

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**ANÁLISIS DE LA RADIOSENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS
TUMORALES PANCREÁTICAS HUMANAS Y SU
MODULACIÓN POR 5-FLUOROURACILO**

Tesis presentada por Josep Balart Serra para optar al grado de Doctor en Medicina
y Cirugía

Directores: Dr. Gabriel Capella Munar y Dr. Jordi Craven-Bartle Lamote de Grignon

Tutor: Prof. Ignasi Carrió Gasset

Barcelona, Mayo de 2001

*Als meus Pares, que tant s'han sacrificat
pels seus fills.*

*A la Rosa Maria, l'Elisabet i la Laia, que
durant més temps del que jo hauria volgut,
m'han vist dedicat a aquesta memòria.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Capellà Munar, director del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Oncología Médica del Institut Català d'Oncologia, codirector de tesis, que desde siempre ha estado a mi lado, desde el nacimiento de las primeras ideas hasta la redacción de la última línea de esta memoria. Por su amistad, generosidad y ejemplo.

Al Dr. Jordi Craven-Bartle Lamote de Grignon, director del Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital de la Santa Creu y Sant Pau, codirector de tesis, que me ha apoyado a lo largo de estos años, por su experiencia y dirección de esta memoria.

Al Dr. Ignasi Carrió Gasset, catedrático de Medicina Nuclear de la Universidad Autónoma de Barcelona, tutor de tesis, por sus consejos en la preparación de esta memoria.

A Rosa Maria de los Inocentes Boix, que llevó a cabo muchos de los experimentos. Por su paciencia cuando debíamos volver a empezar "aquel experimento que no salió bien", por su complicidad y constante apoyo, día a día, más allá del trabajo, como investigadora, compañera y esposa.

A Carmen Ares Molina, que durante el último año de médico residente de Oncología Radioterápica realizó una parte importante de los experimentos *in vitro* e *in vivo*, tiempo en el que demostró una gran capacidad de trabajo y de investigación en el laboratorio.

Al Dr. Félix Lluís Casajuana, director del Laboratorio de Investigación Gastrointestinal, que nos dio la oportunidad de crear un equipo investigador en radiobiología y que en todo momento alentó nuestros proyectos.

Al Laboratorio de Investigación Gastrointestinal, a todos con los que compartimos ilusiones y desengaños.

Al Servicio de Oncología Radioterápica, médicos adjuntos, residentes, enfermeros y técnicos, sin los que no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al Servicio de Radiofísica y Radioprotección, dirigido por la Dra. Montserrat Ribas Morales, por su soporte en los aspectos físicos y dosimétricos requeridos en los experimentos.

A los pacientes, que dan sentido a los esfuerzos realizados.

A todas aquellas personas que de alguna forma han participado en que esta memoria fuera una realidad.

BECAS Y SUBVENCIONES

La presente Memoria ha sido parcialmente subvencionada por:

- * Fondo de Investigaciones Sanitarias de España (94/0896).
- * Junta Provincial de Barcelona de la Asociación Española Contra el Cáncer.
- * Marató de TV3-1994 "El Càncer es pot curar".

1.- PRÓLOGO	1
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	3
3.- INTRODUCCIÓN	4
3.1.- Anatomía del páncreas	4
3.2.- Fisiología del páncreas	8
3.3.- Patología del cáncer de páncreas	9
3.3.1.- Lesiones premalignas y progresión tumoral.....	9
3.3.2.- Tumores benignos.....	9
3.3.3.- Tumores malignos.....	10
3.4.- Hormonas y factores que regulan el crecimiento del páncreas.....	10
3.5.- Oncogenes y genes supresores tumorales.....	11
3.6.- Factores etiológicos del cáncer de páncreas	11
3.6.1.- Factores ambientales.....	11
3.6.2.- Enfermedades previas del páncreas	12
3.6.3.- Herencia	13
3.7.- Cuadro clínico e historia natural del cáncer de páncreas	14
3.8.- Diagnóstico y estudio de extensión del cáncer de páncreas.....	15
3.9.- Tratamiento del cáncer de páncreas	17
3.10.- Radioterapia externa en el cáncer de páncreas	20
3.11.- Resultados del tratamiento del cáncer de páncreas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau	23
3.12.- Radiobiología.....	24
3.12.1.- Física y química de la absorción de las radiaciones	24
3.12.2.- El ADN es la diana biológica de las radiaciones ionizantes.....	26
3.12.3.- Integridad reproductiva y muerte celular.....	26
3.12.4.- Teoría clonal del cáncer y unidades formadoras de colonias	27
3.12.5.- Ensayo de clonogenicidad	27
3.12.6.- Curvas de supervivencia celular <i>in vitro</i>	31
3.12.6.1.- Representación gráfica de la supervivencia celular	31
3.12.6.2.- Funciones matemáticas para la supervivencia celular.....	33
3.12.7.- Modelo lineal-cuadrático (α / β)	34
3.12.8.- Radiosensibilidad celular intrínseca (SF2 y \bar{D}).....	36
3.12.9.- Factores que modifican la radiosensibilidad	37
3.13.- Modulación de la radiosensibilidad por citostáticos	40
3.13.1.- Estrategias para optimizar la combinación de quimio y radioterapia.....	40
3.13.2.- Mecanismos potenciales de radiosensibilización	41
3.13.3.- Evaluación experimental de la modulación de la radiosensibilidad mediada por citostáticos.....	44
3.13.4.- Terminología	44
3.14.- Interacción del 5-Fluorouracilo con la radiación.....	46
3.14.1.- Farmacocinética del 5-FU	46
3.14.2.- Mecanismo de acción del 5-FU.....	48
3.14.3.- Efecto del 5-FU.....	50
3.14.4.- Mecanismos de interacción del 5-FU con la radiación.....	51
3.14.5.- Estudios clínicos con 5-FU y radioterapia concomitante.....	54

4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
A) EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	55
4.1.- Equipamiento del Laboratorio de Investigación Gastrointestinal.....	55
4.2.- Células	56
4.2.1.- Células MIA PaCa-2	56
4.2.2.- Células PANC-1.....	56
4.2.3.- Células NP18	58
4.2.4.- Células HCT-15	58
4.3.- Condiciones de cultivo de las células	58
4.4.- Curvas de crecimiento celular.....	59
4.5.- Disgregación de la monocapa celular	59
4.6.- Criopreservación de las células	62
4.7.- Ensayo de clonogenicidad	62
4.7.1.- Preparación de las células	62
4.7.1.1.- Células aisladas.....	63
4.7.1.2.- Células en monocapa.....	63
4.7.2.- Tratamiento.....	65
4.7.2.1.- Irradiación de las células	65
4.7.2.2.- 5-Fluorouracilo	66
4.7.3.- Recuento de colonias y determinación de la supervivencia celular.....	67
4.8.- Tratamientos realizados.....	67
4.9.- Cuantificación de la radiosensibilidad.....	68
4.9.1. -Determinación de alfa y beta.....	68
4.10.- Corrección de la radiosensibilidad debido a la multiplicidad celular.....	68
4.11.- Cuantificación del efecto del 5-FU	70
4.12.- Ajuste por el efecto del 5-FU	70
4.13.- Radiosensibilización.....	71
B) EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	72
4.14.- Animales y estabulación	72
4.15.- Crecimiento tumoral	72
4.16.- Irradiación de los tumores.....	73
4.17.- Administración de 5-FU.....	73
4.18.- Efecto antitumoral	73
C) PROCESO DE DATOS Y ESTADÍSTICA.....	75
5.- RESULTADOS.....	76
A) CRECIMIENTO TUMORAL.....	76
5.1.- Formación de colonias	76
5.2.- Crecimiento celular.....	76
5.3.- Tumorigenicidad	78

B) RADIOSENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i>	79
5.4.- Radiosensibilidad de la línea MIA PaCa-2	79
5.4.1.- Células aisladas	79
5.4.2.- Células en monocapa	80
5.5.- Radiosensibilidad de la línea PANC-1	81
5.5.1.- Células aisladas	81
5.5.2.- Células en monocapa	82
5.6.- Radiosensibilidad de la línea NP-18	84
5.7.- Radiosensibilidad de la línea HCT-15	85
5.7.1.- Células aisladas	85
5.7.2.- Células en monocapa	86
C) RADIOSENSIBILIDAD <i>IN VIVO</i>	89
5.8.- Xenotrasplante MIA PaCa-2	89
5.9.- Xenotrasplante HCT-15	89
D) SENSIBILIDAD AL 5-FU <i>IN VITRO</i>	92
5.10.- Células MIA PaCa-2	92
5.11.- Células PANC-1 y NP-18	94
5.12.- Células HCT-15	95
E) SENSIBILIDAD AL 5-FU <i>IN VIVO</i>	96
5.13.- Xenotrasplante MIA PaCa-2	96
5.14.- Xenotrasplante HCT-15	97
F) EFECTO DEL 5-FU SOBRE LA RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR MIA PACA-2	99
5.15.- Administración de 5-FU en bolus	99
5.16.- Administración de 5-FU en incubación continua	102
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	106
5.17.- Administración de 5-FU en bolus	107
5.18.- Administración de 5-FU en incubación continua	109
H) EFECTO DEL 5-FU SOBRE LA RADIOSENSIBILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR HCT-15	110
5.19.- Administración de 5-FU en bolus	110
5.20.- Administración de 5-FU en incubación continua	114
I) INFLUENCIA DE LA CORRECCIÓN POR LA MULTIPLICIDAD CELULAR SOBRE LA MODULACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD POR EL 5-FU EN LAS CÉLULAS HCT-15	119

6.- DISCUSIÓN	122
6.1.- ¿Es comparable la radiosensibilidad de las células tumorales pancreáticas humanas a la de otros tumores radiosensibles?	122
6.2.- ¿Podría la corrección por la multiplicidad modificar la valoración sobre la radiosensibilidad de las células estudiadas?.....	128
6.3.- ¿Es comparable la sensibilidad de las células tumorales pancreáticas y la de las células colónicas al 5-FU?.....	131
6.4.- La incubación continua con 5-FU, ¿radiosensibiliza las células tumorales pancreáticas humanas MIA PaCa-2?	132
6.5.- ¿Qué mecanismos de interacción entre 5-FU y radiación pudieron actuar sobre la radiosensibilidad en las células MIA PaCa-2?	134
7.- CONCLUSIONES	136
8.- BIBLIOGRAFÍA	137
9.- ABREVIATURAS.....	149
10.- GLOSARIO	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Arterias de irrigan el páncreas	5
Figura 2.	Vías de drenaje de la secreción exocrina pancreática y relación con los conductos biliares	6
Figura 3.	Ganglios linfáticos del páncreas	7
Figura 4.	Planificación 3D	22
Figura 5.	Mecanismo de acción de las radiaciones ionizantes	25
Figura 6.	Ensayo de clonogenicidad	28
Figura 7.	Representación de una curva de supervivencia <i>in vitro</i> mediante una escala lineal y una escala semilogarítmica	32
Figura 8.	La morfología de las curvas de supervivencia indica la radiosensibilidad de las células	33
Figura 9.	Efecto del ciclo celular sobre la radiosensibilidad	38
Figura 10.	Terminología para describir el tipo de interacción entre la radiación y un agente citostático	45
Figura 11.	Concentración plasmática de 5-FU tras la administración endovenosa en bolus	47
Figura 12.	Metabolismo del 5-FU	49
Figura 13.	Diagrama de una curva de crecimiento celular en cultivo celular	60
Figura 14.	Disgregación de la monocapa celular	61
Figura 15.	Preparación de las células para un ensayo de clonogenicidad (MIA PaCa-2)	64
Figura 16.	Irradiación de las células	66
Figura 17.	Crecimiento tumoral y <i>growth delay</i> tras irradiación	74
Figura 18.	Crecimiento de la células pancreáticas	77
Figura 19.	Curva de radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2	80
Figura 20.	Determinación de alfa y beta en la línea MIA PaCa-2	81
Figura 21.	Curva de radiosensibilidad de las células PANC-1	83
Figura 22.	Determinación de alfa y beta en la línea PANC-1	83
Figura 23.	Curva de radiosensibilidad de las células NP-18	84
Figura 24.	Determinación de alfa y beta en la línea NP-18	85
Figura 25.	Curva de radiosensibilidad de las células HCT-15	87

Figura 26.	Determinación de alfa y beta en la línea HCT-15.....	87
Figura 27.	Radiosensibilidad del xenotrasplante MIA PaCa-2	90
Figura 28.	Radiosensibilidad del xenotrasplante HCT-15.....	90
Figura 29.	Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 tratadas con 5-FU en bolus	93
Figura 30.	Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 tratadas con 5-FU en incubación continua	94
Figura 31.	Quimiosensibilidad del xenotrasplante MIA PaCa-2	97
Figura 32.	Quimiosensibilidad del xenotrasplante HCT-15	98
Figura 33.	Protocolo de los experimentos de tratamiento combinado de las células MIA PaCa-2.....	100
Figura 34.	Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas tratadas con 5-FU en bolus	101
Figura 35.	Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas tratadas con 5-FU en bolus. Ajuste por el efecto del 5-FU.....	101
Figura 36.	Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua.....	103
Figura 37.	Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua. Ajuste por el efecto del 5-FU.....	103
Figura 38.	Curvas de supervivencia de las células MIA PaCa-2 irradiadas a las 50,5 o 98 horas de la siembra.....	107
Figura 39.	Protocolo de los experimentos de tratamiento combinado de las células HCT-15	112
Figura 40.	Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en bolus	113
Figura 41.	Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en bolus. Ajuste por el efecto del 5-FU.....	113
Figura 42.	Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua según la secuencia 5-FU pre-	115
Figura 43.	Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua según la secuencia 5-FU pre-. Ajuste por el efecto del 5-FU	115
Figura 44.	Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua según la secuencia 5-FU post-.....	116
Figura 45.	Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas tratadas con 5-FU en incubación continua según la secuencia 5-FU post-. Ajuste por el efecto del 5-FU.....	116
Figura 46.	Curvas de supervivencia de las células HCT-15 irradiadas a las 24 o 72 horas de la siembra	120
Figura 47.	Influencia de la multiplicidad celular sobre la radiosensibilidad	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características de las células	57
Tabla 2.	Número de células utilizado por experimento.....	64
Tabla 3.	Crecimiento de las células MIA PaCa-2, PANC-1, NP-18 y HCT-15.....	77
Tabla 4.	Radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2, PANC-1, NP-18 y HCT-15.....	88
Tabla 5.	Efecto antitumoral de la irradiación sobre los xenotrasplantes MIA PaCa-2 y HCT-15.....	91
Tabla 6.	Efecto antitumoral del 5-FU sobre los xenotrasplantes MIA PaCa-2 y HCT-15.....	98
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 y la dosis media de inactivación en las células MIA PaCa-2.....	105
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 y la dosis media de inactivación en las células MIA PaCa-2. Corrección por la multiplicidad.....	108
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 y la dosis media de inactivación en las células HCT-15.....	118
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 y la dosis media de inactivación en las células HCT-15. Corrección por la multiplicidad.....	121
Tabla 11.	Radiosensibilidad <i>in vitro</i> de 59 líneas tumorales humanas	124
Tabla 12.	Comparación de la radiosensibilidad de las células pancreáticas y de las células HCT-15 según el método de irradiación	125
Tabla 13.	Radiosensibilidad de las células pancreáticas y de las células de colon irradiadas en monocapa.....	127

1.- PRÓLOGO

El cáncer de páncreas es un problema sanitario importante en el mundo occidental. Con una incidencia en aumento, constituye la cuarta causa de muerte por cáncer. En España la incidencia global es de 5,3/100.000 habitantes año. Dado el mal pronóstico del cáncer de páncreas, la cifra de mortalidad se aproxima a la incidencia de la enfermedad. No existe un diagnóstico precoz y cuando se diagnostica, sólo entre un 10% y un 15% de los pacientes es candidato a una cirugía potencialmente curativa. Sin embargo, únicamente un 20-30 % de estos pacientes seguirán vivos a 5 años, en el mejor de los casos. La infiltración microscópica del retroperitoneo se considera la mayor causa de recurrencia. Por tanto, parece razonable añadir a la cirugía un tratamiento complementario para controlar la enfermedad local (y a distancia). En la década de los años setenta, la radioterapia externa mostró cierto potencial en el cáncer de páncreas. En 1985, el Gastrointestinal Tumor Study Grup (GITSG) publicó un trabajo randomizado en el que la supervivencia aumentó significativamente tras un tratamiento combinado de irradiación y 5-FU. Sin embargo, no ha sido hasta finales de los años noventa que el concepto de tratamiento multidisciplinario ha ganado terreno a la idea ampliamente difundida de la resistencia del cáncer de páncreas a los tratamientos adyuvantes. Si bien existe en la actualidad un volumen importante de trabajos destinados a estudiar, y que avalan, los beneficios de la quimio y radioterapia en el cáncer de páncreas, no existen estudios en los que se evalúe la radiosensibilidad de las células pancreáticas y su modulación por 5-FU.

El objetivo de este trabajo fue examinar el efecto de la irradiación por sí misma y en combinación con 5-FU en distintas líneas celulares tumorales pancreáticas humanas en cultivo y en animales.

A pesar de las limitaciones que hay que imponer a los hallazgos procedentes del laboratorio para aplicarlos a la clínica, el análisis de las hipótesis planteadas puede ser una aportación significativa para establecer más bases racionales en el tratamiento del cáncer de páncreas.

2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Las hipótesis de trabajo fueron las siguientes:

- 1) Las células tumorales pancreáticas humanas podrían ser tan radiosensibles como las células de otros tumores, como por ejemplo las de colon, que habitualmente se tratan con radioterapia.
- 2) El 5-FU podría aumentar la eficacia antitumoral de la radiación sobre las células tumorales pancreáticas humanas.
- 3) El protocolo de administración del 5-FU podría influir en la radiosensibilidad de las células tumorales pancreáticas.

El objetivo principal de la tesis fue evaluar la radiosensibilidad de distintas líneas celulares tumorales pancreáticas humanas y determinar la influencia del tratamiento simultáneo con 5-fluorouracilo administrado en diferentes modalidades.