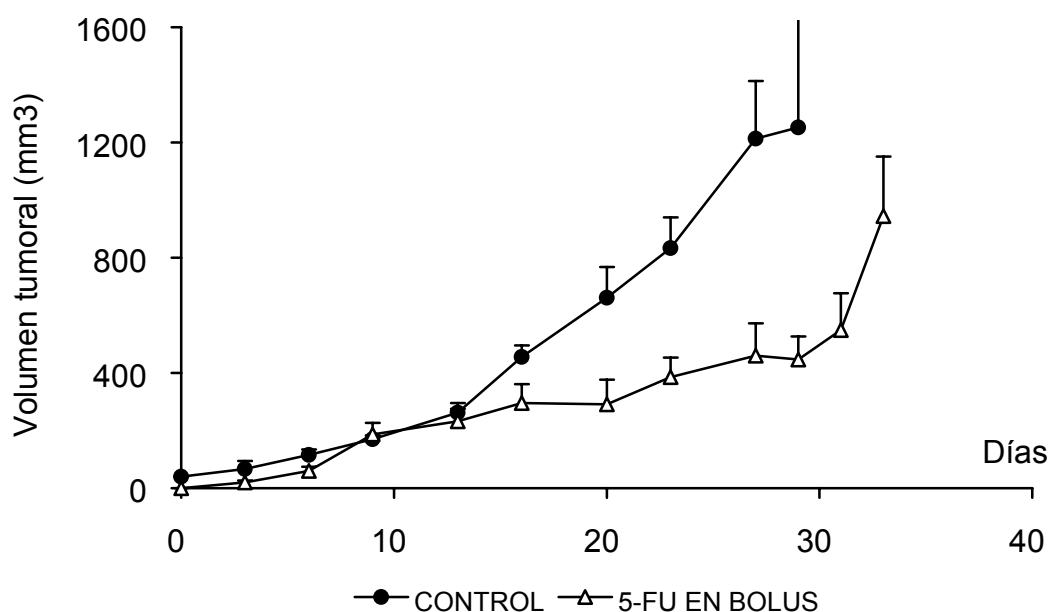
### 5.14.- XENOTRASPLANTE HCT-15

La administración de 5-FU en forma de bolus no inhibió el crecimiento tumoral del xenotrasplante HCT-15 en 10 tumores analizados (Figura 32). A pesar del tratamiento, todos los tumores continuaron creciendo; sólo se observó un enlentecimiento del crecimiento tumoral (sin una clara disminución de volumen). En el momento de la inyección i.p. de 5-FU, el tamaño de los tumores fue de  $186,5 \pm 39,9 \text{ mm}^3$  y el peso de los animales  $26,5 \pm 0,86 \text{ g}$  (Tabla 6). Las diferencias entre el volumen inicial de los tumores MIA PaCa-2 y el de los HCT-15 no fueron significativas,  $p = 0,407$ . Tras la administración del 5-FU el peso de los animales disminuyó un 17 %. Dos animales de 5 murieron a causa de la toxicidad por el 5-FU. Los tumores de estos 2 animales crecieron a pesar del 5-FU.



**Figura 31. Quimiosensibilidad del xenotrasplante MIA PaCa-2**

Representación del crecimiento del xenotrasplante MIA PaCa-2 tras la inoculación de  $2 \times 10^6$  células en el tejido subcutáneo de la región escapular. Los animales fueron tratados con 5-FU administrado en forma de bolus por vía intraperitoneal (230 mg/kg) o en forma de infusión continua mediante una minibomba intraabdominal (220 mg/kg). El tratamiento se administró en el día 22. Se representan los valores promedio del volumen tumoral ( $n = 9$  tumores bolus;  $n = 16$  tumores continua). La hemibarras indican el error estándar. El efecto del 5-FU en bolus fue de un growth delay de 20 días. La administración continua no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de los tumores.



**Figura 32. Quimiosensibilidad del xenotrasplante HCT-15**

Representación del crecimiento del xenotrasplante HCT-15 tras la inoculación de  $2 \times 10^6$  células en el tejido subcutáneo de la región escapular. Los animales fueron tratados con 5-FU administrado en forma de bolus por vía intraperitoneal (230 mg/kg). El tratamiento se administró en el día 8. Se representan los valores promedio del volumen de 10 tumores. La hemibarras indican el error estándar. El efecto del 5-FU consistió en un enlentecimiento del crecimiento de los tumores sin constatar una disminución del volumen tumoral.

**Tabla 6.** Efecto antitumoral del 5-FU sobre los xenotrasplantes MIA PaCa-2 y HCT-15

	<b>BOLUS</b> (230 mg/kg )	<b>INFUSIÓN</b> (220 mg/kg )
<b>MIA PaCa-2</b>		
Peso (gr)	$26,9 \pm 1,98$ (16) {a}	$27,5 \pm 2,6$ (13)
Volumen inicial ( $\text{mm}^3$ )	$150 \pm 48,5$	$174,5 \pm 36,6$
Volumen final ( $\text{mm}^3$ )	$84 \pm 11$ {b}	No respuesta
Growth delay (días)	$20,3 \pm 4,3$	0
<b>HCT-15</b>		
Peso (gr)	$26,7 \pm 0,86$ (17)	
Volumen inicial ( $\text{mm}^3$ )	$186,5 \pm 39,9$	
Volumen final ( $\text{mm}^3$ )	No respuesta	
Growth delay (días)	0	

**Medias**  $\pm$  error estándar. **Volumen inicial:**  $\text{mm}^3$  del tumor al iniciar el tratamiento; **Volumen final:** volumen tumoral más pequeño después del tratamiento; {a}: entre paréntesis,  $\downarrow$  % del peso inicial; {b}: 8 tumores de 9 respondieron al 5-FU

---

## F) EFECTO DEL 5-FU SOBRE LA RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MIA PaCa-2

El efecto del 5-FU sobre la radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2 aisladas se determinó por comparación de la supervivencia de las células irradiadas con la de las células tratadas con irradiación y 5-FU. La administración de 5-FU se efectuó según dos esquemas: en bolus y en incubación continua; cada uno de estos esquemas fue estudiado según dos secuencias: 5-FU dos horas antes o después de la irradiación. El diseño experimental fue concebido para determinar qué cambios se producen en la radiosensibilidad al añadir 5-FU a la irradiación, sin alterar ninguna otra condición. No se comparó la radiosensibilidad entre esquemas y/o secuencias distintas. Las células se trataron en la fase de crecimiento exponencial (Figura 33).

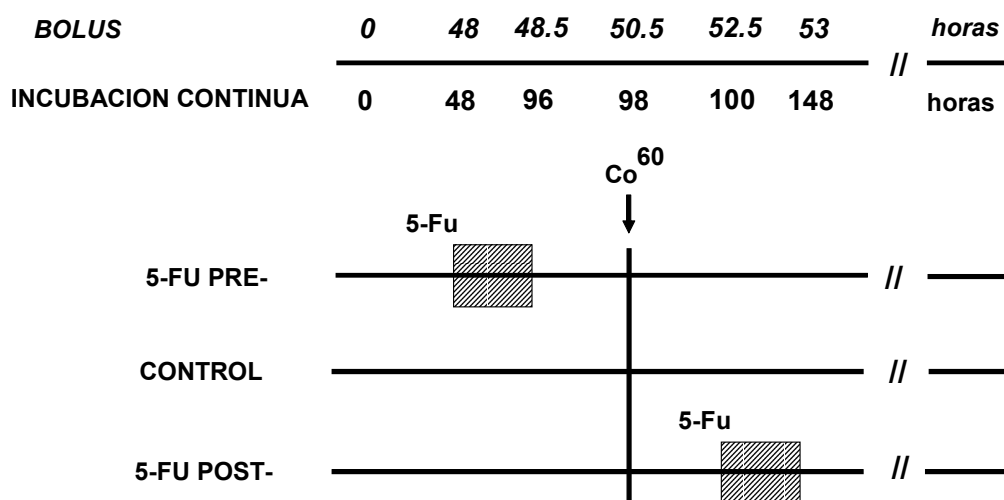
### 5.15.- ADMINISTRACIÓN DE 5-FU EN BOLUS

En los experimentos realizados siguiendo el diseño experimental de bolus, la CE basal de la línea MIA PaCa-2 fue de  $0,643 \pm 0,075$ . La supervivencia tras la administración de 5-FU fue de  $0,647 \pm 0,118$ . La SF2 y la  $\bar{D}$  fueron de  $0,771 \pm 0,051$  y  $3,891 \pm 0,342$ , respectivamente. Estos valores (controles) no mostraron diferencias significativas respecto a los observados previamente. La adición de 5-FU en bolus aumentó la radiosensibilidad de la línea MIA PaCa-2. El valor de SF2 disminuyó en 1,64 veces, ( $0,771/0,469$ ) si el 5-FU se administró antes de la irradiación, y en 1,65 veces, ( $0,771/0,465$ ) si se administró después. El valor de  $\bar{D}$  disminuyó en 1,64 ( $3,891/2,368$ ) y en 1,63 ( $3,891/2,376$ ) veces, respectivamente. La reducción de SF2 y  $\bar{D}$  fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en ambas secuencias (Tabla 7). Sin embargo, tras ajustar la supervivencia por el efecto citotóxico propio del 5-FU, las diferencias, tanto a nivel de SF2 como de  $\bar{D}$ , perdieron su significación estadística (Tabla 7).



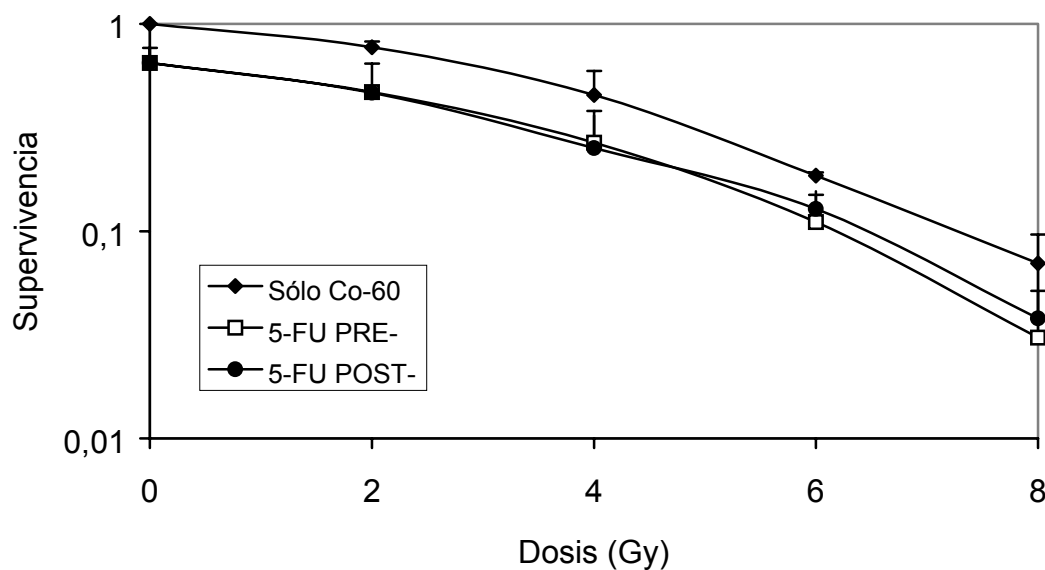
Al evaluar la forma de las curvas de supervivencia se observaron resultados similares. Las curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 tratadas con 5-FU en bolus 2 horas antes o después de la radiación se caracterizaron por presentar un desplazamiento hacia la izquierda sin variar ni la morfología ni la pendiente de la curva (Figura 34). Después de ajustar por el efecto inicial del 5-FU, las curvas se solaparon y desapareció el incremento de la radiosensibilidad observado sin ajustar (Figura 35).

Estas observaciones sugieren que el 5-FU en bolus, administrado 2 horas antes o después de la radiación, tiene un efecto citotóxico aditivo al de la irradiación en las células MIA PaCa-2.



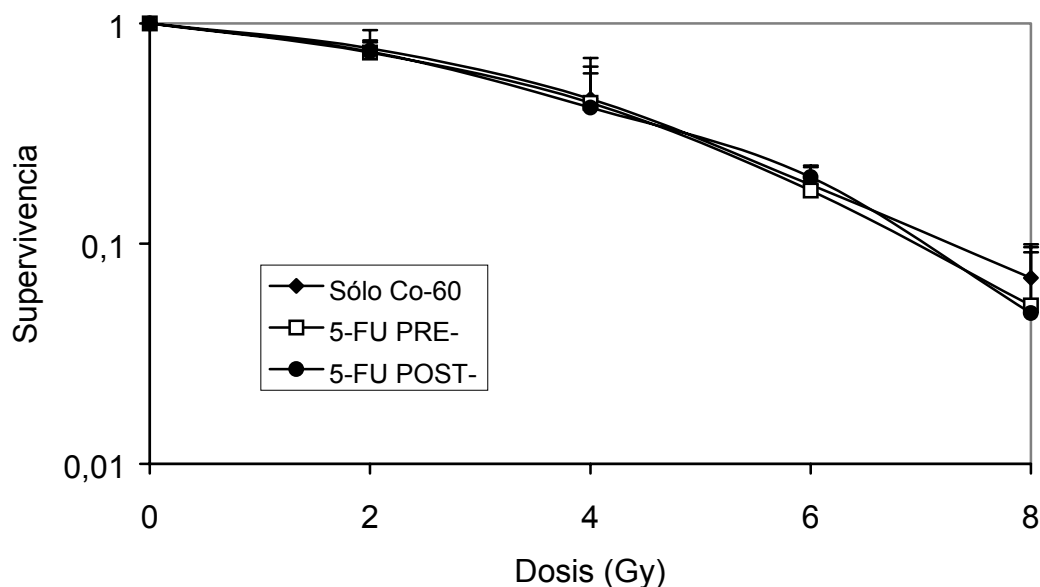
**Figura 33. Protocolo de los experimentos de tratamiento combinado de las células MIA PaCa-2.**

Las células MIA PaCa-2 aisladas se trataron con dosis únicas de radiación ( $Co-60$ ) de 2, 4, 6 u 8 Gy. Al mismo tiempo, una batería pareja de células, se trató, además de la radiación, con 5-FU (rectángulos), administrado según se señala en los diagramas. La línea horizontal, que indica tiempo, se inicia en el momento de sembrar las células. *Esquema bolus:* 5-FU (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 30 min, 2 h antes o 2 h después de la radiación. *Esquema incubación continua:* 5-FU (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 48 h terminando o iniciando la administración de 5-FU 2 h antes o 2 h después de la radiación. Los valores de  $SF_2$  y  $\bar{D}$ , resultantes de la irradiación sola, se compararon (test de la U de Mann Whitley) con sus parejas respectivas de  $SF_2$  y  $\bar{D}$  tras el tratamiento con radiación y 5-FU. Se realizaron 3 experimentos independientes con 3 discos por dosis de radiación dada.



**Figura 34. Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas tratadas con 5-FU en bolus.**

Las células MIA PaCa-2 se trataron con irradiación (curva de Sólo Co-60) o con irradiación más 5-FU administrado en bolus según la secuencia de 5-FU pre- y 5-FU post-irradiación. La desviación estándar está representada por las hemibarras positivas. La pendiente de las curvas de supervivencia tras el tratamiento combinado fue similar a la de irradiación sola.



**Figura 35. Ajuste por el efecto del 5-FU**

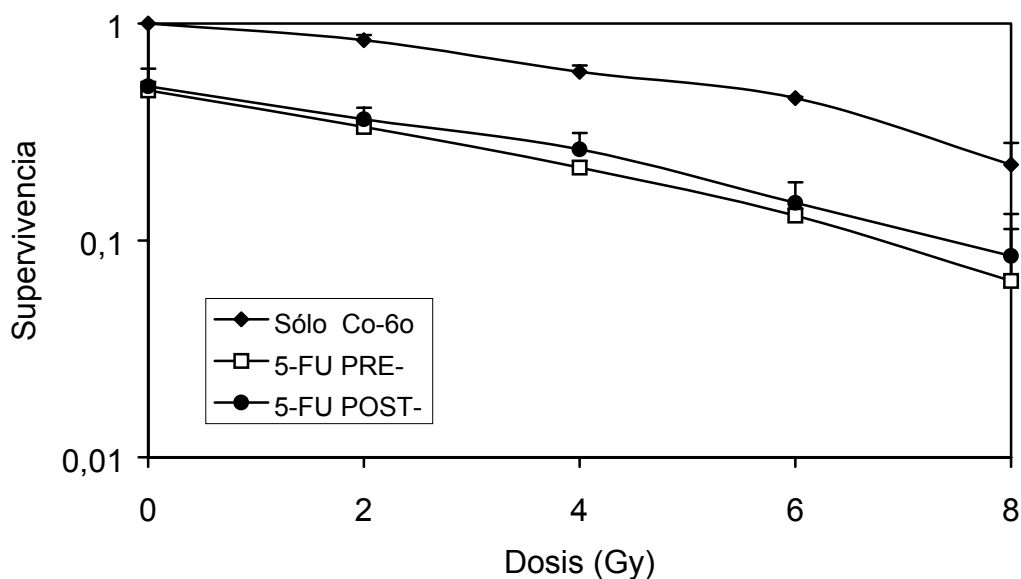
Las células MIA PaCa-2 se trataron igual que en la Figura 34. Se ajustó la supervivencia celular para sustraer el efecto citotóxico del 5-FU. Para ello, la supervivencia celular se consideró como el cociente entre la CE de las células tratadas con irradiación y 5-FU y la CE de las células tratadas con 5-FU solo. No se observaron diferencias entre las curvas, efecto sugestivo de una interacción de tipo aditivo entre la irradiación y el 5-FU.

## 5.16.- ADMINISTRACIÓN DE 5-FU EN INCUBACIÓN CONTINUA

La CE basal de las células MIA PaCa-2 en los experimentos realizados según el diseño experimental de incubación continua fue  $0,713 \pm 0,172$ . La supervivencia tras el tratamiento con 5-FU en incubación continua fue de  $0,492 \pm 0,105$  y  $0,513 \pm 0,047$ , en la secuencia de 5-FU pre- y 5-FU post-, respectivamente. Estos valores no mostraron diferencias significativas respecto a los observados previamente.

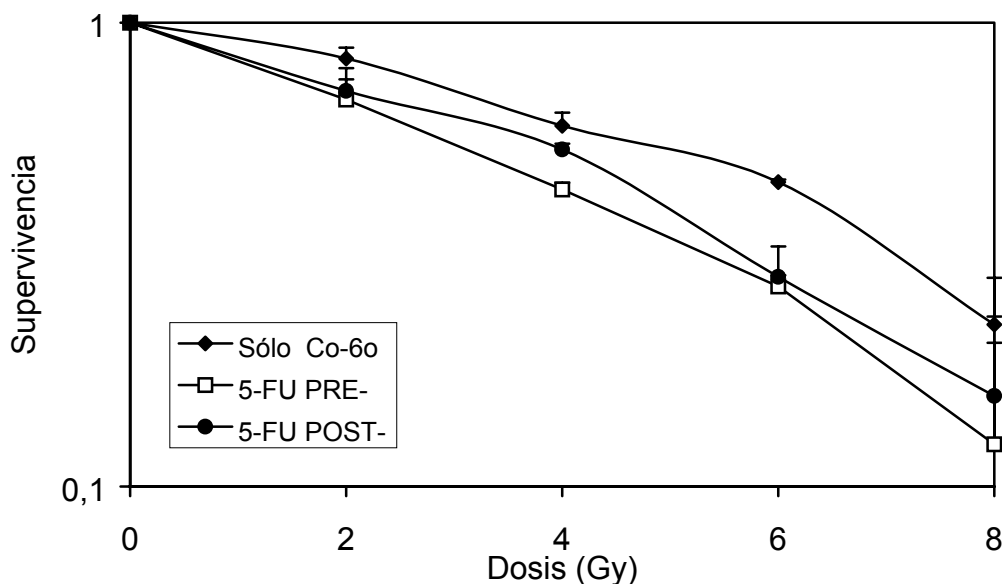
Las células MIA PaCa-2 se irradiaron a las 98 horas de la siembra. De forma similar al tratamiento con 5-FU en bolus, la adición de 5-FU en incubación continua incrementó la radiosensibilidad de la línea MIA PaCa-2. SF2 disminuyó en 2,51 veces ( $0,837/0,333$ ), si el 5-FU se administró antes de la irradiación, y en 2,31 veces ( $0,837/0,362$ ), si se administró después.  $\bar{D}$  se redujo en 2,60 ( $5,002/1,917$ ) y en 2,33 veces ( $5,002/2,146$ ), respectivamente ( $p < 0,05$ ) (Tabla 7). En contraste con la administración de 5-FU en bolus, cuando se ajustó la supervivencia por el efecto propio del 5-FU, las diferencias, tanto a nivel de SF2 y de  $\bar{D}$ , sí fueron estadísticamente significativas. La disminución de la supervivencia celular fue de 1,22 ( $0,837/0,683$ ;  $p = 0,049$ ) y de 1,17 veces ( $0,837/0,713$ ;  $p = 0,049$ ) con la adición de 5-FU en incubación continua pre- y post- irradiación, respectivamente. En el mismo sentido, la  $\bar{D}$  disminuyó en un factor de 1,28 ( $5,002/3,903$ ;  $p = 0,049$ ) y de 1,18 veces ( $5,002/4,217$ ;  $p = 0,049$ ) (Tabla 7).

Las curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 tratadas con irradiación y 5-FU en incubación continua durante 48 horas se caracterizaron por una pendiente mayor que la de la curva de irradiación sola (Figura 36), que se mantuvo tras ajustar por el efecto de 5-FU (Figura 37). Estos cambios, sugieren la existencia de una radiosensibilización tras la adición de 5-FU en incubación continua.



**Figura 36. Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua**

Las células MIA PaCa-2 se trataron con irradiación (curva de Sólo Co-60) o irradiación más 5-FU en incubación continua. La desviación estándar está representada por las hemibarras positivas. La pendiente de las curvas de tratamiento combinado fue mayor que la de la curva de irradiación sola.



**Figura 37. Ajuste por el efecto del 5-FU**

Las células MIA PaCa-2 se trataron como en la Figura 36. Sin embargo, se ajustó la supervivencia celular para sustraer el efecto citotóxico del 5-FU. Para ello, la supervivencia se consideró como el cociente entre la CE de las células tratadas con irradiación y 5-FU y la CE de las células tratadas con 5-FU solo. A pesar del ajuste, la pendiente de las curvas de tratamiento combinado fue mayor que la de la curva de irradiación sola, efecto compatible con una radiosensibilización.

En resumen, el tratamiento con 5-FU aumentó la radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2, tanto en la administración en bolus como en incubación continua. Sin embargo, sólo cuando el 5-FU se administró en incubación continua, independientemente de la secuencia, se observó un efecto sobre la radiosensibilidad compatible con un radiosensibilización de las células MIA PaCa-2.

**Tabla 7.** Efecto del 5-FU administrado en bolus o en incubación continua, antes o después de la irradiación, sobre la supervivencia celular tras 2 Gy (SF2) y la dosis media de inactivación ( $\bar{D}$ ) en las células MIA PaCa-2

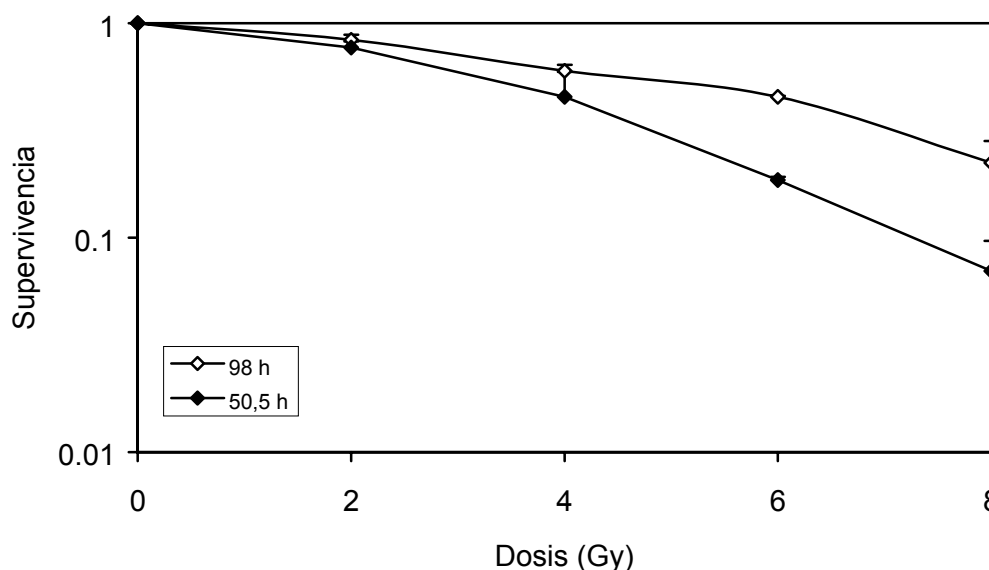
		Irradiación sola	+ 5-FU pre-rt	(Factor)	+ 5-FU post-rt	(Factor)
<b>Supervivencia no ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,771 ± 0,051	0,469 ± 0,050*	(1,64)	0,465 ± 0,030*	(1,65)
	$\bar{D}$	3,891 ± 0,342	2,368 ± 0,465*	(1,64)	2,376 ± 0,170*	(1,63)
Experimentos en i. continua	SF2	0,837 ± 0,047	0,333 ± 0,047*	(2,51)	0,362 ± 0,047*	(2,31)
	$\bar{D}$	5,002 ± 0,085	1,917 ± 0,389*	(2,60)	2,146 ± 0,099*	(2,33)
<b>Supervivencia ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,771 ± 0,051	0,737 ± 0,101	(1,04)	0,745 ± 0,187	(1,03)
	D	3,891 ± 0,342	3,747 ± 0,833	(1,04)	3,770 ± 0,806	(1,03)
Experimentos en i. continua	SF2	0,837 ± 0,047	<b>0,683 ± 0,085*</b>	<b>(1,22)</b>	<b>0,713 ± 0,071*</b>	<b>(1,17)</b>
	D	5,002 ± 0,085	<b>3,903 ± 0,175*</b>	<b>(1,28)</b>	<b>4,217 ± 0,090*</b>	<b>(1,18)</b>

\*:  $P < 0,05$  vs irradiación sola. En cursiva y negrita, diferencias significativas a pesar del ajuste por el efecto del 5-FU. Resultados experimentales sin corrección por la multiplicidad celular

## **G) INFLUENCIA DE LA CORRECCIÓN POR LA MULTIPLICIDAD CELULAR SOBRE LA MODULACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD POR EL 5-FU EN LAS CÉLULAS MIA PaCa-2**

En nuestros experimentos de tratamiento combinado, la multiplicidad celular,  $n$ , debido a la proliferación de las células desde que se sembraron hasta que se irradiaron, pudo influir en la radiosensibilidad y en la modulación de ésta por 5-FU. Las células MIA PaCa-2 se irradiaron habiendo transcurrido 50,5 o 98 h desde su siembra, es decir, en los experimentos en bolus  $n$  fue de 1,8 y en los experimentos en incubación continua fue de 5,5. La  $n$  2 horas después de la siembra fue de 1,2. Por ello, se estudió si la  $n$  había modificado nuestros resultados. En las células MIA PaCa-2, cuando la  $n$  fue de 1,8, la SF2 fue de 0,771 y la  $\bar{D}$  fue de 3,891. En cambio, cuando la  $n$  fue de 5,5, la SF2 fue de 0,837 y  $\bar{D}$  fue de 5,002. La radiosensibilidad intrínseca disminuyó al incrementarse la multiplicidad (Figura 38). Sin embargo, desde un punto de vista estadístico, las diferencias sólo fueron significativas para  $\bar{D}$  ( $p = 0,049$ ).

A continuación, se analizó si la corrección por la  $n$  (método de Gerweck) modificó la modulación ejercida por el 5-FU sobre la radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2.



**Figura 38. Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas a las 50,5 o 98 horas de la siembra**

*Representación de las curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas según el esquema de incubación continua. No se administró 5-FU. La desviación estándar está representada por las hemibarras positivas. Las diferencias entre ambas curvas sólo fueron estadísticamente significativas al comparar  $\bar{D}$ .*

### 5.17.- ADMINISTRACIÓN DE 5-FU EN BOLUS

Una vez corregida la multiplicidad, se comparó la SF2 y la  $\bar{D}$  de las células irradiadas con la SF2 y  $\bar{D}$  de las células tratadas con irradiación y 5-FU (Tabla 8). La SF2 disminuyó en 1,74 veces (0,548/0,314;  $p < 0,05$ ) si el 5-FU se administró antes de la irradiación y en 1,77 veces (0,548/0,308;  $p < 0,05$ ) si se administró después. La  $\bar{D}$  disminuyó en 1,69 (2,997/1,773;  $p < 0,05$ ) y 1,77 (2,997/1,686;  $p < 0,05$ ) veces cuando se administró el 5-FU, antes o después de la irradiación, respectivamente (Tabla 8). Del mismo modo que ocurría sin corregir por la multiplicidad, la radiosensibilidad fue significativamente mayor con la adición de 5-FU en bolus. Una vez ajustada la supervivencia celular por el efecto citotóxico del 5-FU las diferencias entre la irradiación y la irradiación asociada al 5-FU no fueron estadísticamente significativas (Tabla 8). Por tanto, la corrección por la multiplicidad celular no modificó el patrón radiosensibilidad del tratamiento combinado. El incremento de la radiosensibilidad observado con la adición del 5-FU en bolus fue del mismo orden de magnitud (Tablas 7 y 8).



**Tabla 8.** Efecto del 5-FU administrado en bolus o en incubación continua, antes o después de la irradiación, sobre la supervivencia celular tras 2 Gy (SF2) y la dosis media de inactivación ( $\bar{D}$ ) en las células MIA PaCa-2.

		Irradiación sola	+ 5-FU pre-rt	(Factor)	+ 5-FU post-rt	(Factor)
<b>Supervivencia no ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,548 ± 0,038	0,314 ± 0,040*	(1,74)	0,308 ± 0,028*	(1,78)
	$\bar{D}$	2,997 ± 0,227	1,773 ± 0,391*	(1,69)	1,686 ± 0,213*	(1,77)
Experimentos en i. continua	SF2	0,242 ± 0,048	0,074 ± 0,010*	(3,27)	0,083 ± 0,003*	(2,91)
	$\bar{D}$	2,037 ± 0,080	0,780 ± 0,181*	(2,61)	0,863 ± 0,089*	(2,36)
<b>Supervivencia ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,548 ± 0,038	0,510 ± 0,073	(1,07)	0,512 ± 0,184	(1,07)
	$\bar{D}$	2,997 ± 0,227	2,869 ± 0,589	(1,04)	2,784 ± 0,721	(1,07)
Experimentos en i. continua	SF2	0,242 ± 0,048	<b>0,161 ± 0,023*</b>	<b>(1,50)</b>	<b>0,171 ± 0,023*</b>	<b>(1,41)</b>
	$\bar{D}$	2,037 ± 0,080	<b>1,665 ± 0,041*</b>	<b>(1,22)</b>	<b>1,737 ± 0,043*</b>	<b>(1,17)</b>

\*:  $P < 0,05$  vs irradiación sola. En cursiva y negrita, diferencias significativas a pesar del ajuste por el efecto del 5-FU  
 Resultados experimentales con corrección por la multiplicidad celular

---

### 5.18.- ADMINISTRACIÓN DE 5-FU EN INCUBACIÓN CONTINUA

Se analizó si el incremento de la radiosensibilidad observado previamente en las células MIA PaCa-2 tratadas con 5-FU en incubación continua se mantenía al corregir la multiplicidad. La adición del 5-FU en incubación continua incrementó la radiosensibilidad de la línea MIA PaCa-2. La SF2 disminuyó en un factor de 3,27 (0,242/0,074;  $p < 0,05$ ) si el 5-FU se administró antes de la irradiación, y en un factor de 2,91 (0,242/0,083;  $p < 0,05$ ) si se administró después (Tabla 8). La  $\bar{D}$  disminuyó en un factor de 2,61 (2,037/0,780;  $p < 0,05$ ) y de 2,36 (2,037/0,863;  $p < 0,05$ ) cuando se administró el 5-FU en incubación continua, antes o después de la irradiación, respectivamente (Tabla 8). Tras ajustar por el efecto del 5-FU la SF2 fue de 1,5 veces mayor (0,242/0,161;  $p < 0,05$ ) y de 1,41 (0,242/0,171;  $p < 0,05$ ) veces mayor, después del tratamiento con 5-FU en incubación continua pre- y post-, respectivamente (Tabla 8). El incremento de  $\bar{D}$  fue de 1,22 (2,037/1,665;  $p < 0,05$ ) y de 1,17 (2,037/1,737;  $p < 0,05$ ), respectivamente (Tabla 8). Por tanto, concluimos que este efecto es altamente sugestivo de una radiosensibilización debida al 5-FU en la línea MIA PaCa-2. El incremento de la radiosensibilidad observado con la adición del 5-FU en incubación continua fue mayor o del mismo orden de magnitud que sin corregir la multiplicidad (Tablas 7 y 8).

---

## H) EFECTO DEL 5-FU SOBRE LA RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR HCT-15

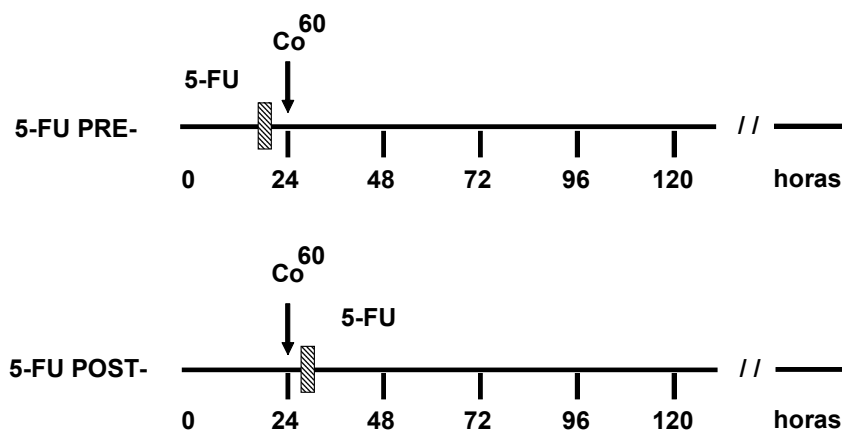
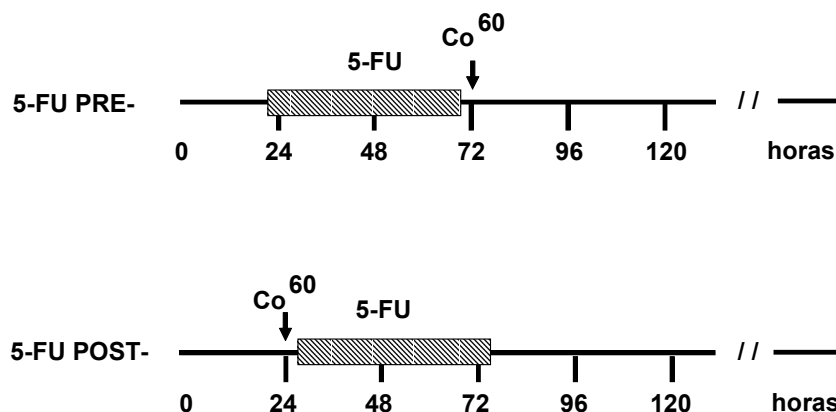
De forma similar a las células MIA PaCa-2, el efecto del 5-FU sobre la radiosensibilidad de las células HCT-15 aisladas se determinó comparando la supervivencia de las células irradiadas con la de las células tratadas con radiación y 5-FU. La administración de 5-FU se efectuó según dos esquemas: en bolus y en incubación continua; cada uno de estos esquemas se administró según dos secuencias: tratamiento con 5-FU dos horas antes o después de la irradiación. El diseño experimental fue concebido para determinar qué cambios en la radiosensibilidad se producen al añadir 5-FU, sin alterar ninguna otra condición que pudiera influir en la radiosensibilidad. A diferencia del diseño experimental empleado en la línea MIA PaCa, en la HCT-15 se procuró minimizar la multiplicidad, por este motivo se irradiaron las células a las 24 h tras siembra en la secuencia post. No se pretendió comparar la radiosensibilidad entre esquemas y/o secuencias distintas, sólo entre irradiación sola e irradiación y 5-FU. Las células se trataron en fase de crecimiento exponencial (Figura 39).

### 5.19.- ADMINISTRACIÓN DE 5-FU EN BOLUS

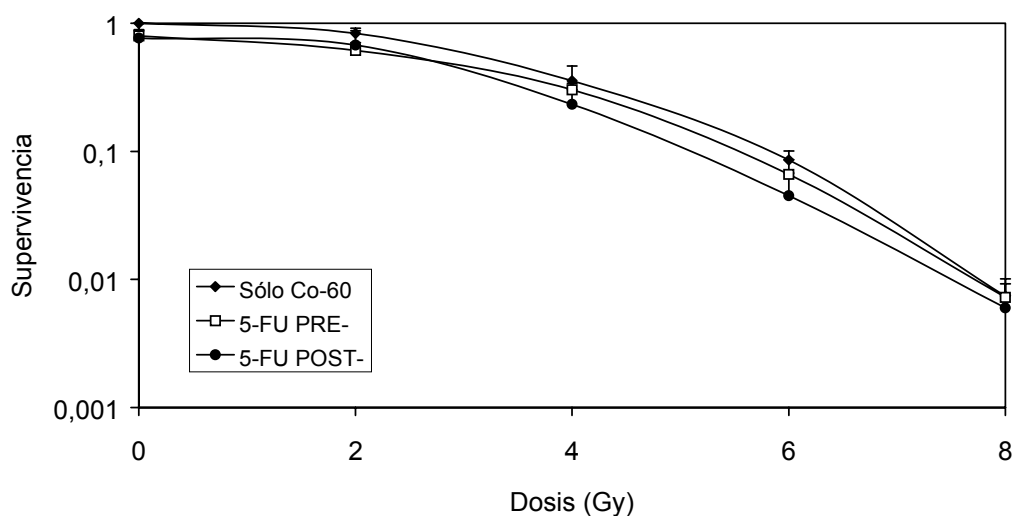
La CE basal según el protocolo de tratamiento en bolus fue de  $0,257 \pm 0,05$ . La supervivencia de las células tratadas exclusivamente con 5-FU (20  $\mu\text{g/ml}$  durante 30 min) según la secuencia de 5-FU pre- fue de  $0,799 \pm 0,076$ . Al mismo tiempo, la supervivencia de las células tratadas con la misma dosis de 5-FU de acuerdo con la secuencia de 5-FU post- fue de  $0,766 \pm 0,126$ . La SF2 de las células HCT-15 tratadas sólo con radiación fue de  $0,836 \pm 0,08$  y la  $\bar{D}$  fue de  $3,563 \pm 0,272$ . En ambos tratamientos, estos valores (controles) no mostraron diferencias respecto a los observados en los experimentos iniciales.

La adición de 5-FU en bolus aumentó la radiosensibilidad de la línea HCT-15. La administración de 5-FU antes de la irradiación disminuyó la SF2 de 0,836 a 0,614, con un factor de reducción de 1,36 veces ( $p = 0,02$ ), y disminuyó la  $\bar{D}$  de 3,563 a 2,772, equivalente a un decremento de 1,28 veces ( $p = 0,015$ ) (Tabla 9). La administración de 5-FU después de la irradiación disminuyó la SF2 de 0,836 a 0,675 (factor de reducción = 1,24;  $p = \text{NS}$ ) y disminuyó la  $\bar{D}$  de 3,563 a 2,561, es decir 1,39 veces ( $p = 0,02$ ) (Tabla 9). Cuando se ajustó la supervivencia por el efecto del 5-FU, la disminución de SF2 y  $\bar{D}$  dejó de ser significativa en todos los casos (Tabla 9).

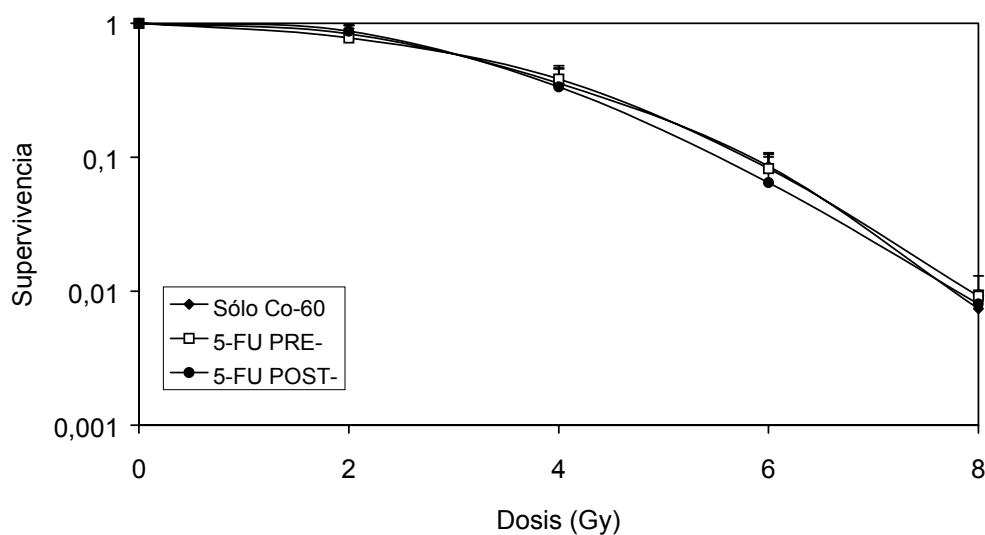
De forma similar a las células MIA PaCa-2, las curvas de supervivencia de las células HCT-15 tratadas con 5-FU en bolus 2 horas antes o después de la radiación se caracterizaron por presentar un desplazamiento hacia la izquierda sin variar ni la morfología ni la pendiente de la curva (Figura 40). Después de ajustar la supervivencia por el efecto inicial del 5-FU, las curvas se solaparon (Figura 41). Esta observación, sugiere que el 5-FU en bolus, administrado 2 horas antes o después de la radiación, tiene un efecto citotóxico aditivo en las células HCT-15.

**ESQUEMA BOLUS****ESQUEMA CONTINUA****Figura 39. Protocolo de los experimentos de tratamiento combinado de las células HCT-15**

Las células HCT-15 aisladas se trataron con dosis únicas de radiación (Co-60) de 2, 4, 6 u 8 Gy. Al mismo tiempo, una batería pareja de células, se trató, además de la radiación, con 5-FU (rectángulos), administrado según se señala en los diagramas. La línea horizontal, que indica tiempo, se inicia en el momento de sembrar las células. *Esquema bolus*: 5-FU (20 µg/ml) durante 30 min, 2 h antes o 2 h después de la radiación. *Esquema incubación continua*: 5-FU (0,5 µg/ml) durante 48 h terminando o iniciando la administración de 5-FU 2 h antes o 2 h después de la radiación. Los valores de SF2 y  $\bar{D}$ , resultantes de la irradiación sola, se compararon (test de la U de Mann Whitney) con sus parejas respectivas de SF2 y  $\bar{D}$  tras el tratamiento con radiación y 5-FU. Se realizaron 4 experimentos independientes con 3 discos por dosis de radiación dada.



**Figura 40. Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en bolus.** Las células HCT-15 se trataron con irradiación (curva de Sólo Co-60) o con irradiación más 5-FU administrado en bolus según la secuencia de 5-FU pre- y 5-FU post-irradiación. La desviación estándar está representada por las hemibarras positivas. La pendiente de las curvas de supervivencia tras el tratamiento combinado fue similar a la de irradiación sola, efecto sugestivo de una interacción de tipo aditivo entre la irradiación y el 5-FU.



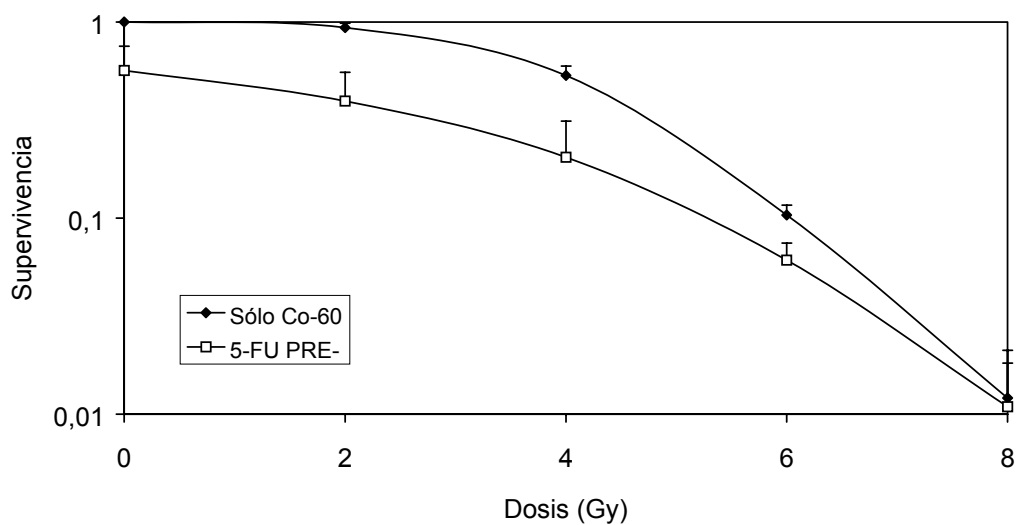
**Figura 41. Ajuste por el efecto del 5-FU**

Las células HCT-15 se trataron igual que en la Figura 40. Se ajustó la supervivencia celular para substrair el efecto citotóxico del 5-FU. Para ello, la supervivencia celular se consideró como el cociente entre la CE de las células tratadas con irradiación y 5-FU y la CE de las células tratadas con 5-FU sólo. No se observaron diferencias entre las curvas.

## 5.20.- ADMINISTRACIÓN DE 5-FU EN INCUBACIÓN CONTINUA

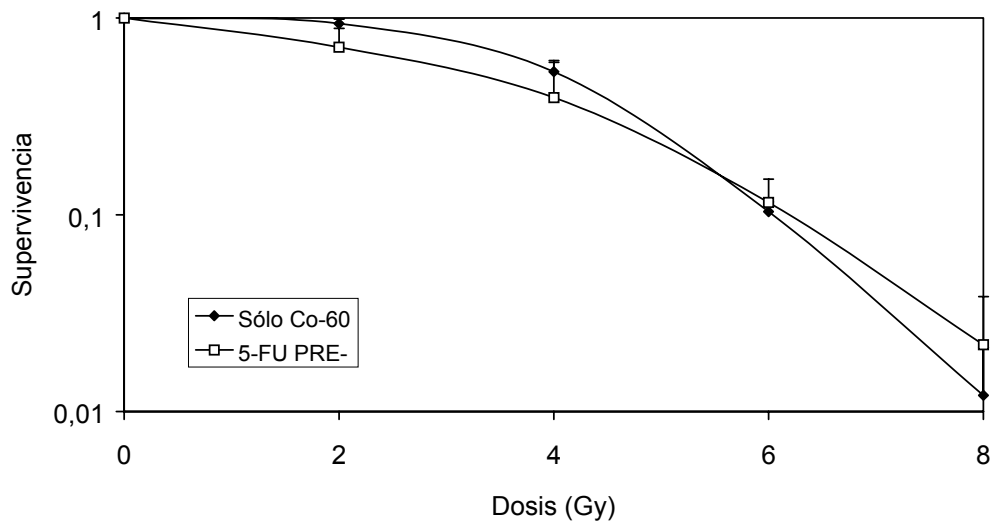
La CE basal de los experimentos según la secuencia de 5-FU pre-irradiación fue de  $0,375 \pm 0,098$ . La CE de los experimentos de 5-FU post-irradiación fue de  $0,34 \pm 0,122$ . La supervivencia de las células HCT-15 tratadas sólo con 5-FU en incubación continua fue de  $0,566 \pm 0,189$  y  $0,765 \pm 0,32$ , administrado, respectivamente, de acuerdo a la secuencia de 5-FU pre- y 5-FU post-. La SF2 de las células HCT-15 tras la irradiación, administrada según la secuencia 5-FU pre- y la 5-FU post- fue de 0,937 y de 0,799, respectivamente. La  $\bar{D}$  fue 3,69 y 3,309, respectivamente. El efecto del 5-FU y de la irradiación fue similar al de los experimentos iniciales.

De igual modo al tratamiento con 5-FU en bolus, la adición de 5-FU en incubación continua incrementó también la radiosensibilidad de las células HCT-15. Tras la administración de 5-FU antes de la irradiación, el valor de SF2 disminuyó de 0,937 a 0,395, es decir, una reducción de 2,37 veces ( $p < 0,05$ ). Asimismo, la  $\bar{D}$  pasó de 3,69 a 1,898, es decir, 1,94 veces menor ( $p < 0,05$ ) (Tabla 9). Al añadir el 5-FU después de la irradiación, la radiosensibilidad de las células HCT-15 también aumentó. La SF2 disminuyó de 0,799 a 0,36, es decir, 2,22 veces inferior a la irradiación sola ( $p < 0,05$ ), y la  $\bar{D}$  disminuyó de 3,309 a 1,808, es decir, una reducción de 1,83 veces ( $p = \text{NS}; 0,08$ ) (Tabla 9). Al ajustar la supervivencia por el efecto del 5-FU dado antes de la irradiación, la SF2 disminuyó de 0,937 a 0,771, es decir, una reducción de 1,21 veces ( $p = \text{NS}; 0,08$ ). La disminución de  $\bar{D}$  (1,06 veces) fue claramente no significativa ( $p = 1$ ) (Tabla 9). Por contra, en la secuencia de 5-FU post-, una vez ajustada la supervivencia por 5-FU, la SF2 disminuyó de 0,799 a 0,435, equivalente a 1,83 veces ( $p = 0,02$ ). Asimismo, la  $\bar{D}$  disminuyó de 3,309 a 2,309, una reducción de 1,43 veces ( $p < 0,05$ ) (Tabla 9). Las curvas de supervivencia de las células HCT-15 tratadas con irradiación y 5-FU en incubación continua durante 48 horas se caracterizaron por una pendiente mayor que la de la curva de irradiación sola, tanto en la secuencia de 5-FU pre- como la de 5-FU post (Figuras 42 y 44). Sin embargo, al ajustar por el 5-FU la pendiente sólo continuó siendo mayor en la administración post-irradiación (Figuras 43 y 45). Estos cambios, atribuibles a la adición de 5-FU, son sugestivos de corresponder a una radiosensibilización.



**Figura 42. Curva de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua según la secuencia esquema de 5-FU pre-.**

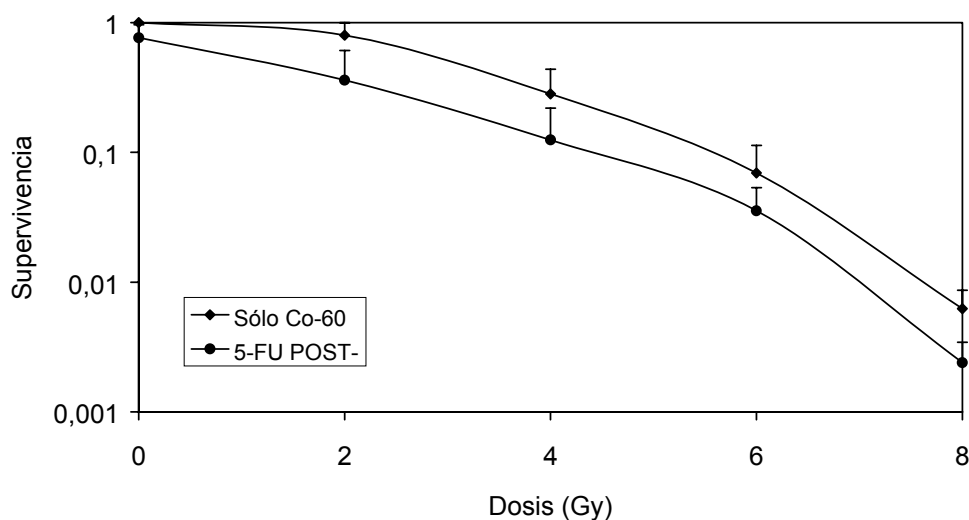
Las células HCT-15 se trataron con irradiación (curva de Sólo Co-60) o irradiación más 5-FU en incubación continua según la secuencia pre- del protocolo experimental. La desviación estándar está representada por las hemibarras positivas.



**Figura 43. Ajuste por el efecto del 5-FU .**

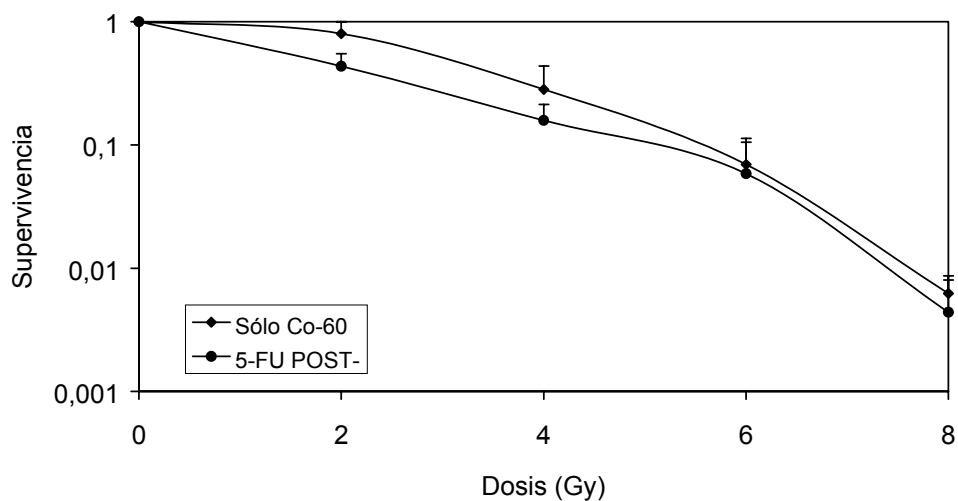
Las células HCT-15 se trataron como en la Figura 42. Sin embargo, se ajustó la supervivencia celular para sustraer el efecto citotóxico del 5-FU. La supervivencia se consideró como el cociente entre la CE de las células tratadas con irradiación y 5-FU y la CE de las células tratadas con 5-FU solo. La curva de irradiación sola y la de tratamiento combinado se solaparon.





**Figura 44. Curva de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua según el secuencia de 5-FU post- .**

Las células HCT-15 se trataron con irradiación (curva de Sólo Co-60) o irradiación más 5-FU en incubación continua según la secuencia post- del protocolo. La desviación estándar está representada por las hemibarras positivas.



**Figura 45. Ajuste por el efecto del 5-FU.**

Las células HCT-15 se trataron como en la Figura 44. Sin embargo, se ajustó la supervivencia celular para substraer el efecto citotóxico del 5-FU. La supervivencia se consideró como el cociente entre la CE de las células tratadas con irradiación y 5-FU y la CE de las células tratadas con 5-FU solo. La curva de irradiación y la de tratamiento combinado NO se solaparon.

En resumen, el tratamiento con 5-FU aumentó la radiosensibilidad de las células HCT-15, tanto en la administración en bolus como en incubación continua. Sin embargo, sólo cuando el 5-FU se administró en incubación continua después de la irradiación se observó un efecto sobre la radiosensibilidad compatible con una radiosensibilización de las células HCT-15. El incremento de la radiosensibilidad en la administración en bolus y en incubación preirradiación es sugerente de una interacción aditiva entre la radiación y el 5-FU.

**Tabla 9.** Efecto del 5-FU administrado en bolus o en incubación continua, antes o después de la irradiación, sobre la supervivencia celular tras 2 Gy (SF2) y la dosis media de inactivación ( $\bar{D}$ ) en las células HCT-15

		Irradiación sola	+ 5-FU pre-rt	(Factor)	+ 5-FU post-rt	(Factor)
<b>Supervivencia no ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,836 ± 0,080	0,614 ± 0,093*	(1,36)	0,675 ± 0,215	(1,24)
	$\bar{D}$	3,563 ± 0,272	2,772 ± 0,223	(1,28)	2,561 ± 0,244*	(1,39)
Experimentos en i. continua Secuencia 5-FU pre-	SF2	0,937 ± 0,151	0,395 ± 0,158*	(2,37)		
	$\bar{D}$	3,690 ± 0,920	1,898 ± 0,647*	(1,94)		
Secuencia 5-FU post-	SF2	0,799 ± 0,208			0,360 ± 0,250*	(2,22)
	$\bar{D}$	3,309 ± 0,807			1,808 ± 1,046	(1,83)
<b>Supervivencia ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,836 ± 0,080	0,779 ± 0,178	(1,07)	0,872 ± 0,178	(0,95)
	$\bar{D}$	3,563 ± 0,272	3,500 ± 0,337	(1,02)	3,384 ± 0,806	(1,05)
Experimentos en i. continua Secuencia 5-FU pre-	SF2	0,937 ± 0,151	0,771 ± 0,175	(1,21)		
	$\bar{D}$	3,690 ± 0,920	3,463 ± 0,817	(1,06)		
Secuencia 5-FU post-	SF2	0,799 ± 0,208			<b>0,435 ± 0,115*</b>	<b>(1,83)</b>
	$\bar{D}$	3,309 ± 0,807			<b>2,309 ± 0,269*</b>	<b>(1,43)</b>

\*:  $P < 0,05$  vs irradiación sola, En cursiva y negrita, diferencias significativas a pesar del ajuste por el efecto del 5-FU  
Resultados experimentales sin corrección de la multiplicidad celular

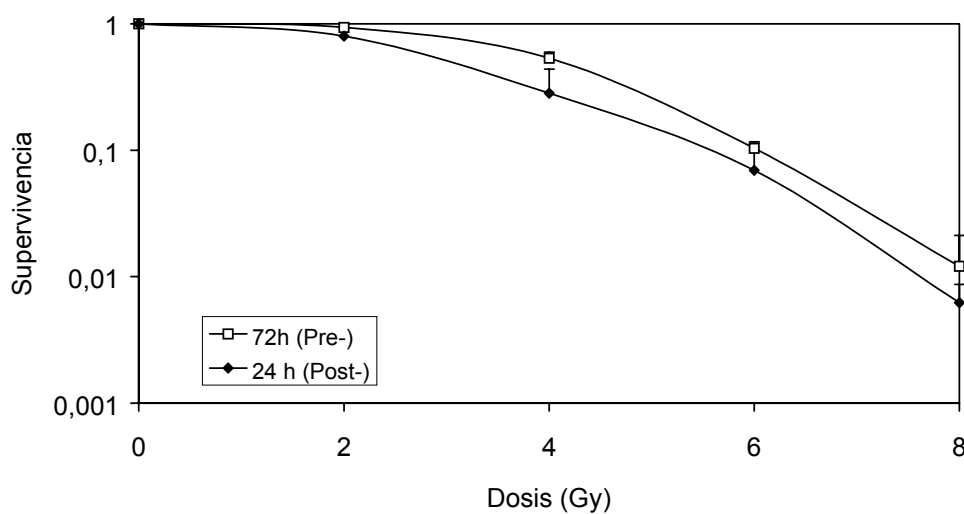
---

## I) INFLUENCIA DE LA CORRECCIÓN POR LA MULTIPLICIDAD CELULAR SOBRE LA MODULACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD POR EL 5-FU EN LAS CÉLULAS HCT-15

Dado que la multiplicidad pudo influir en la radiosensibilidad de las células HCT-15 en los experimentos de tratamiento combinado, se estudió, al igual que en la línea MIA PaCa-2, el efecto de la proliferación en estos experimentos. En los experimentos de incubación continua, las células HCT-15 se irradiaron a las 24 h de haber sido sembradas en la secuencia de 5-FU post-irradiación y a las 72 h en la secuencia de 5-FU pre-irradiación. A las 24 h de la siembra la  $\bar{n}$  fue de 1,8 y a las 72 h fue de 6,2 (Figura 39). La  $\bar{n}$  determinada 2 horas después de la siembra de las células HCT-15 aisladas fue de 1,05.

Las células irradiadas a las 72 horas expresaron una radiosensibilidad inferior a la expresada por las células irradiadas a las 24 horas. La SF2 tras la irradiación, administrada según la secuencia 5-FU pre- y la 5-FU post- fue de 0,937 y de 0,799 , respectivamente ( $p = 0,288$ ). La  $\bar{D}$  fue 3,69 y 3,309, respectivamente ( $p = 0,773$ ) (Figura 46 y Tabla 9). En la línea HCT-15, la proliferación causó una pérdida de radiosensibilidad, aunque desde un punto de vista estadístico no fue significativa.

A continuación, se estudió si la corrección por la multiplicidad según el método de Gerweck tuvo alguna influencia sobre el patrón de la modulación de la radiosensibilidad de la línea HCT-15 por el 5-FU.



**Figura 46. Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas a las 24 o 72 horas de la siembra.**

*Representación de las curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas según el esquema de incubación continua. No se administró 5-FU. La desviación estándar está representada por las hemibarras positivas. Las diferencias entre ambas curvas no fueron estadísticamente significativas.*

La corrección por la multiplicidad no influyó sobre el patrón de la modulación de la radiosensibilidad por el 5-FU administrado en bolus o en incubación continua (Tablas 9 y 10). En cambio, cuando se ajustó por el 5-FU, tanto en la secuencia de 5-FU pre- como en la de 5-FU post-, no se observó un aumento de la radiosensibilidad al añadir 5-FU en incubación continua a la radiación. Por tanto, la corrección por la multiplicidad evidenció que no existió radiosensibilización por 5-FU en las células HCT-15.

**Tabla 10.** Efecto del 5-FU administrado en bolus o en incubación continua, antes o después de la irradiación, sobre la supervivencia celular tras 2 Gy (SF2) y la dosis media de inactivación ( $\bar{D}$ ) en las células HCT-15

		Irradiación sola	+ 5-FU pre-rt	(Factor)	+ 5-FU post-rt	(Factor)
<b>Supervivencia no ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,498 ± 0,086	0,344 ± 0,038*	(1,44)	0,384 ± 0,038	(1,29)
	$\bar{D}$	2,522 ± 0,365	1,906 ± 0,130*	(1,32)	1,775 ± 0,215*	(1,42)
Experimentos en i. continua Secuencia 5-FU pre-	SF2	0,194 ± 0,051	0,071 ± 0,029*	(2,73)		
	$\bar{D}$	1,523 ± 0,201	0,797 ± 0,256*	(1,91)		
Secuencia 5-FUpost-	SF2	0,475 ± 0,122			0,207 ± 0,145*	(2,22)
	$\bar{D}$	2,352 ± 0,470			1,358 ± 0,765	(1,73)
<b>Supervivencia ajustada por el efecto del 5-FU</b>						
Experimentos en bolus	SF2	0,498 ± 0,086	0,436 ± 0,077	(1,14)	0,498 ± 0,135	(1,00)
	$\bar{D}$	2,522 ± 0,365	2,390 ± 0,225	(1,05)	2,348 ± 0,261	(1,07)
Experimentos en i. continua Secuencia 5-FU pre-	SF2	0,194 ± 0,051	0,201 ± 0,146	(0,96)		
	$\bar{D}$	1,523 ± 0,201	1,642 ± 0,373	(0,93)		
Secuencia 5-FUpost-	SF2	0,475 ± 0,122			0,405 ± 0,322	(1,17)
	$\bar{D}$	2,352 ± 0,470			2,134 ± 0,714	(1,10)

\*:  $P < 0,05$  vs irradiación sola

Resultados experimentales con corrección de la multiplicidad celular