

3.11.- RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS EN EL HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU

Los resultados del tratamiento del cáncer de páncreas en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau se han publicado recientemente [Boadas, 2000]. Se revisaron 167 historias clínicas de pacientes diagnosticados entre 1987 y 1993. Del total de 167 pacientes, 111 fueron sometidos a una intervención quirúrgica y de ellos 11 fueron resecados con intención radical, aunque finalmente sólo en un 55 % la cirugía fue con márgenes negativos. La supervivencia mediana del total de pacientes fue de 3 meses; la de los 11 pacientes resecados fue de 12 meses. Sólo un 3% de los pacientes fue tratado con radioterapia.

A partir de 1993, el tratamiento con radioterapia se consideró indicado en un mayor número de pacientes. Entre 1993 y 1999 se trataron 21 pacientes con radioterapia y 5-FU a los que previamente se había resecado un neoplasia de páncreas con intención radical, aunque sólo en un 28 % los márgenes quirúrgicos fueron negativos. La supervivencia mediana fue de 18 meses, seis meses más que la serie de 1987 a 1993. A pesar de que las características de los pacientes de ambas series es parecida, no es correcto comparar los resultados. Sin embargo, hay que notar el incremento de la supervivencia en el último período sin una toxicidad significativa (en el peor de los casos se observó un 16 % de mucositis grado 3 de la OMS).

3.12.- RADIOBIOLOGÍA

3.12.1.- Física y química de la absorción de las radiaciones

Una radiación es una forma de energía que se propaga en el vacío sin necesidad de un medio material que la soporte. La absorción por la materia de una radiación puede producir excitaciones e ionizaciones. La elevación de un electrón a un nivel energético superior sin que salga fuera del átomo al que pertenece produce una excitación. Si la radiación es suficientemente energética para eyeccionar uno o más electrones fuera de un átomo o molécula se produce una ionización [Dutreix, 1980].

Las radiaciones ionizantes provocan en la materia viva cambios químicos principalmente a través de la rotura de enlaces covalentes y de la formación de radicales libres, pudiendo afectar cualquier tipo de molécula de una célula. Sin embargo, el daño molecular producido en el ADN es el que tiene la mayor trascendencia biológica [Tubiana, 1986].

Una radiación ionizante puede interaccionar con el ADN a través de dos mecanismos: directo e indirecto. En el mecanismo de acción directo, la primera molécula que absorbe la radiación es el ADN. En el mecanismo de acción indirecto, el agua absorbe la radiación, tras lo que se forman radicales libres, especies químicas altamente reactivas, que pueden llegar a reaccionar con la molécula de ADN dando lugar a cambios químicos, indistinguibles de la acción directa. Este fenómeno se conoce como radiolisis. Al ser el agua el componente más abundante de las células, el mecanismo de acción indirecto es cuantitativamente más importante que el directo (Figura 5).

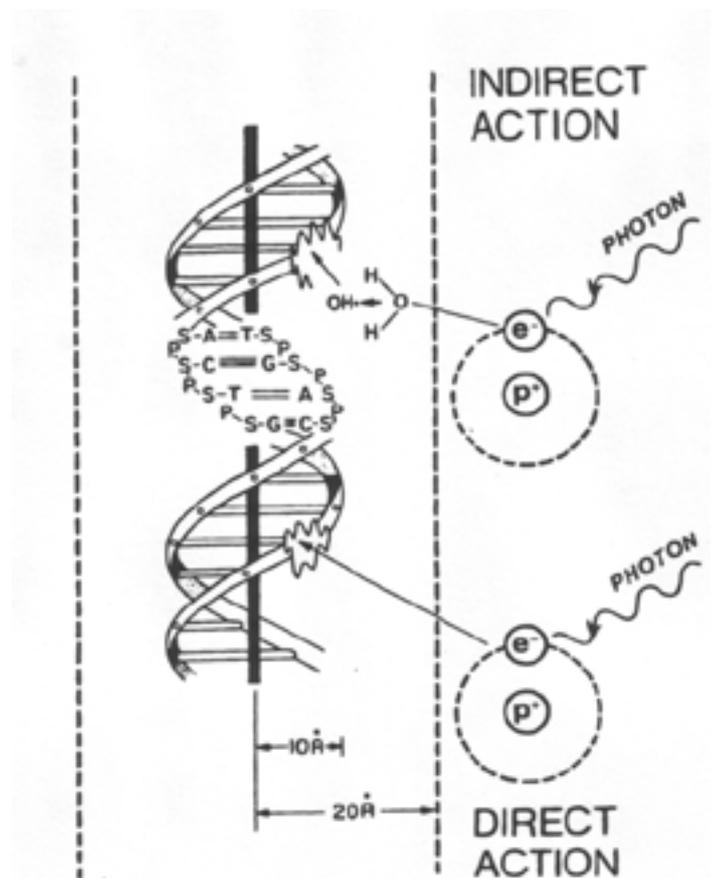


Figura 5. Mecanismo de acción de las radiaciones ionizantes

Se muestra la estructura del ADN formada por una doble hélice, las letras S, P, A, T, G y C representan, respectivamente, azúcar, fósforo, adenina, timidina, guanina y citosina. **Acción directa:** un electrón secundario resultante de la absorción de un fotón interacciona con el ADN alterando su estructura química. **Acción indirecta:** un electrón secundario interacciona con una molécula de agua dando lugar a un radical libre OH·, que a su vez reacciona con el ADN y altera su estructura. Se considera que los radicales generados dentro de un espacio cilíndrico de 20 Å alrededor del ADN pueden alcanzarlo [Hall, 1988].

3.12.2.- El ADN es la diana biológica de las radiaciones ionizantes

El daño radioinducido en el ADN es el que tiene una mayor trascendencia biológica puesto que el ADN es la molécula encargada de guardar la información necesaria para el funcionamiento de las células y de transmitir esta información a su descendencia. Actualmente, existen muchas evidencias de que el ADN es la diana biológica de la radiación. Las células mueren tras la administración de timidina tritiada que se incorpora exclusivamente al ADN. Las pirimidinas halogenadas, que se intercalan en el ADN durante su síntesis, aumentan la radiosensibilidad celular. Por contra, el tratamiento de las células con nucleótidos que no se incorporan al ADN no modifica la radiosensibilidad. Los mismos factores que modifican la cantidad y calidad de lesiones cromosómicas inducidas por las radiaciones ionizantes son los que modulan, siempre en el mismo sentido, la radiosensibilidad celular [Trevor, 1993].

Los cambios que las radiaciones ionizantes producen en el ADN, ordenadas según el grado de trascendencia biológica, son los siguientes: a) cambio o pérdida de una base nitrogenada; b) ruptura de los puentes de hidrógeno entre bases complementarias; c) roturas simples (de una de las dos hebras de la cadena de ADN); d) roturas dobles (de las dos hebras de la cadena de ADN) y e) LMDS. Las roturas dobles y las LMDS son las lesiones más difíciles de reparar y cuyo efecto biológico puede ser mayor. La mayoría de lesiones que afectan a las bases nitrogenadas, los puentes de hidrógeno y las roturas simples de la cadena de ADN son reparadas.

3.12.3.- Integridad reproductiva y muerte celular

El daño biológico causado por las radiaciones ionizantes en el ADN puede provocar la muerte de una célula. Es importante resaltar que el concepto de muerte celular realmente relevante para el tratamiento del cáncer es la eliminación de la

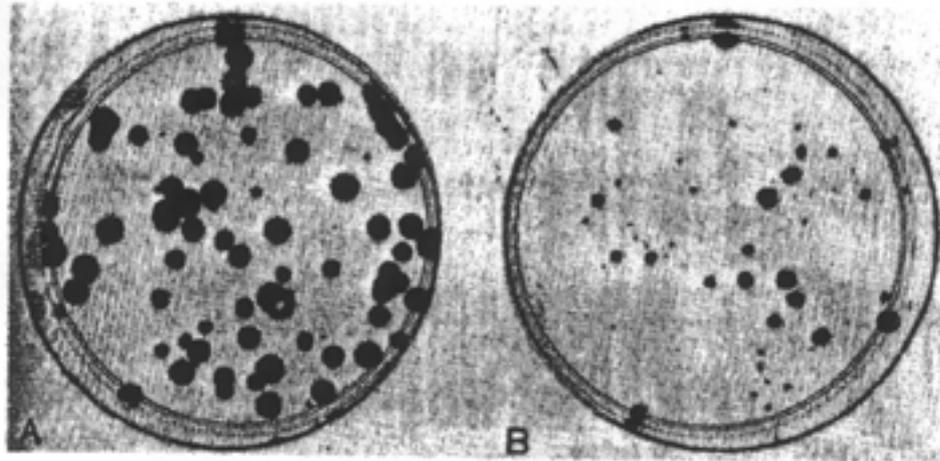
integridad reproductiva de las células tumorales, aunque su aspecto y sus funciones metabólicas sigan estables durante cierto tiempo. En definitiva, la pérdida de la capacidad reproductiva equivale a muerte celular.

3.12.4.- Teoría clonal del cáncer y unidades formadoras de colonias

Se considera que el cáncer es la consecuencia de la expansión incontrolada de una estirpe o clona celular [Novell, 1960; Fialkow, 1976]. Por definición, toda célula clonogénica es a su vez potencialmente una CFU puesto que, mediante sucesivas mitosis, podrá generar una familia de células o colonia [Elkind, 1967]. Una de las áreas de interés de la radiobiología es el estudio de la muerte celular entendida como la pérdida de capacidad reproductiva de una CFU, ya que la curación del cáncer depende de la inactivación de CFU tumorales.

3.12.5.- Ensayo de clonogenicidad

El ensayo de clonogenicidad (o clonogénico) es un método experimental *in vitro* que se emplea para medir la sensibilidad celular ante un agente citotóxico. Consiste en determinar en qué proporción disminuye la capacidad clonogénica de una población celular después de una exposición a dicho agente. Las células que tras un tratamiento son capaces de formar colonias se denominan células supervivientes (conservan su integridad reproductiva) y la proporción de células supervivientes se llama fracción de supervivencia o superviviente (Figura 6)

**Figura 6. Ensayo de clonogenicidad**

En ambos discos se observan colonias, sin embargo son distintas en tamaño y cantidad. El disco de la izquierda no ha sido tratado. Las colonias de la derecha son las supervivientes a un tratamiento. Se puede calcular la fracción superviviente mediante la siguiente igualdad [Hall, 1988].

$$FS = \text{\#colonias supervivientes} / \text{\#colonias control}$$

En 1957 Puck y Markus obtuvieron las primeras curvas de supervivencia celular frente a la radiación. La cuantificación de la tasa de supervivencia celular tras una dosis de radiación se realizó aplicando los métodos de clonación similares a los empleados en microbiología. El ensayo de clonogenicidad se mejoró técnicamente y se convirtió en un método simple, rápido, reproducible y relativamente barato por lo que es el más empleado para determinar la radiosensibilidad celular de células tumorales y no tumorales [Fertil, 1981].

El ensayo de clonogenicidad permite cuantificar la tasa de supervivencia celular tras una dosis de radiación. La radiosensibilidad celular evaluada a través del método de clonogenicidad se relaciona significativamente con el número de roturas inducidas en el ADN tras irradiar células *in vitro*, lo que refuerza la relación entre la integridad y el daño genético [Ruíz de Almodovar, 1994].

A partir de un ensayo de clonogenicidad se puede establecer una relación dosis-respuesta o curva de supervivencia celular. La comparación de curvas de supervivencia obtenidas mediante ensayos de clonogenicidad según distintas condiciones experimentales ha permitido conocer una buena parte de los principios de la radioterapia actual. Entre ellos, el efecto radiosensibilizante del oxígeno, la reparación celular del daño subletal, la diferente radiosensibilidad celular durante las fases del ciclo celular y el efecto de los radiosensibilizadores [Barendsen, 1987].

Diversos factores experimentales o técnicos influyen en la determinación de la radiosensibilidad celular por el método del ensayo de clonogenicidad.

Disgregación. El proceso de disgregación necesario para obtener células aisladas sea mecánico o enzimático puede alterar en gran medida la sensibilidad a la radiación [Awwad, 1990-a].

Superficie. La superficie sobre la que crecen las células en cultivo. La radiosensibilidad de las células varía según la superficie de crecimiento [Yohem, 1988]. Las células que requieren agar blando como superficie de crecimiento son más radiosensibles que las que crecen en monocapa sobre plástico [Deschavanne, 1995].

Células de soporte o feeder cells. La utilización de células de soporte modifica la radiosensibilidad. La presencia de *feeder cells* puede estimular el crecimiento de las células a las que son añadidas. Se ha observado que la adición de *feeder cells* se caracteriza por un incremento de la radiorresistencia, sobre todo entre 0 y 8 Gy, que se manifiesta en un aumento del hombro de la curva de supervivencia [Wells, 1980].

Edad del cultivo. Es el tiempo transcurrido desde la siembra de un subcultivo. Teniendo en cuenta que la radiosensibilidad celular varía a lo largo del ciclo celular, puede esperarse que la radiosensibilidad de una población celular se modifique según el tiempo transcurrido desde la siembra del subcultivo [Sinclair, 1966].

El procedimiento experimental. La irradiación de las células antes o después de la disgregación y el intervalo entre la disgregación y la irradiación también puede modificar la radiosensibilidad [Reddy, 1989]. Por ejemplo, la reparación del ADN puede inhibirse con la disgregación de un subcultivo y por ello aumentar la radiosensibilidad.

Multiplicidad. Es el incremento de células que ocurre entre la siembra y la administración de la radiación (ñ), influye en la evaluación de la radiosensibilidad. La ñ tiende a disminuir la radiosensibilidad [Gerweck, 1994-b].

Definición de colonia. En general se define como colonia la agrupación de células visible a simple vista. Está constituida por 50 o más células. Sin embargo, el grado de subjetividad en el recuento de colonias puede influir en la evaluación de la radiosensibilidad.

Condiciones de la irradiación. El ambiente que rodea las células influye en la radiosensibilidad. La concentración de oxígeno, el pH y temperatura del medio, la forma de administración de la radiación, etc. son aspectos que también deben ser controlados.

A pesar de la variabilidad introducida por todos estos aspectos en la evaluación de la radiosensibilidad celular, múltiples estudios y revisiones de la literatura avalan la relación entre la radiosensibilidad mostrada *in vitro* en un ensayo de clonogenicidad y la radiocurabilidad de determinados tumores [West, 1992; Deacon, 1994; Gerweck, 1994-a; Deschavanne, 1996; Johansen, 1996].

3.12.6.- Curvas de supervivencia celular *in vitro*

Mediante el método clonogénico es posible determinar experimentalmente el efecto de la radiación sobre la capacidad clonogénica en unas determinadas condiciones. Se puede establecer así una relación entre la dosis y el efecto. Una curva de supervivencia es la representación gráfica de esta relación. Las curvas de supervivencia permiten de forma visual comparar la respuesta a la radiación y evaluar la modulación de la radiosensibilidad celular.

3.12.6.1.- Representación gráfica de la supervivencia celular

La representación gráfica de la supervivencia celular se realiza sobre un eje cartesiano en el que la variable independiente, dosis, se inscribe en el eje de las abscisas en una escala lineal y la variable dependiente, supervivencia, se inscribe en el eje de las ordenadas en escala logarítmica (en base diez). La representación semilogarítmica permite evaluar mejor las variaciones de radiosensibilidad. Dado que la supervivencia celular se ajusta a una función exponencial, al representarla sobre un eje en escala logarítmica, se convierte en un línea recta. Con una representación semilogarítmica se pueden observar mejor las diferencias de radiosensibilidad en el dominio de las dosis bajas (pendiente inicial u hombro de las curvas). Además, se puede estudiar el trazo de la curva cuando las dosis de radiación son altas (Figura 7).

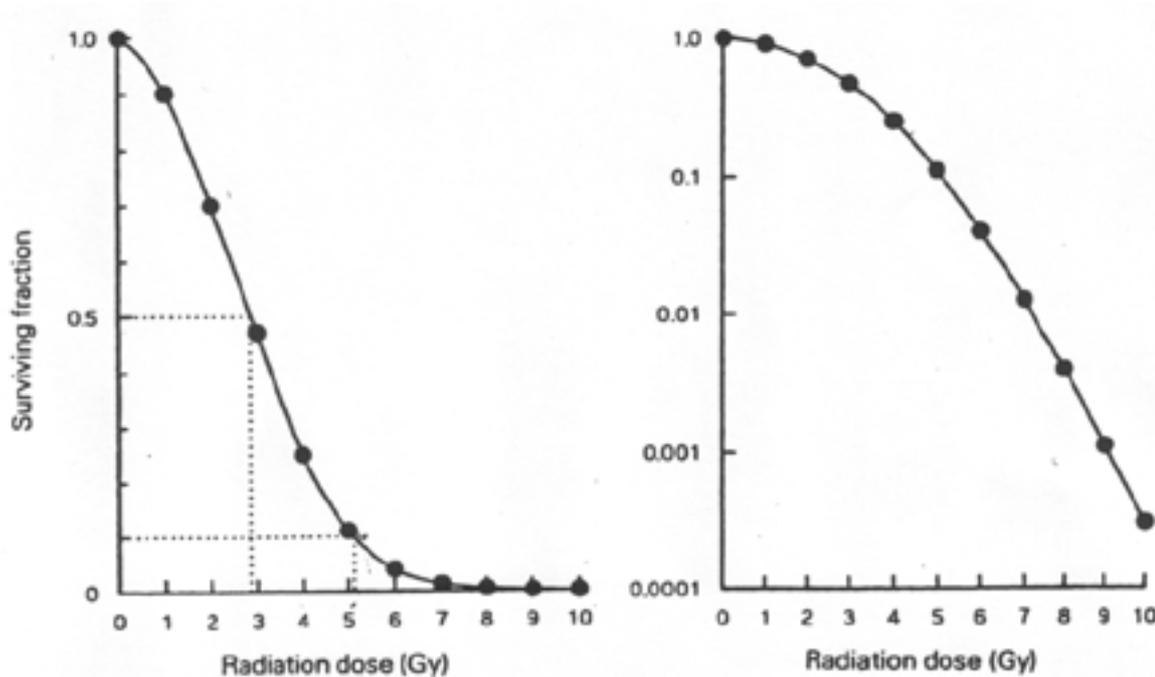


Figura 7. Representación de una curva de supervivencia *in vitro* mediante una escala lineal o una escala semilogarítmica

En la curva de la izquierda se ha representado la supervivencia en escala lineal. A la derecha los mismos datos se han representado en una escala semilogarítmica. Se observa que, en la derecha, a dosis altas, el trazo de la supervivencia puede estudiarse con más detalle que en la representación lineal, en la que el trazo de la función se hace asintótico. Además, el grado de radiosensibilidad a bajas dosis se puede observar en el tamaño del hombro de la curva de supervivencia en escala semilogarítmica [Steel, 1993-a].

La morfología de las curvas de supervivencia en células de mamífero se caracteriza por tener una parte de inclinación inicial, más o menos larga, seguida por una porción rectilínea (exponencial). La primera parte de la curva, conocida con el nombre de hombro, se interpreta como una región en la cual no se produce un incremento exponencial de la muerte celular, en este nivel de dosis la célula repara parcialmente el daño biológico causado por la radiación. A medida que aumenta la dosis, el daño se acumula y la inactivación celular se incrementa exponencialmente. A mayor pendiente y menor hombro, mayor es la radiosensibilidad de las células (Figura 8).

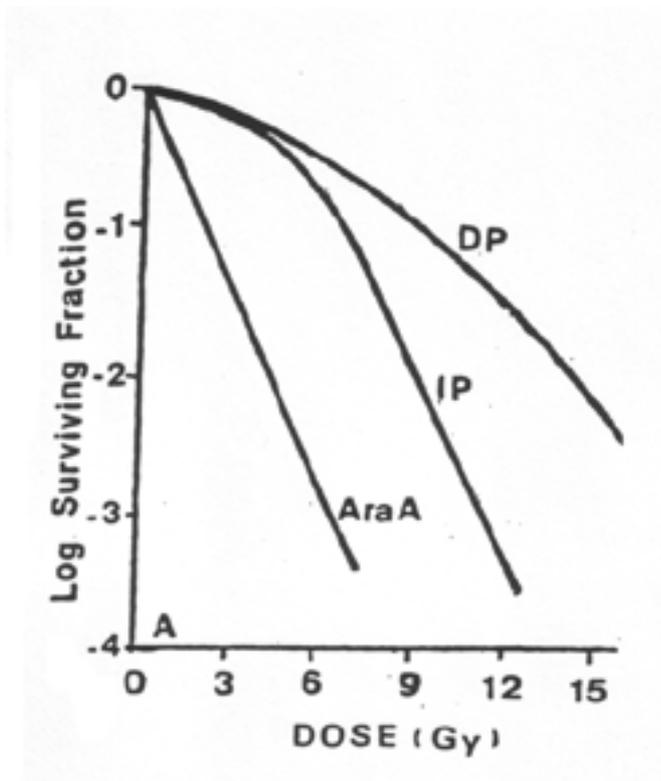


Figura 8. La morfología de las curvas de supervivencia indica la radiosensibilidad de las células
 Las curvas de supervivencia de la gráfica pertenecen a las mismas células irradiadas bajo distintas condiciones. **DP**: las células se sembraron dejando reparar el daño potencialmente letal. **IP**: las células se sembraron inmediatamente tras la irradiación, impidiendo de este modo una reparación completa del ADN. **Ara A**: las células se trataron con arabinósido de adenina, lo que inhibió completamente la reparación. La radiosensibilidad fue mayor tras Ara A [Awwad, 1990-a].

3.12.6.2.- Funciones matemáticas para la supervivencia celular

En los años sesenta, con el desarrollo del método clonogénico, se obtuvo abundante información sobre la radiosensibilidad de distintas células de mamífero. La forma exponencial, más o menos parecida, de la mayoría de curvas de supervivencia sugería que la relación entre la dosis y la supervivencia celular obedecía a una explicación biofísica común. Las similitudes observadas entre curvas se empezaron a explicar mediante modelos que integraban la biología y funciones exponenciales. Así, se han descrito distintos modelos, unos basados en el concepto de blanco o diana biológica y otros basados en la reparación del daño celular, que asumen que bien la

muerte celular llega por la inactivación de una única diana biológica o bien por la suma de múltiples efectos subletales. De todos, el más utilizado en la actualidad es el modelo lineal-cuadrático o L-Q de Kellerer y Rossi [Kellerer, 1972].

3.12.7.- Modelo lineal-cuadrático (α/β)

Según el modelo lineal-cuadrático la muerte celular es el resultado de la inactivación una diana (de importancia letal) por una sola interacción (de una vez) o de la inactivación de dos dianas subletales (requiere dos interacciones independientes). La supervivencia celular (S) viene dada por la ecuación L-Q:

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$$

donde D es la dosis y alfa y beta son constantes. Las unidades de las constantes alfa y beta son Gy^{-1} y Gy^{-2} , respectivamente.

El modelo L-Q es ampliamente utilizado hoy en día. Las siguientes observaciones avalan su empleo.

El concepto del modelo L-Q es simple. La muerte celular sería el resultado de la inactivación de una diana biológica (con relevancia para la viabilidad). Esta inactivación se alcanza a través de la suma de dos "componentes", lineal y cuadrático, que no se excluyen mutuamente. El componente lineal representa la dosis necesaria para inactivar dicha diana con una sola interacción, $e^{-(\alpha D)}$. En una curva de supervivencia, α representa la pendiente inicial. La radiosensibilidad será tanto mayor como mayor sea el valor de α . α expresa la susceptibilidad del ADN a la radiación y representaría a las lesiones DBS y LMDS. Este valor se asocia en gran medida a la radiosensibilidad celular, al menos en el rango de las dosis de radiación utilizadas en oncología [Steel, 1989].

El componente cuadrático representa la dosis necesaria para inactivar una diana biológica debido a la acumulación de lesiones subletales, $e^{-(\beta D^2)}$. El sustrato de las lesiones subletales serían los cambios de base y roturas simples de la cadena de ADN. Con el aumento de la dosis, el componente cuadrático va ganando importancia a la vez que se acumulan las lesiones subletales y se saturan los mecanismos de reparación. Al final, la muerte celular llega debido al gran número de lesiones subletales que se han generado que interactúan en el espacio y el tiempo llegando a ser equivalentes a lesiones DBS y LMDS. Cuanto mayor es β , mayor es la capacidad para reparar el daño subletal y mayor es el hombro de la curva de supervivencia. Experimentalmente, se observa la desaparición del hombro de la curva -componente cuadrático- cuando se emplean radiaciones corpusculares, con una gran densidad de ionizaciones en un corto recorrido. En estas circunstancias la probabilidad de lesiones letales del tipo LMDS es mucho más alta que la de lesiones subletales y el componente lineal predomina. Por contra, durante la irradiación con rayos X o gamma, que produce una densidad de ionizaciones baja, con gran dispersión del daño genético, se observa la aparición del hombro inicial de la curva, debido a una reparación de las lesiones subletales. A medida que aumenta la dosis y se saturan los mecanismos de reparación, desaparece el hombro; el componente cuadrático predomina y la probabilidad de que dos sublesiones interactúen para originar un producto letal es mayor.

La predicción. En general, el cálculo de la supervivencia según la ecuación L-Q se ajusta bien a los datos experimentales, sobre todo, entre 1,5 y 5 Gy que son las dosis más utilizadas en radioterapia. O lo que es lo mismo, la región comprendida entre el 100 y el 10 % de la supervivencia celular [Barendsen, 1987; Fowler, 1992].

Validez clínica. El modelo L-Q puede emplearse para describir la relación entre el efecto de una dosis de radiación (isoeffecto) y el número de fracciones en las que se ha administrado [Joiner, 1993]. El cociente α/β (cuyas unidades son Gy) indica la

dosis en la que la contribución del componente lineal y del componente cuadrático en el efecto biológico es equitativamente la misma [Awwad, 1990-a]. En general, un valor de α/β de 3 es propio de tejidos con una respuesta tardía a la radiación. Por contra, un valor de 10 indica una elevada radiosensibilidad. El cociente α/β es necesario para calcular el efecto biológico equivalente de distintos esquemas de fraccionamiento. El valor de α/β se ha obtenido experimentalmente para distintos tejidos [Fertil, 1981; Fowler, 1984]. Actualmente, se considera que la equivalencia biológica de distintos esquemas de fraccionamiento en radioterapia debe calcularse utilizando la ecuación L-Q [Kogel, 1993].

3.12.8.- Radiosensibilidad celular intrínseca (SF2 y \bar{D})

El concepto de radiosensibilidad celular intrínseca, o simplemente radiosensibilidad, indica el grado de susceptibilidad -pérdida de capacidad reproductiva- ante la radiación, independientemente de los factores ambientales. El grado de daño genético radioinducido determinará la radiosensibilidad celular. Se considera que la radiosensibilidad debe expresarse mediante la SF2 y la \bar{D} . La SF2 es la supervivencia tras una dosis de 2 Gy y \bar{D} es el área bajo la curva de supervivencia celular representada en coordenadas lineales. \bar{D} fue introducida por Hug y Kellerer en 1966 como una medida global de la radiosensibilidad a lo largo de un rango de dosis. A pesar de que ha sido discutida por algunos autores [Tucker, 1986; Kruglikov, 1993], su utilización está ampliamente difundida y junto a la SF2 se correlaciona con la respuesta de los tumores a la radiación [Fertil, 1986; West, 1992].

A partir de los años 80 y hasta la actualidad se ha considerado que el parámetro que mejor expresa la radiosensibilidad es la SF2, que tiene un valor añadido al biológico que es el sentido clínico, ya que el fraccionamiento clásico en radioterapia es el de 2 Gy al día 5 días a la semana [Fertil, 1981; Deacon, 1984; Bristow,

1990; Deschavanne, 1996]. SF2 se relaciona con el valor de la pendiente del hombro (α) de la curva de supervivencia. Además, existen múltiples evidencias de que la determinación mediante el método clonogénico de la SF2 se correlaciona con la radiocurabilidad [Deacon, 1984].

Finalmente, el componente lineal del modelo L-Q, αD , cuyo substrato molecular serían las lesiones DBS y LMSD, se correlaciona con la radiosensibilidad cuando la dosis de radiación es menor o igual a 2 Gy. Como es de esperar, SF2 y αD muestran una fuerte relación [Awwad, 1990-a]. Cuanto mayor es el valor de αD , o lo que es lo mismo, la pendiente inicial de la curva de supervivencia, mayor es la radiosensibilidad y menor es la SF2 y la \bar{D} [Peacock, 1992].

3.12.9.- Factores que modifican la radiosensibilidad

Los factores que modifican la radiosensibilidad de una determinada línea celular son diversos. Los más importantes son las características de la radiación (corpúscular o no, tasa de dosis, etc), las condiciones ambientales y las características del crecimiento celular.

Ciclo celular. [Terasima, 1963; Sinclair, 1966]. Se ha sugerido que la disposición -histonas- y funcionalismo del ADN, así como la concentración variable de determinadas moléculas -glutatió- podrían explicar las variaciones de radiosensibilidad a lo largo del ciclo celular. La fase G2 tardía y la fase M son las más radiosensibles del ciclo mientras que la fase G1 y la fase S tardía son las más resistentes. Durante la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S inicial existe un aumento transitorio de la radiosensibilidad (Figura 9).

Uno de los factores celulares que más influyen en la radiosensibilidad es la fase del ciclo celular en que se encuentran las células en el momento de la irradiación.

El efecto oxígeno. El oxígeno es uno de los factores que más influyen en la radiosensibilidad. El cociente entre la radiosensibilidad en condiciones de buena oxigenación y bajo condiciones de anoxia es del orden de 2,5 - 3 [Gray, 1953; Palcic, 1984]. El efecto oxígeno se debe a que el oxígeno reacciona con los radicales libres y electrones del medio acuoso para formar productos más tóxicos y estables, como el peróxido de hidrógeno y el hidroperóxido, que a su vez reaccionan con las moléculas diana (ADN). El oxígeno evita la reparación y favorece la fijación del daño radioinducido.

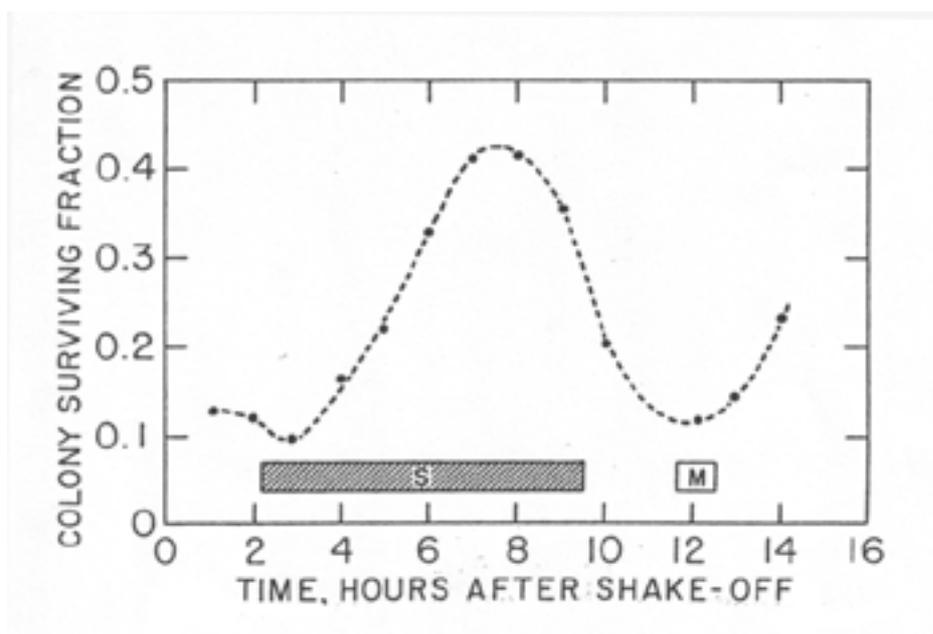


Figura 9. Efecto del ciclo celular sobre la radiosensibilidad

La irradiación de una población de células a distintos tiempos tras haber sido sincronizadas (shake-off) da lugar a una radiosensibilidad distinta en función de la fase del ciclo celular en la que encuentran las células en el momento de la irradiación [Sinclair, 1966].

Grupos tiol. La concentración de grupos tiol celulares (compuestos con el radical sulfidrilo SH-) puede dividirse en tioles ligados a proteínas y tioles no proteicos. Los ligados a proteínas son los más abundantes y dependen fundamentalmente del aminoácido L-cisteína. Los no proteicos son, en un 90 %, el glutatión, la cisteamina, el coenzima A y la γ -glutamil cisteamina. La concentración intracelular de grupos tiol influye en la radiosensibilidad dado que los compuestos con el radical SH-, que actúan como antioxidantes, compiten con el oxígeno. Las células que genéticamente contienen una elevada concentración de glutatión son más radiorresistentes que las células con un concentración normal de glutatión [Awwad, 1990-b].

Agentes radiosensibilizadores. En términos generales, se aplica el nombre de radiosensibilizador a una sustancia que aumenta los efectos citotóxicos de las radiaciones ionizantes cuando se administra a la vez que éstas. Los agentes radiosensibilizadores en general no tienen efecto antitumorales. Se conocen dos grupos, las pirimidinas halogenadas y los nitroimidazoles.

Las pirimidinas halogenadas que actúan como agentes radiosensibilizantes son la bromo y la iododeoxiuridina. En éstas, se ha sustituido el hidrógeno en posición 5' del anillo pirimidínico por un átomo de bromo o de iodo. Este cambio hace que se incorporen en forma de timidina en el ADN lo que altera sus propiedades fisicoquímicas haciéndolo más sensible a la radiación. Parece que el mecanismo de sensibilización operaría a través de la formación de radicales libres uracilo [Mitchell, 1986].

Los nitroimidazoles actúan de modo similar al oxígeno facilitando el daño producido por los radicales libres. Además, una exposición prolongada disminuye la concentración intracelular de tiol [Overgaard, 1993].

3.13.- MODULACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD POR CITOSTÁTICOS

3.13.1.- Estrategias para optimizar la combinación de quimio y radioterapia

El objetivo de la combinación de quimio y radioterapia es mejorar el control local, disminuir el riesgo de metástasis y aumentar la supervivencia sin aumentar significativamente la toxicidad. En última instancia, se persigue alcanzar un claro beneficio comparado con el resultado de tratamientos administrados separadamente. En cada situación clínica es necesario determinar en qué grado mejora la respuesta antitumoral, cómo se traduce en un incremento de la supervivencia y cuál es la toxicidad máxima tolerable.

Las estrategias para optimizar el resultado terapéutico mediante la combinación de quimio y radioterapia pueden basarse en los siguientes mecanismos [Steel, 1979 y 1988].

Cooperación espacial. Se entiende por cooperación espacial una mejora de los resultados conseguidos por un solo agente (radio o quimio), dado que el tratamiento que se añade es activo sobre un compartimento sólo parcialmente tratado por el primer agente. Por ejemplo, en la leucemia aguda de mal pronóstico, la adición de radioterapia disminuye significativamente las recidivas en el SNC [Hustu, 1973]. La cooperación espacial es el mecanismo que de forma más clara se ve involucrado en el beneficio producido por un tratamiento combinado [Maase, 1986].

Combinación de agentes cuya actividad antitumoral sea independiente (efecto aditivo). Se trata de la administración de dos agentes, radiación y un citostático, ambos con una actividad antitumoral propia, que no se modifica por la administración combinada. Es de esperar que la actividad antitumoral de la combinación sea superior que la de los agentes dados por separado.

Intensificación de la respuesta antitumoral (radiosensibilización). La administración combinada de radiación y otro agente, no necesariamente citostático, intensifica la actividad antitumoral de la radiación. La intensificación ocurre como resultado de algún tipo de interacción entre la radiación y otros agentes. Al igual que los mecanismos mencionados previamente, su explotación depende en gran medida de la toxicidad asociada.

Protección de los tejidos normales. La administración de un fármaco, en general no citostático, puede proteger contra el efecto tóxico en los tejidos normales. Si este efecto no se extiende al tumor es posible aumentar las dosis de radiación con la finalidad de aumentar la actividad antitumoral sin incrementar la toxicidad.

Finalmente, es importante considerar que con cualquiera de los mecanismos descritos anteriormente se puede modificar la respuesta antitumoral y que es posible que varios mecanismos se utilicen simultáneamente para optimizar una estrategia terapéutica [Tubiana, 1985].

3.13.2.- Mecanismos potenciales de radiosensibilización

Los mecanismos por los que un citostático puede interactuar con la radiación y dar lugar a una radiosensibilización son los siguientes.

Modificación del daño radioinducido. El ADN tras la acción de un citostático puede sufrir modificaciones que lo hagan más susceptible a la acción de la radiación. Este mecanismo de interacción se ha sugerido para el cisplatino y se conoce con el nombre de sensibilización prerradiación [Vokes, 1990].

Inhibición de la reparación. Existe múltiples demostraciones de que algunos agentes químicos pueden intensificar la radiosensibilidad debido a la inhibición de la reparación del ADN (Figura 8).

Sincronización. El tratamiento con un citostático fase específico selecciona una población celular en función de la fase del ciclo celular para la cual el fármaco es más activo. Tras el tratamiento, la población celular resistente estará sincronizada en esa fase. Esta perturbación del ciclo puede ser teóricamente aprovechada para irradiar las células en un momento de mayor radiosensibilidad [McGinn, 1994]. La hidroxiurea, el 5-FU y, más recientemente, la gemcitabina se han relacionado con este mecanismo [Sinclair, 1967; Bhuyan, 1977; Latz, 1998; Milas, 1999].

Inhibición del stop en G1 y progresión hacia la fase S. Se ha observado que algunas células que presentan una inhibición del stop fisiológico en G1 son radiosensibilizadas por el 5-FU a medida que progresan hacia la fase S [Lawrence, 1997].

Reclutamiento celular. La entrada en el ciclo celular de células acantonadas en fase G0 puede verse forzada por la disminución de la población tumoral, consecuencia del tratamiento con citostáticos. Las células en ciclo puede ser alcanzadas por la radiación en una fase más radiosensible que la propia fase G0 [Fu, 1985].

Inhibición de la repoblación. Hacia el final de un tratamiento con radioterapia, las células más resistentes pueden iniciar un crecimiento acelerado con lo que una parte importante del efecto de la radiación se pierde [Fowler, 1992]. La administración de un citostático durante esta fase de repoblación acelerada puede inhibir el crecimiento tumoral y resultar en un aumento significativo de la eficacia antitumoral de la radiación.

Oxigenación. La reducción del volumen tumoral tras el tratamiento con un citostáticos puede favorecer la llegada de oxígeno a las células neoplásicas mediante un proceso de reoxigenación. También, la adriamicina, que inhibe las mitocondrias y la respiración celular podría incrementar la cantidad de oxígeno libre intracelular lo que permitiría actuar como radiosensibilizador [Rotman, 1992].

Prevención de las resistencias. Las células tumorales presentan espontáneamente la aparición de resistencias a los citostáticos. La aparición de resistencias depende de la frecuencia de mutaciones y del número de células tumorales. La inactivación de las células por uno de los agentes que se combina puede prevenir la aparición de resistencias. El mecanismo de acción de la radiación no depende de las variables que afectan a los citostáticos, transporte, activación de profármacos, enzimas diana, etc., por lo que la administración combinada puede resultar beneficiosa [Tannock, 1996].

Quimiosensibilización. La irradiación previa puede incrementar la quimiosensibilidad de las células. Se ha observado que la desaparición del 5-FU y sus metabolitos del interior de las células es más lenta si éstas han sido previamente irradiadas [Blackstock, 1996].

Hipertermia. El aumento de temperatura de los tejidos irradiados podría incrementar el daño celular causado por la radiación [Overgaard, 1989].

Debulking. En algunos casos permite la reducción de los campos de radioterapia (enfermedad de Hodgkin) con lo que es posible aumentar la dosis final de radiación y/o disminuir la toxicidad en los tejidos sanos. Y viceversa, si la radiación se administra antes de la quimioterapia es posible que una reducción tumoral favorezca la llegada de los fármacos al centro del tumor, en general isquémico [Fu, 1985].

3.13.3.- Evaluación experimental de la modulación de la radiosensibilidad mediada por citostáticos

La evaluación del efecto de la adición de un citostático a la radiación puede realizarse mediante distintos diseños experimentales. *In vitro*, es posible cuantificar en qué medida se modifica la radiosensibilidad al añadir un citostático a la radiación. La medida del aumento o disminución de la radiosensibilidad se acostumbra a expresar como el cociente entre la dosis requerida para un el efecto dado (SF_2 , \bar{D}) y la dosis necesaria para el mismo efecto cuando se añade un citostático [Steel, 1988].

3.13.4.- Terminología

No interacción. Una combinación no presenta ninguna interacción cuando cada agente antitumoral ejerce su propio efecto. *In vitro*, una combinación es de tipo no interactivo cuando al añadir un fármaco se observa un desplazamiento de la curva de radiosensibilidad sin cambiar su forma. El término aditividad equivale al de no interacción.

Interacción. Una combinación interactúa cuando un tratamiento modifica el efecto del otro. Se evidencia por un cambio de forma de la curva de supervivencia celular. Se habla de intensificación (*enhancement*, en lengua Inglesa) cuando la curva aumenta su pendiente e inhibición cuando disminuye la pendiente o protección en el caso extremo de que la radiosensibilidad sea menor que con radiación sola (Figura 10).

El término radiosensibilización se corresponde con el de intensificación y se utiliza sobre todo cuando el agente radiosensibilizador no tiene actividad tumoricida. El oxígeno es el agente radiosensibilizador por excelencia. El término sinergismo y

potenciación resultan ambiguos por lo que no deberían utilizarse. El término aditividad equivale al de no interacción. El término supraaditivo equivale al de radiosensibilización en muchas ocasiones.

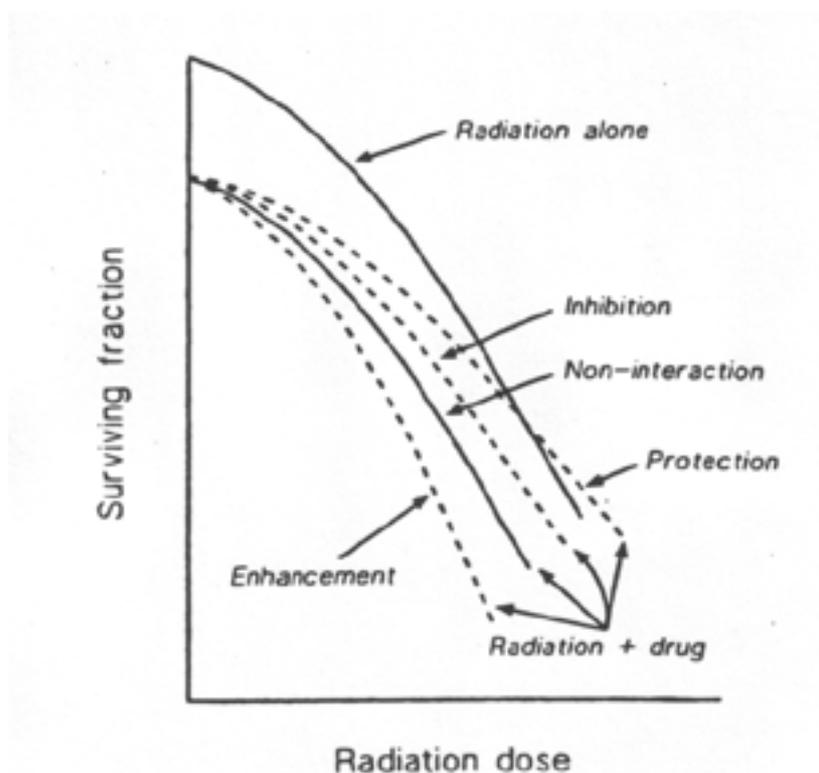


Figura 10. Terminología para describir el tipo de interacción entre la radiación y un agente citostático

La adición de un citostático puede producir cambios en la curva de supervivencia celular observada cuando sólo se administra radiación. Si no se modifica la forma de la curva y únicamente se desplaza hacia abajo se trata de una combinación aditiva, independiente o no interactiva (cada agente ejerce su actividad sin relación con el otro). Por contra, si se modifica la pendiente de la curva puede deberse a una inhibición, o protección en el caso extremo, o puede deberse a una intensificación o radiosensibilización [Steel, 1993-b].

3.14.- INTERACCIÓN DEL 5-FLUOROURACILO CON LA RADIACIÓN

3.14.1.- Farmacocinética del 5-FU

El 5-FU se sintetizó basándose en la observación de que las células del hepatoma de rata consumen más uracilo que las células normales y por tanto un agente que bloqueará el metabolismo del uracilo podría presentar un efecto citotóxico selectivo sobre las células, que como las del hepatoma de rata, metabolizan intensamente el uracilo [Heidelberg, 1958]. El 5-FU es una modificación de la base pirimídica uracilo, en la que se ha sustituido el hidrógeno en posición 5' por un átomo de fluor. El peso molecular del 5-FU es de 130. El 5-FU se distribuye en el plasma, en el LCR, en el líquido extracelular y en un tercer espacio. La concentración tras la administración por vía oral es errática y difícilmente previsible debido a un fuerte fenómeno de primer paso hepático [Almersjo, 1980]. Por ello, el 5-FU debe administrarse por vía endovenosa. Para el tratamiento de lesiones cutáneas puede emplearse en forma tópica.

Convencionalmente, el 5-FU se administra en forma de bolus de 400 a 600 mg/m² (10 a 15 mg/kg) o en venoclisis o infusión continua durante 5 días a razón de 750 - 1.000 mg/m² por día. La concentración plasmática de 5-FU puede determinarse con precisión mediante columnas de cromatografía líquida de alta presión [Buckpiit, 1980]. Transcurridos 5 minutos de una inyección endovenosa en bolus, la concentración plasmática de 5-FU es aproximadamente de 50 µg/ml; pasados 20 minutos es de alrededor de 15 µg/ml (Figura 11) [Christophidis, 1978; Fraile, 1980; Heggie, 1987].

La concentración plasmática de 5-FU durante una infusión continua es de 0,5 - 2,5 µg/ml en equilibrio farmacocinético [Fraile, 1980].

La eliminación del 5-FU tiene lugar en un 90 % por catabolismo. La dihidropirimidin deshidrogenasa, que se encuentra en todos los tejidos, aunque en mayor cantidad en el hígado, cataliza la reacción de inactivación que conduce a la obtención de amonio y CO_2 [Lu, 1992]. El déficit de dihidropirimidin deshidrogenasa se ha relacionado con una toxicidad severa al 5-FU [Diasio, 1988].

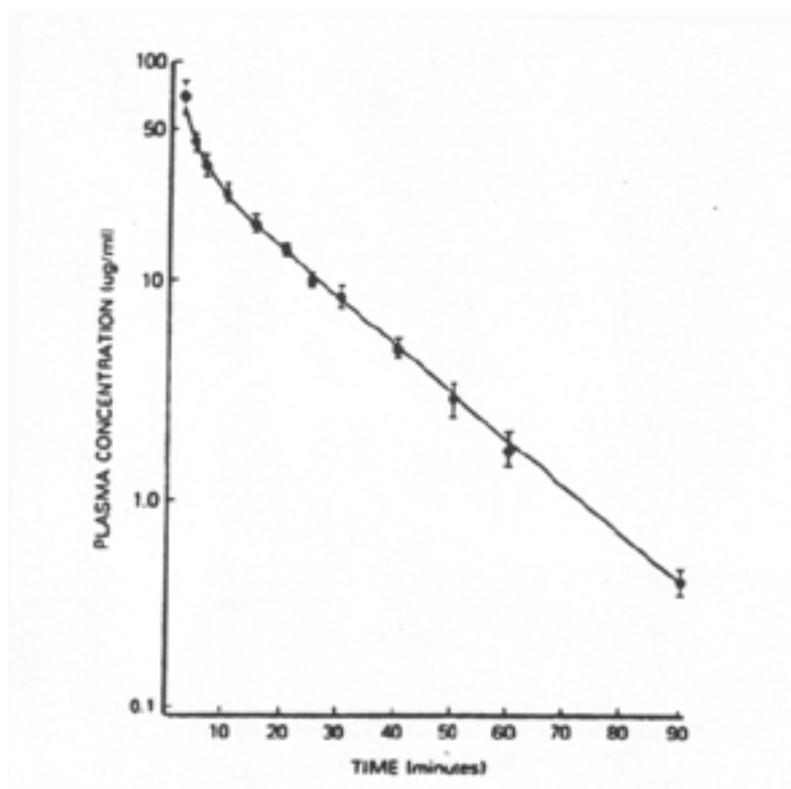


Figura 11. Concentración plasmática de 5-FU tras la administración endovenosa en bolus

Concentración plasmática media de 5-FU ($\mu\text{g}/\text{ml}$), en escala logarítmica, vs tiempo. Tras la administración endovenosa en bolus ($333 - 592 \text{ mg}/\text{m}^2$) la concentración plasmática de 5-FU desciende de forma exponencial con el tiempo. A los 25 minutos es una décima parte del pico inicial ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) [Christophidis, 1978].

3.14.2.- Mecanismo de acción del 5-FU

El 5-FU entra en la célula a través del mismo mecanismo de difusión facilitada que utiliza el uracilo [Valeriotte, 1986]. Una vez en su interior, se incorpora a las rutas de síntesis de los ácidos nucleicos. El 5-FU ingresa en el metabolismo celular como FdUMP y FUMP (Figura 12).

Se han descrito 3 mecanismos de acción del 5-FU. El primero consiste en la inhibición del enzima TS, que cataliza la síntesis de dTMP a partir de dUMP. El enzima TS es inhibida por el FdUMP [Hartman, 1961]. El FdUMP, en presencia del cofactor metilentetrahidrofolato, forma un complejo covalente lentamente reversible con la TS [Santi, 1987]. Unos niveles elevados de folato reducido aumentan la citotoxicidad del 5-FU ya que la inhibición de la TS es más duradera y afecta a más moléculas de TS. Los resultados procedentes de ensayos clínicos randomizados en cáncer de colon avanzado han demostrado una mayor actividad terapéutica del 5-FU cuando se asocia al ácido folínico [Piedbois, 1992]. La inhibición de la TS produce un déficit del nucleótido dTTP, necesario para la síntesis y reparación del ADN.

El segundo de los mecanismos es la incorporación del 5-FU al ADN como un nucleótido fraudulento, el FdUTP. La incorporación del FdUTP está favorecida por la deplección de dTTP resultado de la inhibición de la TS. El FdUTP inhibe la elongación del ADN, produce inestabilidad y SSB en el ADN e interfiere en la reparación [Curtin, 1991]. El estrés genotóxico puede activar la apoptosis en células susceptibles [Li, 1994].

En tercer lugar, el 5-FU puede incorporarse en las distintas especies de ARN citoplasmático y nuclear a partir del metabolito FUMP [Santi, 1987]. El grado de incorporación del 5-FU en el ARN se ha correlacionado con el efecto citotóxico [Kufe, 1981]. El 5-FU además de actuar sobre la síntesis de ácidos nucleicos, se ha observado que se incorpora en los azúcares de las membranas celulares en forma de FUDP-hexosas y FUDP-N-acetilhexosaminas lo que puede alterar la función de las membranas y la viabilidad celular [Valeriotte, 1986].

El metabolismo del 5-FU se caracteriza por presentar diversas rutas enzimáticas como lo demuestra el hecho que en ocasiones el 5-FU se metabolice a FUMP vía ORTPasa y en otras vía uridin kinasa [Hughes, 1992]. Esta variabilidad metabólica puede estar implicada en la heterogenicidad de la respuesta la 5-FU.

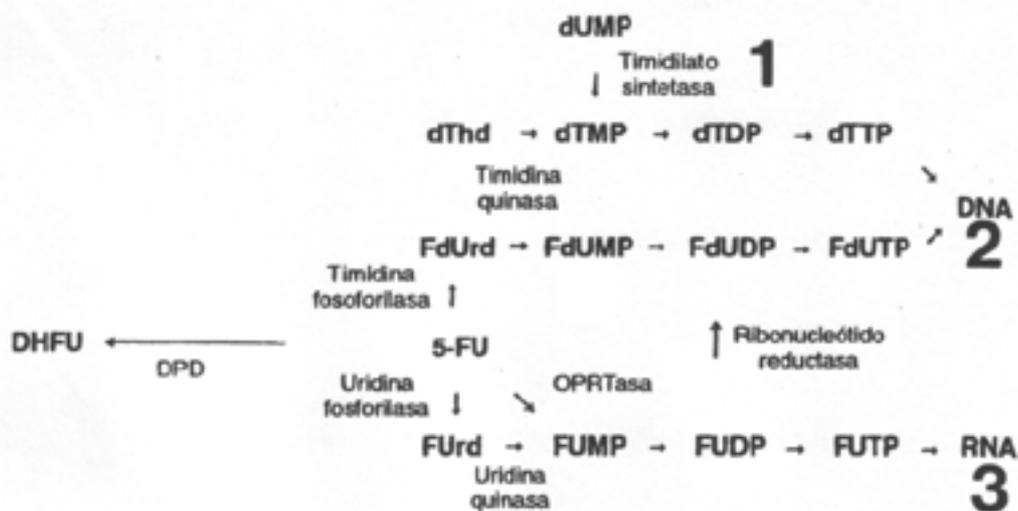


Figura 12. Metabolismo del 5-FU

Una vez en el interior de la célula el 5-FU, se incorpora a las rutas de síntesis de los ácidos nucleicos. La vía del ADN requiere que el 5-FU sea convertido en FdUrd por la timidina fosforilasa. Posteriormente, tras una fosforilización, es transformado en FdUMP (5-F-deoxiuridinmonofosfato) el cual en presencia de metilentretehidrofolato inhibe la timidilato sintetasa (#1). El 5FdUMP tras 2 fosforilaciones se puede incorporarse al ADN como 5FdUTP (#2). La vía de incorporación del 5-FU al ARN sigue una ruta distinta a la del ADN. El 5-FU se convierte en FUrd o directamente en FUMP (5-F-uridinmonofosfato) hasta que por 2 sucesivas fosforilaciones se incorpora al ARN (#3). Los posibles mecanismos de acción del 5-FU se han señalado con los números 1, 2 y 3. El 5-FU se cataboliza a Dihidrofluorouracilo (DHFU). OPRTase: orotato fosforibosiltransferasa. DPD: dihidropirimidin deshidrogenasa. La vía dThd (timidina) → dTTP es la vía normal de síntesis del nucleótido dTTP [Ardalan, 1981].

Se ha descrito la existencia de células humanas resistentes al 5-FU. Los mecanismos implicados en la resistencia al 5-FU son varios. En primer lugar, la deficiencia del cofactor metilentretehidrofolato y/o unos niveles intrínsecamente bajos de folato intracelular disminuyen la formación del complejo FdUMP-TS [Wang, 1993].

En segundo lugar, el déficit de los enzimas que catalizan la activación metabólica del 5-FU, por ejemplo, la timidin kinasa, etc, pueden ser una causa de resistencia.

En último lugar, tanto la regulación de la transcripción del gen de la TS, como mutaciones que modifiquen la afinidad por el FdUMP pueden explicar la falta de respuesta al tratamiento con 5-FU [Barbour, 1990].

3.14.3.- Efecto del 5-FU

El 5-FU es citotóxico tanto para las células en fase S como para las células en otras fases del ciclo. El efecto citotóxico del 5-FU debido al bloqueo de la síntesis del ADN por inhibición de la TS se incrementa con el tiempo de exposición y con la actividad proliferativa de las células [Valeriote, 1986]. Este mecanismo de acción es ciclodependiente, produce la muerte de las células en fase S seguido por una citotoxicidad por desequilibrios en el crecimiento celular y se favorece manteniendo la administración de 5-FU durante uno o más ciclos celulares.

Los estudios realizados con citometría de flujo sobre la cinética celular demuestran que el 5-FU provoca la inactivación de las células en fase S y un bloqueo de las células en G1 [Piper, 1981]. Algunos autores han relacionado esta observación con el sinergismo visto al combinar 5-FU con agentes citostáticos fase S específicos [Bhuyan, 1977].

El efecto citotóxico debido a la incorporación del 5-FU en el ARN y el ADN se favorece mediante dosis elevadas en poco tiempo, con menor dependencia del ciclo celular.

Una mayor actividad citotóxica sobre la TS en las administraciones en infusión se ha relacionado con la mucositis y la diarrea, mientras que la toxicidad hematológica se ha asociado a la administración en forma de bolus [Grem, 1990].

In vitro, la citotoxicidad por 5-FU puede determinarse a través de la medida de la inhibición del crecimiento celular basado en el recuento celular o de la exclusión de colorantes vitales (por ejemplo, azul tripán). Sin embargo, estos métodos no detectan la inactivación celular [Valeriote, 1986]. El método clonogénico usado en radiobiología es útil en la evaluación de la toxicidad celular por 5-FU [Von Hoff, 1981]. De hecho, la primera curva de supervivencia celular *in vitro* frente al 5-FU fue obtenida ya en 1964 [Berry, 1964].

El efecto citotóxico del 5-FU se ha estudiado también *in vivo*. Los métodos empleados se han basado en determinaciones del crecimiento tumoral. Los datos procedentes de este tipo de experimentos son similares a los obtenidos *in vitro* [Valeriote, 1986].

3.14.4.- Mecanismos de interacción del 5-FU con la radiación

En diversos estudios de laboratorio se ha observado que la adición de 5-FU intensifica la respuesta a la radiación. En 1965, Heidelberger et al. demostraron que un sarcoma murino que no podía ser controlado con radioterapia o 5-FU administrados por separado, sí podía ser inactivado cuando ambos se combinaban. Posteriormente, otras observaciones en modelos experimentales animales *in vivo* e *in vitro* confirmaron que el 5-FU, en determinadas condiciones, puede causar una radiosensibilización.

En la mayoría de las ocasiones, la radiosensibilización depende de que las células sean inicialmente sensibles al 5-FU, de la duración y de la concentración del tratamiento con 5-FU [Nakajima, 1979; Byfield, 1982; Smalley, 1992]. Sin embargo, algunos autores han sugerido que la combinación de ambos tratamientos daría lugar a un efecto que simplemente es el resultado de acciones independientes o aditivas [Nakajima, 1979; Berry, 1966-b].

A pesar del tiempo transcurrido, no se han determinado los mecanismos que rigen la interacción entre el 5-FU y la radiación y tampoco se conocen con claridad las condiciones óptimas para que se dé una radiosensibilización. El 5-FU podría radiosensibilizar tanto administrado antes de la radiación como después de la misma.

Existen diversas interpretaciones para explicar una radiosensibilización cuando el 5-FU se administra **después de la radiación**. Por ejemplo, es posible que la radiosensibilización sea el resultado de la inactivación por el 5-FU de las células en fase S supervivientes tras una irradiación previa. Esta fase S es resistente a la radiación y sensible al 5-FU [Kinsella, 1992].

Otra interpretación es que el 5-FU podría inhibir la parada fisiológica de control en G2 que realizan las células antes de la mitosis para corregir anomalías en su ADN recientemente sintetizado. La inhibición del control G2 en las células irradiadas provoca un aumento de radiosensibilidad posiblemente debido a que hay errores en el ADN que no son corregidos antes de la mitosis [Weinert, 1988]. Se conoce que la cafeína y la estaurosporina, que inhiben el stop G2, son dos sustancias radiosensibilizantes cuando están presentes después de la irradiación, mecanismo que también podría operar en el caso del 5-FU.

Una tercera interpretación (llamada quimiosensibilización) es que la irradiación puede favorecer la retención intracelular del 5-FU y de sus metabolitos, lo que aumentaría el efecto del 5-FU. Se ha observado, en células de colon, un aumento de 5-FU y FdUMP intracelular ligado a una irradiación (2 Gy) previa de dichas células

[Blackstock, 1996]. En pacientes con metástasis hepáticas se ha descrito una mejor respuesta al 5-FU en aquellos pacientes con mayores concentraciones intratumorales de 5-FU [Presant, 1990]. La interacción entre radiación y 5-FU podría dar lugar a una mayor respuesta no sólo por una radiosensibilización sino también por una quimiosensibilización mediada por la radiación.

Finalmente, dado que el 5-FU inhibe la síntesis de dTTP, se ha pensado que la presencia de 5-FU después de la irradiación inhibiría la reparación del daño genético causado por la irradiación [Berry, 1966-a]. Sin embargo, no se ha podido demostrar mediante métodos físicos un aumento de roturas de ADN tras el tratamiento con 5-FU [Hughes, 1992]. En cualquier caso, la no demostración de alteraciones en la reparación del ADN no excluye que puedan producirse reparaciones erróneas cuyos efectos terminen por inactivar las células [Rich, 1997].

El 5-FU también puede radiosensibilizar cuando es administrado **antes de la irradiación** [Bruso, 1990]. Se han sugerido algunos mecanismos de radiosensibilización. Por ejemplo, el FdUMP, puede bloquear el ciclo celular en la frontera G1/S [Piper, 1981]. Se sabe que este punto del ciclo celular es relativamente sensible a la radiación [Terasima, 1963]. Por tanto, una redistribución (sincronización) del ciclo con un enriquecimiento de células en G1/S después de un tratamiento con 5-FU podría explicar una radiosensibilización. Sin embargo, los estudios realizados con poblaciones celulares sincronizadas han demostrado que la redistribución del ciclo en G1/S sólo puede explicar una pequeña parte de la radiosensibilización total [McGinn, 1994].

Otra hipótesis para la radiosensibilización pre-irradiación se basa en la observación de un aumento de la radiosensibilidad visto cuando las células no realizan la parada fisiológica de control en G1. Se ha descrito que las células HT29, de cáncer de colon humano, transfectadas con el gen p53 mutado, y que, por tanto, no realizan la parada G1, se radiosensibilizan por FdUMP mientras que las células HT29 que expresan p53 normal no son radiosensibilizadas [Naida, 1996]. Esta observación es

compatible con la hipótesis que la radiosensibilización por FdUMP requiere la progresión hacia la fase S tras la irradiación [Lawrence, 1997]. El papel que juega una mutación de p53 en la radiosensibilización observada cuando las células progresan hacia la fase S parece ser circunstancial ya que lo que realmente condiciona un cambio en la radiosensibilidad es la inhibición del punto de chequeo G1, que permitiría la entrada de células en la fase S con lesiones acumuladas en el genoma. Igualmente, se ha observado una radiosensibilización cuando se inhibe el control en G1 por inactivación del gen del retinoblastoma [Davis, 1996].

Por último, aunque la inhibición de la reparación del ADN por 5-FU se ha relacionado más con la exposición post-irradiación, se ha observado que realmente el 5-FU pre-radiación puede inhibir la reparación del ADN y provocar un aumento de DSB [Bruso, 1990]. Este hecho se ha relacionado con una inhibición prolongada de la enzima TS lo que es compatible con una disminución de dTTP que a su vez enlentece la reparación del ADN.

3.14.5.- Estudios clínicos con 5-FU y radioterapia concomitante

Tras la síntesis del 5-FU y la observación de su potencial radiosensibilizador, la combinación de radioterapia y 5-FU se ha incorporado progresivamente al arsenal terapéutico en oncología. El tratamiento combinado puede considerarse rutinario en el cáncer de recto [Krook, 1991], cáncer de esófago [Herskovic, 1992], cáncer ORL [The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group, 1991] y cáncer de canal anal [Flam, 1996]. No obstante, es importante tener en cuenta que los esquemas de tratamiento combinado de radioterapia y 5-FU se han basado más en el empirismo que en un profundo conocimiento de las bases biológicas que rigen la interacción de ambos tratamientos. Así pues, actualmente, no se conoce con claridad la secuencia óptima y la duración de la exposición al 5-FU cuando se combina con la radioterapia. La investigación preclínica puede aportar conocimientos útiles para el diseño de nuevos protocolos.