

6.- DISCUSIÓN

6.1- ¿ES COMPARABLE LA RADIOSENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS HUMANAS A LA DE OTROS TUMORES RADIOSENSIBLES?

En las últimas décadas, el cáncer de páncreas ha sido considerado un tipo de cáncer en el que la radioterapia tenía un papel limitado. Aparte de argumentos propiamente clínicos (principalmente el nihilismo terapéutico asociado a la alta mortalidad del cáncer de páncreas y la dudosa intolerancia a la irradiación del abdomen superior), una supuesta radiorresistencia intrínseca de las células tumorales pancreáticas humanas ha justificado la escasa dedicación de la oncología radioterápica al cáncer de páncreas. Sin embargo, esta idea no está basada en hechos demostrados.

La radiosensibilidad de las células tumorales pancreáticas humanas se ha estudiado en pocas ocasiones. Una revisión de la literatura tan sólo proporciona dos referencias bibliográficas, que además pertenecen a un mismo grupo [Courtenay, 1976; Smith, 1978]. En estos estudios, la SF2 fue del orden de 0,2 [Courtenay, 1976], lo que sugiere una elevada radiosensibilidad. En 1981, Fertil et al. realizaron una extensa revisión sobre la radiosensibilidad evaluada mediante ensayo clonogénico (se analizaron 59 líneas celulares), en la cual sólo se hace referencia a una línea pancreática tumoral humana: la HX32, precisamente estudiada por Courtenay et al..

La radiosensibilidad de la línea HX32 se ajustó al modelo L-Q: α y SF2 fueron 0,661 Gy⁻¹ y 0,22, respectivamente, valores correspondientes, como ya hemos comentado, a una elevada radiosensibilidad [Fertil, 1981].

Si se compara la SF2 de las células pancreáticas HX32 con la de otras líneas celulares tumorales, puede observarse que es de las más bajas (Tabla 11). Por ejemplo, la SF2 de las células HX32, es del mismo orden que la de las células del linfoma de Burkitt, altamente radiosensible. No obstante, se debe tener en cuenta que las condiciones experimentales del estudio de Courtenay et al. pudieron influir sobremanera en la radiosensibilidad ya que ésta se determinó, mediante ensayo clonogénico, tras la irradiación de las células *in vivo*, lo que puede, *per se*, disminuir la SF2. A pesar de esta observación, la revisión de la literatura sugiere que la radiosensibilidad *in vitro* del cáncer de páncreas puede ser mayor de lo que se esperaba.

En nuestros experimentos, la supervivencia *in vitro* se ajustó al modelo L-Q. Este hecho, da consistencia al método experimental empleado e indica que el tipo de relación de la supervivencia con la dosis es parecida a la de la mayoría de estudios basados en ensayos clonogénicos, por lo que nuestros resultados pueden ser comparados con los de otros laboratorios. Las células MIA PaCa-2, PANC-1, NP-18 y HCT-15 formaron colonias en un porcentaje superior al 10% de las células sembradas y en un plazo inferior a 15 días, ambas condiciones aceptables para un ensayo clonogénico [Elkind, 1967]. Se observó que el crecimiento *in vitro* de las células MIA PaCa-2, PANC-1 y HCT-15 es semejante al descrito por otros autores [Yunis, 1977] o especificado por la ATCC (Figura 19). La línea NP-18, establecida en el Laboratorio de Investigación Gastrointestinal mostró un crecimiento parecido a las otras 3 líneas ensayadas (Tabla 2).

Tabla 11. Radiosensibilidad *in vitro* de 59 líneas tumorales humanas

Description	Cell line code	Radiation		Cloning Efficiency %	Quadratic model		Surviving fraction	
		Source	Dose rate (Gy/min)		α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	2 Gy	8 Gy
Melanoma	(19-4)....	250 kV	1.84	45	-0.10	6.50		
	LeCa (39-4)	⁶⁰ Co		60	1.37	5.37	0.77	1.7 x 10 ⁻²
	MEWO	¹³⁷ Cs	0.85	25*	5.55	10.5	0.61	1.1 x 10 ⁻²
	Ma111	⁶⁰ Co	3.00	33	2.57	3.42	0.22	1.4 x 10 ⁻⁵
	Be211	⁶⁰ Co	3.00	25	4.29	1.93	0.52	1.4 x 10 ⁻²
	Na11	⁶⁰ Co	3.00	31	2.78	3.15	0.39	9.4 x 10 ⁻³
	HX34	⁶⁰ Co	5.00	20*	2.77	1.52	0.51	1.4 x 10 ⁻²
	HMV	200 kV	1.05		1.73	5.57	0.54	4.1 x 10 ⁻²
Colonic adeno carcinoma	Lovo	250 kV	0.90	53	3.39	5.74	0.57	7.1 x 10 ⁻³
	HCT8	¹³⁷ Cs	0.85	53	1.48	6.84	0.40	1.7 x 10 ⁻³
	HT29	¹³⁷ Cs	0.85	35	2.04	4.11	0.57	3.8 x 10 ⁻³
	HX18	⁶⁰ Co	5.00	1.5	9.17	2.98	0.56	1.4 x 10 ⁻²
Rectum adeno carcinoma	HRT18	¹³⁷ Cs	0.85	76	1.58	7.39	0.14	9.7 x 10 ⁻⁵
Cervix	NHIK3025	220 kV	3.55	75	2.94	3.91	0.54	2.5 x 10 ⁻³
	SZC	¹³⁷ Cs	0.85	21	3.16	5.64	0.48	8.1 x 10 ⁻³
	HeLa		1.73	80*	4.24	11.9	0.42	2.2 x 10 ⁻³
	HeLa		1.73	80*	1.72	7.96	0.27	1.6 x 10 ⁻⁵
	HeLa	300 kV	1.00		3.37	2.55	0.52	1.5 x 10 ⁻³
	HeLa S3-1	200 kV	1.05		3.37	2.55	0.46	1.3 x 10 ⁻²
	HeLa S3	6 MV	2.00		2.83	5.09	0.46	4.0 x 10 ⁻³
	HeLa S3	¹³⁷ Cs	1.43	80	2.69	2.95	0.52	1.8 x 10 ⁻²
Glioblastoma	A3	250 kV	1.00	6*	3.36	3.94	0.50	4.2 x 10 ⁻²
	A2	250 kV	1.00	20*	0.86	3.94	0.72	4.0 x 10 ⁻²
	A7	250kV	1.00	30*	3.36	3.94	0.44	5.5 x 10 ⁻³
	TX13	220 kV	0.8	5-12	0.97	3.19	0.72	5.9 x 10 ⁻²
Medulloblastoma	TX14	220 kV	0.8	9-11	5.59	1.52	0.31	4.3 x 10 ⁻³
	TX7	220 kV	0.8	5-7	6.09	1.20	0.28	3.6 x 10 ⁻³
Osteosarcoma	TX4	220 kV	0.8	3-12	6.13	0.75	0.28	4.6 x 10 ⁻³
Pancreas	HX32	⁶⁰Co	5	25-35	6.61	4.48	0.22	2.8 x 10⁻⁴
Oat cells ca.	HX33	⁶⁰ Co	5	0.3-1.5	4.50	2.01	0.37	7.6 x 10 ⁻³
Burkitt lymph.	P3HR-1	200 kV	1.05	80	7.05	0.77	0.18	2.2 x 10 ⁻³
<u>Wells' data</u>								
Bronchus	B	250 kV	3.7	34*	-0.89	3.48		
	Σ	250 kV	3.7	30*	0	2.75	0.89	0.17
	L	250 kV	3.7	26-29*	0.1	2.76	0.88	0.16
Breast					0	3.18	0.88	0.13
	T	250 kV	3.7	21*	-0.84	3.58		
Endometrium					0	2.77	0.89	0.17
	E	250 kV	3.7	25-48*	-0.21	3.34		
Melanoma					0	3.13	0.88	0.13
	G	250 kV	3.7	32*	0.56	1.90	0.83	0.18
Ovary	K	250 kV	3.7	30*	-1.01	3.80		
		250 kV			0	2.96	0.89	0.15
	W	250 kV	3.7	28*	0	2.52	0.90	0.2
Stomach	S	250 kV	3.7	26-38*	-1.79	4.40		

SF2: Supervivencia tras 2 Gy; **SF8:** Supervivencia tras 8 Gy. α : Coeficiente lineal del modelo L-Q (x 10); β : Coeficiente cuadrático del modelo L-Q (x 100). [Fertil et al., 1981].

Tanto por su capacidad clonogénica como por su patrón de crecimiento, las líneas celulares empleadas pueden considerarse indicadas para las investigaciones realizadas. La solidez del modelo se mantuvo a pesar de que las células se irradiaron según distintas técnicas (aisladas y monocapa). Los cambios de radiosensibilidad según si las células se irradiaron aisladas o en monocapa sólo fueron claramente significativos en la línea HCT-15, siendo mayor la radiosensibilidad en monocapa (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de la radiosensibilidad entre las células pancreáticas y las células HCT-15 según el método de irradiación

	SF2	α	\bar{D}	\bar{n}
MIA PaCa-2 aisladas versus monocapa	0,690 vs 0,602 (0,154)	0,137 vs 0,237 (0,008)	3,460 vs 2,940 (0,058)	1,80
	<i>0,487 vs 0,602 (0,058)</i>	<i>0,335 vs 0,237 (0,130)</i>	<i>2,735 vs 2,940 (0,058)</i>	
PANC-1 aisladas versus monocapa	0,670 vs 0,672 (1)	0,181 vs 0,169 (0,344)	3,866 vs 3,267 (0,850)	2,58
	<i>0,336 vs 0,672 (0,014)</i>	<i>0,597 vs 0,169 (0,023)</i>	<i>2,245 vs 3,267 (0,014)</i>	
HCT-15 aisladas versus monocapa	0,817 vs 0,536 (0,008)	-0,054 vs 0,312 (0,013)	3,436 vs 2,476 (0,006)	1,80
	<i>0,486 vs 0,536 (0,308)</i>	<i>0,241 vs 0,312 (0,660)</i>	<i>2,437 vs 2,476 (0,659)</i>	

SF2: Supervivencia tras 2 Gy. **\bar{D} :** Dosis Media de Inactivación. **α :** Coeficiente alfa del modelo L-Q. **\bar{n} :** Multiplicidad celular en el momento de la irradiación de células aisladas. **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 versus radiosensibilidad de las células en monocapa.

La radiosensibilidad de las células pancreáticas de nuestro estudio fue parecida a la descrita por algunos autores al examinar otras líneas tumorales humanas no pancreáticas derivadas de localizaciones en las que la radioterapia tiene un papel claramente definido, por ejemplo, en el cáncer de mama, de endometrio o de colon (Tabla 11).

Con la finalidad de analizar una posible similitud entre la radiosensibilidad de las células pancreáticas y las de colon, comparamos las células pancreáticas, MIA PaCa-2, PANC-1 y NP-18, primero con la línea HCT-15 y después con otras líneas colónicas, referidas en la literatura. La comparación es relevante dado que en el cáncer de colon, y especialmente el rectal, la indicación de radioterapia está bien reconocida [NCI, 1990].

Si consideramos la irradiación de células aisladas, la radiosensibilidad de las células pancreáticas fue mayor que la de las células HCT-15 siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4).

Si consideramos sólo la irradiación en monocapa, la radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2, PANC-1 y NP-18 de promedio fue ligeramente inferior a la de las células HCT-15. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en las células PANC-1 y NP-18, pero no en las células MIA PaCa-2 (Tabla 4).

La radiosensibilidad de distintas líneas tumorales humanas de colon (n= 16) referidas en la literatura fue sólo ligeramente superior (rango de SF2 = 0,36 - 0,67) a la de las células pancreáticas en el LIG (Tabla 13). El grado de comparación de nuestros resultados con la literatura es alto puesto que las células se irradiaron en monocapa utilizando un procedimiento muy parecido [Leith, 1991].

In vivo, las células MIA PaCa-2 y las HCT-15 desarrollaron tumores en una proporción muy elevada. La irradiación inhibió el crecimiento tumoral de ambas líneas celulares. La inhibición del crecimiento tumoral fue dependiente de la dosis. Los tumores MIA PaCa-2 fueron más radiosensibles (Tabla 5). La respuesta de los tumores HCT-15 sugiere una resistencia que no mostraron los tumores MIA PaCa-2, hecho que no puede atribuirse a factores externos ya que la calidad de la irradiación, el tamaño tumoral, la oxigenación, etc. fueron controlados. Por ello, es razonable imputar a una mayor radiosensibilidad intrínseca de las células MIA PaCa-2 las diferencias observadas *in vivo*. La dosis requerida para inactivar definitivamente los tumores MIA PaCa-2 (12 - 18 Gy) fue del mismo orden que las dosis administradas habitualmente en la irradiación intraoperatoria [Calvo, 1992].

Tabla 13. Radiosensibilidad de las células pancreáticas y de las células HCT-15 irradiadas en monocapa

	MIA PaCa-2	PANC-1	NP-18	HCT-15	Leith et al.
SF2	0,602	0,672	0,642	0,536	0,490
α	0,237	0,169	0,183	0,312	0,240
\bar{D}	0,940	3,267	3,057	2,593	2,350

SF2: Supervivencia tras 2 Gy; α : Coeficiente alfa del modelo L-Q; \bar{D} : Dosis Media de Inactivación [Leith et al., 1991]

Estos datos sugieren que la radiosensibilidad de las células tumorales pancreáticas puede ser del mismo orden que la de otros tumores en los que habitualmente está indicada la radioterapia y no avalan el concepto ampliamente extendido de una radorresistencia inherente al cáncer de páncreas.

6.2.- ¿PODRÍA LA CORRECCIÓN POR LA MULTIPLICIDAD MODIFICAR LA VALORACIÓN SOBRE LA RADIOSENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS ESTUDIADAS?

La multiplicidad celular, \bar{n} , se define, desde un punto de vista estricto, como el número de células que constituyen una CFU en un momento determinado. Habitualmente, se utiliza para definir el número de células que se han generado por célula sembrada desde la siembra hasta su irradiación. La \bar{n} debe tenerse en cuenta cuando la disgregación de un subcultivo no ha sido perfecta, y por tanto algunas células presuntamente aisladas están constituidas realmente por células unidas entre sí por glicocálix, y cuando las células proliferan durante el tiempo que media entre la siembra y la irradiación. Esta última situación se da cuando es necesario dejar pasar un tiempo para que las células se recuperen del efecto de la disgregación y entren en una fase de crecimiento exponencial.

En un ensayo clonogénico la multiplicidad debe tenerse en cuenta ya que puede condicionar una menor radiosensibilidad (Figura 48). Este efecto puede ser debido a que la irradiación debe inactivar más células y a que la interacción entre células vecinas estimula el crecimiento y la resistencia celular frente a la irradiación [Wells, 1980]. Este último fenómeno, denominado *feeder effect*, es especialmente relevante cuando se irradian cultivos con una elevada densidad celular.

En nuestros experimentos con células aisladas se contempló un tiempo de espera entre la siembra y la irradiación y además existió la posibilidad de una disgregación incompleta. Las células se trataron a distintos intervalos tras la siembra. Al aumentar la multiplicidad se observó una pérdida de radiosensibilidad. En las células MIA PaCa-2, cuando la multiplicidad fue de 1,8, la SF2 fue de 0,771 y la \bar{D} fue de 3,8-91. En cambio, cuando la multiplicidad fue de 5,5 la SF2 fue de 0,837 y \bar{D} la fue de 5,002 (Tabla 7). Debido a la disminución de la radiosensibilidad, decidimos aplicar un método de corrección. De entre los escasos métodos disponibles, hemos utilizado el

de Gerweck [Gerweck, 1994-b] cuyas premisas son que la disgregación de los cultivos origine una mayoría de células aisladas y que la supervivencia sea independiente de la interacción entre células.

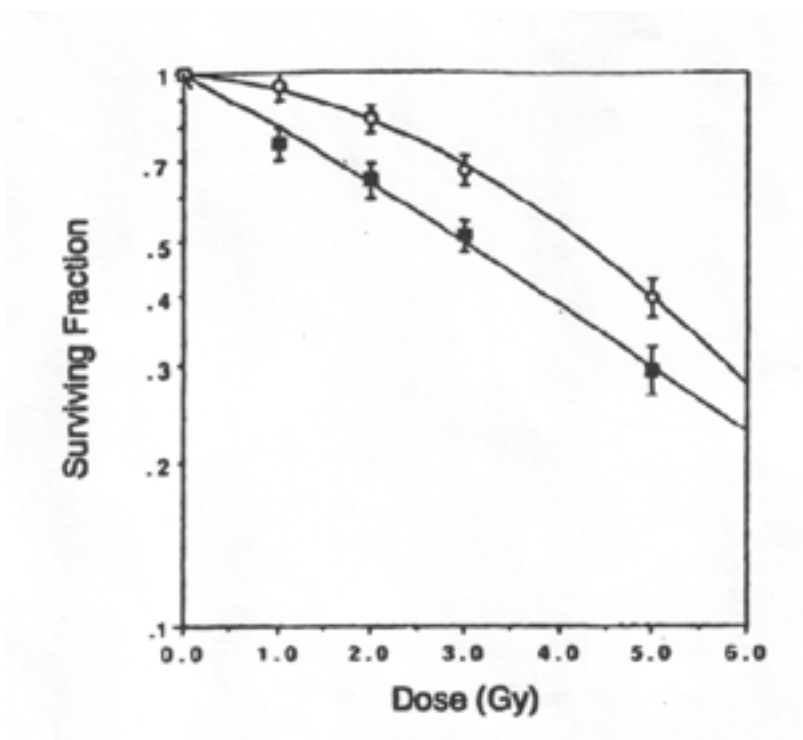


Figura 47. Influencia de la multiplicidad celular sobre la radiosensibilidad

En las curvas de la izquierda la \bar{n} inicial fue de 1,5 y en el momento de la irradiación de 1,8. (○) Sin corrección por la \bar{n} . (■) Con corrección por la \bar{n} media en el momento inicial (tras la siembra) y en el momento de la irradiación. [Gerweck, 1994-b].

Después de corregir por la \bar{n} (1,8), la SF2 de la línea MIA PaCa-2 pasó de 0,771 a 0,548, $p = 0,046$ (Tabla 7 y 8). Teóricamente, dicha disminución equivaldría a la radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2 si en lugar de 1,8 células por CFU en realidad hubiera habido en el momento de la irradiación sólo 1 célula. Según la curva de supervivencia sin corregir (Figura 36), a una supervivencia de 0,548 le corresponde aproximadamente una dosis de 3 Gy. Esto significa que la corrección por una \bar{n} media de 1,8 células, es decir una adición de 0,8 células por CFU, tuvo el mismo efecto sobre la supervivencia que la adición de 1 Gy.

De forma parecida, en las células HCT-15, la radiosensibilidad fue menor a medida que aumentó la multiplicidad (Tabla 9). En estas células, la SF2 disminuyó con la corrección por la multiplicidad. Por ejemplo, con una \bar{n} de 6,2, la SF2 pasó de 0,937 a 0,194, $p = 0,033$ (Tabla 9 y 10). En este caso, la corrección tuvo el mismo efecto que si se hubiera administrado una dosis adicional de 3 Gy (Figura 42).

No obstante, estos métodos de corrección son modelos matemáticos basados en premisas que no siempre se cumplen, por lo que también podrían introducir errores. Por ejemplo, la SF2 de las células HCT-15 pasó tras la corrección de 0,799 a 0,475, $p = 0,041$, cuando la \bar{n} fue de 1,8, lo que representó un incremento de radiosensibilidad del 168 %. Cuando $\bar{n} = 6,2$ (Tablas 9 y 10) se produjo un aumento de la sensibilidad del 482 %. Lo esperable hubiese sido que ambas SF2 (0,475 y 0,194, SF2 a 24 y 72 h, respectivamente), después de la corrección, fueran equivalentes; sin embargo, las diferencias tras la corrección, fueron estadísticamente significativas ($p = 0,041$). Este dato, junto al elevado valor del equivalente en Gy de la corrección, sugiere que en nuestro modelo, podría haberse sobreestimado la corrección por la multiplicidad, sobre todo ante una \bar{n} alta. También, nos hace cuestionar la bondad de la corrección el que el ajuste de la curva de la supervivencia al modelo L-Q fuera menor tras la corrección por la multiplicidad (Figuras 20, 22 y 26).

Es por ello que a lo largo de toda la investigación hemos intentado presentar las dos observaciones con y sin corrección de la multiplicidad ya que probablemente ambas son representaciones limitadas de la misma realidad experimental. En relación a la radiosensibilidad intrínseca debemos destacar que la corrección de la multiplicidad no afectó a ninguna de las observaciones principales. El patrón de radiosensibilidad según el origen de las líneas (páncreas vs colon) se preservó (Tabla 4, en cursiva).

En resumen, tras la corrección se observó un aumento de la radiosensibilidad. Sin ninguna corrección, la radiosensibilidad intrínseca de las células irradiadas aisladas hubiera sido probablemente infraestimada.

6.3.- ¿ES COMPARABLE LA SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS Y LA DE LAS CÉLULAS COLÓNICAS AL 5-FU?

In vitro, sólo dos de las líneas celulares estudiadas, MIA PaCa-2 y HCT-15, fueron sensibles al 5-FU a unas dosis similares a las concentraciones plasmáticas observadas en clínica humana. La resistencia al 5-FU en cáncer de páncreas se ha descrito previamente; no en vano, la tasa de respuestas clínicas al a 5-FU sólo alcanza el 30 % [Evans, 1997-a].

El 5-FU fue aparentemente más activo en exposición continua que en bolus ya que, para un mismo efecto, fueron necesarios más $\mu\text{g/ml}$ por hora en bolus que en incubación continua. Esta observación estaría relacionada con el hecho de que el efecto citotóxico del 5-FU está favorecido por la exposición prolongada cuando el mecanismo de acción fundamental es ciclo-dependiente. Asimismo, el 5-FU fue más citotóxico sobre células aisladas que sobre células en monocapa (Figura 29 y 30). Las células MIA PaCa-2 fueron más sensibles al 5-FU que las HCT-15, aunque, las diferencias únicamente fueron significativas si el 5-FU fue administrado en bolus ($p = 0,037$). No se encontraron referencias bibliográficas sobre la sensibilidad de las células MIA PaCa-2 y HCT-15 al 5-FU.

In vivo, cuando el 5-FU (220 mg/kg) se administró mediante una microbomba osmótica de infusión continua (5 días) no se observó ningún efecto antitumoral. En cambio, al aumentar la dosis (230 mg/kg en una inyección peritoneal) las células MIA PaCa-2 fueron sensibles al 5-FU. La ausencia de efecto del 5-FU en bomba fue probablemente debido a una dosis insuficiente. Por contra, las células HCT-15 no respondieron al 5-FU dado en bomba o en inyección. La coincidencia de una mayor sensibilidad de los xenotrasplantes MIA PaCa-2 *in vitro* e *in vivo* apoya el concepto de valor predictivo de la respuesta celular en ensayos clonogénicos.

Estos resultados sugieren que las células tumorales pancreáticas pueden ser al menos tan sensibles al 5-FU como lo son las células del cáncer de colon, neoplasia en la que el 5-FU es, hoy por hoy, el tratamiento complementario de elección.

6.4.- LA INCUBACIÓN CONTINUA CON 5-FU, ¿RADIOSENSIBILIZA LAS CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS HUMANAS MIA PACA-2?

El efecto citotóxico del tratamiento combinado fue significativamente mayor que el de la irradiación sola, tanto en las células MIA PaCa-2 como en las HCT-15. La radiosensibilidad aumentó tras la administración de 5-FU en bolus o en incubación, aunque el aumento fue mayor en incubación continua (Tabla 7 y 9). Teniendo en cuenta que la radiosensibilización por 5-FU requiere que el 5-FU sea activo contra las células radiosensibilizadas, se desestimó estudiar el efecto del tratamiento combinado en las células PANC-1 y NP-18, ambas resistentes al 5-FU. Se sabe que los mecanismos de acción del 5-FU (citotoxicidad) y los de la radiosensibilización son comunes [Valeriote, 1986].

El objetivo del análisis estadístico fue solamente establecer diferencias entre la radiosensibilidad de las células tratadas con irradiación sola y las tratadas con irradiación más 5-FU. En ningún momento se estableció una comparación entre las células tratadas con el esquema de bolus y las tratadas con el esquema de incubación continua, dadas las diferencias en el protocolo experimental, principalmente en el tiempo.

El tratamiento simultáneo con 5-FU en incubación continua fue claramente más efectivo, a pesar de ajustar por el efecto del 5-FU. Este hecho se definió como una radiosensibilización. La administración en bolus sólo presentó un efecto aditivo. En las células MIA PaCa-2 se observó una radiosensibilización tanto si 5-FU fue administrado antes o después de la radiación. En la línea HCT-15, el 5-FU radiosensibilizó sólo cuando se administró después de la irradiación.

Es relevante cuestionar si la radiosensibilización observada en las células MIA PaCa-2 y HCT-15 en el esquema de incubación continua (y no en el de bolus) fue realmente debida a una mayor duración de la exposición de las células al 5-FU, es decir a que medió algún mecanismo de interacción entre la radiación y el 5-FU exclusivo de la administración en incubación continua, o si por el contrario fue debida a otros factores experimentales, siendo la multiplicidad el factor más plausible que pudo influir.

La administración de 5-FU durante 48 horas radiosensibilizó las células MIA PaCa-2 independientemente de la corrección por la multiplicidad (Tablas 7 y 8). Este resultado no es de extrañar ya que en el diseño experimental se tuvo en cuenta una posible influencia de la multiplicidad sobre la cinética celular. Para ello, se trataron las células (en los experimentos en bolus y en incubación continua) durante la fase de crecimiento exponencial. Se sabe que durante el crecimiento exponencial la proporción de células en una determinada fase del ciclo celular es constante, independientemente del número de células del cultivo [Fresney, 1987]. Una vez superada la fase LAG (estimada en nuestras células MIA PaCa-2 en 48 horas después de la siembra), parece poco probable que la cinética de las células tratadas a las 50 horas (bolus) fuese distinta de las tratadas a las 98 horas (incubación continua), aún a pesar de una distinta multiplicidad. En cuanto a un posible efecto *feeder*, creemos poco probable que tuviera relevancia en la radiosensibilización, sobre todo si tenemos presente que estamos hablando de una diferencia de 3,7 células por colonia en formación entre los experimentos de incubación y los de bolus. Ya se ha comentado previamente que este efecto es más evidente en cultivos de elevada densidad celular [Wells, 1980].

La idea de una escasa influencia de la multiplicidad celular y efecto *feeder* en la radiosensibilización de las células MIA PaCa-2 por el 5-FU en infusión continua, se vio reforzada por los resultados obtenidos con las células HCT-15. Fue en la situación de menor multiplicidad ($\bar{n} = 1,8$) cuando se observó una radiosensibilización. Por contra, en la administración de 5-FU preirradiación y en presencia de una mayor multiplicidad ($\bar{n} = 6,2$) la radiosensibilización se perdió (Tabla 9).

La radiosensibilización en las células MIA PaCa-2 se debió al tratamiento recibido en el esquema adecuado. En las células tumorales humanas HCT-15 esta radiosensibilización no se observó. Esta valoración debe ser matizada por la imposibilidad de descartar de forma definitiva una posible influencia (positiva o negativa) de la multiplicidad celular. En la literatura, en ningún trabajo de tratamiento combinado se ha utilizado una corrección por la multiplicidad en la que pudiéramos apoyarnos. La corrección aplicada se basa en la probabilidad de inactivación de las células por la irradiación, sin que se conozca que se pueda aplicar este modelo cuando otros factores (vg. la influencia del 5-FU sobre la inhibición del crecimiento celular) pueden influir en el resultado final.

6.5.- ¿QUÉ MECANISMOS DE INTERACCIÓN ENTRE 5-FU Y RADIACIÓN PUDIERON ACTUAR SOBRE LA RADIOSENSIBILIDAD EN LAS CÉLULAS MIA PACA-2?

Los hallazgos principales de los experimentos de tratamiento combinado con la línea MIA PaCa-2 han sido la radiosensibilización ligada a la exposición prolongada al 5-FU y la independencia de la secuencia temporal de administración del 5-FU, antes o después de la irradiación. Estos hallazgos son coincidentes con lo descrito previamente en la literatura en otros tipos celulares, principalmente en células tumorales cólicas.

La radiosensibilización observada podría explicarse a partir de todos los mecanismos de interacción entre 5-FU y radiación (que han sido descritos en la Introducción) que son potenciados por una acción prolongada del 5-FU: la inhibición de la TS y de la síntesis (y reparación) del ADN, la inactivación de células en fase S, la redistribución en G1/S, la inhibición del chequeo G1 (progresión hacia S) y G2 y la quimiosensibilización. Sin embargo, los mecanismos por los que el 5-FU y la radiación interaccionan para inducir radiosensibilización son todavía desconocidos y el diseño de este estudio no fue pensado para investigarlos.

El que la radiosensibilización se observase tanto en la secuencia pre- como en la post-irradiación no es contradictorio, dado que pueden coexistir varios mecanismos de interacción y cada uno operar en momentos diferentes. Por ejemplo, podría haberse producido una radiosensibilización por una inhibición de la reparación del ADN tras una exposición prolongada al 5-FU antes de la irradiación [Bruso, 1990] y/o podría haberse producido una radiosensibilización por progresión hacia la fase S de las células MIA PaCa-2 en presencia de 5-FU después de la irradiación. Las células MIA PaCa-2 presentan de forma habitual una mutación del gen p53, que inhibiría el bloqueo del ciclo celular en el punto de control G1/S, con lo que se facilitaría la entrada en fase S, fase sensible al 5-FU [Lawrence, 1997]. Estos u otros procesos bioquímicos pueden explicar la independencia de la secuencia temporal en la respuesta de las células MIA PaCa-2.

Otra posible explicación es que el efecto bioquímico del 5-FU administrado antes de la irradiación hubiese persistido, aún después de haberse eliminado el 5-FU del medio, y de esta forma su acción hubiese perdurado en las horas posteriores a la irradiación, asemejándose la respuesta a la de las células tratadas con 5-FU después de la irradiación.

7.- CONCLUSIONES

1. La radiación inhibió la capacidad clonogénica de las células tumorales pancreáticas humanas MIA PaCa-2, PANC-1, NP-18 y la de las células colónicas HCT-15. La radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2 fue mayor que la de las células HCT-15.
2. La radiosensibilidad de las células tumorales pancreáticas humanas puede ser comparable a la de otros tumores humanos radiosensibles como el cáncer colorrectal.
3. El tratamiento combinado de irradiación y 5-FU inhibió la capacidad clonogénica de las células MIA PaCa-2 y HCT-15 en mayor medida que la irradiación sola.
4. El protocolo de administración del 5-FU influyó en la radiosensibilidad de las células MIA PaCa-2. El 5-FU en bolus tuvo un efecto aditivo sobre la radiosensibilidad, mientras que en incubación continua radiosensibilizó las células MIA PaCa-2.
5. Los resultados de este estudio apoyan, desde un punto de vista pre-clínico, la idea de considerar el tratamiento simultáneo con radioterapia y 5-FU en infusión continua como una vía de investigación en el cáncer de páncreas.

8.- BIBLIOGRAFÍA

Almersjo OE, Gustavsson BG, Regardh CG. Pharmacokinetics studies of 5-Fluorouracil after oral and intravenous administration in man. *Acta Pharmaco Toxicol* 46: 329-336; 1980

Almoguera C, Shibata D, Forrester K. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant *c-k-ras* genes. *Cell* 53: 549-554; 1988

Ardalan B, Glazer R. An update on the biochemistry of 5-fluorouracil. *Cancer Treat Rev* 8: 157-167; 1981

Awwad HK. Dose survival relationships: Methodology, forms, and interpretations. En: *Radiation Oncology: Radiobiological and physiological Perspectives*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1990-a; 19-52

Awwad HK. Hypoxia in solid tumors and normal tissues: clinical implications. En: *Radiation Oncology: Radiobiological and physiological Perspectives*. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, 1990-b; 593-647

Barbour KW, Berger SH, Berger FG. Single amino acid substitution defines a naturally occurring genetic variant of human thymidylate synthase. *Mol Pharmacol* 37: 515-518; 1990

Barendsen GW, Broese JJ. Experimental radiotherapy of a rat rhabdomyosarcoma with 15 MeV neutrons and 300 kV x-rays. I. Effects of single exposures. *Eur J Cancer* 5: 373-391; 1969

Barendsen GW. Differences in radiosensitivity among cells in culture and in experimental tumours: Significance for the effectiveness of human cancer therapy. *Radiother Oncol* 8: 285-300; 1987

Berrozpe G, Scheffer J, Peinado MA. Comparative analysis of mutations in the p53 and *K-ras* genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 13: 185-191; 1994

Berry RJ. A comparison of effects of some chemotherapeutic agents and those of X-rays on the reproductive capacity of mammalian cells. *Nature* 203: 1150-1153; 1964

Berry RJ, Evans HJ, Robinson DM. Perturbations in x-ray dose response in vitro with time after plating: A pitfall in comparison of results obtained by different laboratories using asynchronous cell systems. *Exp Cell Res* 42: 512-522; 1966-a

Berry RJ. Effects of some metabolic inhibitors on X-ray dose-response curves for the survival of mammalian cells in vitro, and on early recovery between fractionated x-ray doses. *Br J Radiol* 39: 458-463; 1966-b

Bhuyan BK, Blowers CL, Neil GL. Partial synchronization of L1210 cells by 5-fluorouracil and its use in drug combinations. *Cancer Res* 37: 3204-3208; 1977

Blackstock AW, Knock L, Branch C. Tumor retention of 5-fluorouracil following irradiation observed using ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36: 641-648; 1996

Boadas J, Balart J, Capella G. Cáncer de páncreas: supervivencia. Bases para una nueva estrategia. *Rev Esp Enferm Dig* 92: 316-320; 2000

Bristow RG, Hardy PA, Hill RP. Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse of murine tumor cell lines. I: Parameters of in vitro radioensitivity and endogenous glutathione levels. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 18: 133-145; 1990

Brooks JR, Brooks DC, Levine JD. Total pancreatectomy for ductal cell carcinoma. An update. *Ann Surg* 209: 405-410; 1988

Bruso CE, Schewach DS, Lawrence TS. Fluorodeoxyuridine-induced radiosensitization and inhibition of DNA double strand break repair in human colon cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19: 1411-1417; 1990

Buckpiit AR, Boyd MR. A sensitive method for determination of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine in human plasma by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 106: 432-437; 1980

Byfield JE, Calabro-Jones P, Klisak I. Pharmacologic requirements for obtaining sensitization of human tumor cells in vitro to combined 5-fluorouracil or fluorouracil and x-rays. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8: 1923-1933; 1982

Calvo F, Azinovic I, Zornoza G. Pancreatic Cancer. En *Medical Radiology. Intraoperative radiotherapy*. FA Calvo, M. Santos, LW Brady, eds. Berlin: Springer-Verlag, 1992; 57-64

Carter SK. The integration of chemotherapy into a combined modality approach for cancer treatment. VI. Pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Treat Rev* 3: 193; 1975

Childs DS, Moertel CG, Holbrook MA. Treatment of malignant neoplasm of the gastrointestinal tract with combination of 5-fluorouracil and radiation. *Radiology* 84: 143-204; 1965

Christophidis N, Vajda FJE, Lucas I. Fluorouracil therapy in patients with carcinoma of the large bowel: a pharmacokinetic comparison of various rates and routes of administration. *Clin Pharmacokinet* 3: 330-225; 1978

Coia LR, Myerson RJ, Tepper JE. Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1213-1236; 1995

Courtenay VD, Smith LE, Peckham MJ. In vitro and in vivo radiosensitivity of human tumour cells obtained from a pancreatic carcinoma xenograft. *Nature* 263, 771-772; 1976

Courtenay VD, Smith IE, Peckham. In vitro and in vivo radiosensitivity of human tumorur cells obtainde from a pancreatic carcinoma xenograft. *Nature* 263: 771-772; 1976.

Cubilla AL, Fortner JG, Fitzferald PJ. Lymph node involvement in carcioma of the head of the pancreas area. *Cancer* 41: 880-887; 1978

Cubilla AL, Fitzgerald PJ. Cancer of the pancreas (nonendorine): A suggested morfologic Classification. *Semin Oncol* 6: 285-297; 1979

Curtin NJ, Harris AI, Aherne GW. Mechanism of death following thymidilate synthase inhibition: 2'-deoxy-5'-trip phosphate accumulation, DNA damage, and grwoth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole. *Cancer Res* 51: 2346-2352; 1991

Davis MA, Axelson MD, Ethier SP. Fluorodeoxyuridine-mediated radiosensitization induced by transduction with HPV-E7. *Radiat Res Soc Proc* 17-324; 1997

Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radio-responsiveness of human tumours and the initial slope of cell survival curve. *Radiother Oncol* 2: 317-323, 1984

Deschavanne PL, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34: 211-266; 1996

Dexter DL, Barbosa JA, Calabresi P. N,N-Dimethylformamide-induced alterations of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 39: 1020-1025; 1979

Diasio RB, Beavers TL, Carpenter T. Familial deficiency of dyhydropyrimidine dehydrogenase: biochemical basis for pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest* 81: 47-57; 1988

Dobelbower RR Jr. Pancreatic cancer. *Gastrointestinal cancer radiation therapy*. Berlín: Springer-Verlag, 1990; 115-143

Doménech Massons JM. *Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores*. Barcelona: Editorial Herder, 1982

Dutreix J, Desgrez A, Bok B. *Física y biofísica: radiaciones*. Madrid: Editorial AC, 1980; 44-58

Elkind MM. The initial part of the survival curve: does it predict the outcome of fractionated radiotherapy? *Radiat Res* 114: 425-436; 1988

Elkind MM, Whitmore GF. *The radiobiology of cultured mammalian cells*. New York: Gordon and Breach, Science Publishers; 1967

Evans DB, Rich TA, Byrd DR. Preoperative chemoradiation and pancreaticoduodenectomy for adenocarcinoma of the pancreas. *Arch Surg* 127: 1335-1339; 1992

Evans DB, Lee JE, Leach SD. Vascular resection and intraoperative radiation therapy during pancreaticoduodenectomy: rationale and technique. *Adv Surg* 29: 235-262; 1996

Evans DB, Abruzzese JLA, Rich TA. Cancer of the pancreas. En: Principles and practice of oncology. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1997-a; 1054-1087

Evans DB. Abstracts de la reunión anual de la American Society of Clinical Oncology, 1997-b

Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer: a metaanalysis. *JAMA* 273: 1605-1609; 1995

Fernández E, La Vecchia C, Porta M. Trends in pancreatic cancer mortality in Europe, 1955-1989. *Int J Cancer* 57: 786-792; 1994

Fertil B, Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 7: 621-629; 1981

Fertil B, Malaise EP. The mean inactivation dose: experimental versus theoretical. *Radiat. Res.* 108: 222-225; 1986

Fialkow ER, Halmiltonm SR, Vogelstein B. Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 458: 283-321; 1976

Flam M, John M, Pajak TF. Role of mitomycin in combination with fluorouracil and radiotherapy, and salvage chemoradiation in the definitive nonsurgical treatment of epidermoid carcinoma of the anal canal: results of a phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol* 14: 2527-2539; 1996

Foo ML, Gunderson LL, Nagorney, DM. Patterns of failure in grossly resected pancreatic ductal adenocarcinoma treated with adjuvant irradiation 5-fluorouracil. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26: 483-489; 1993

Fowler JF. What next in fractionated radiotherapy? *Br J Cancer* 49 suppl. VI: 285-300; 1984

Fowler JF. Alpha, beta, and surviving fraction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24: 188-189; 1992-a

Fowler JF, Lindstrom MJ. Loss of local control with prolongation in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23: 457-467; 1992-b

Fraile RJ, Baker LH, Buroker TR. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil administered orally, by rapid intravenous and by slow infusion. *Cancer Res* 40: 2223-2228; 1980

Frebourg T, Bercoff E, Manchon N. The evaluation of CA 19-9 antigen level in the early detection of pancreatic cancer. *Cancer* 62: 2286-2290; 1988

Fresney RI. Culture of animals cells. A manual of basic technique. New York: Wiley-Liss, 1987; 127-134

Fu KK. Biological basis for the interaction of chemotherapeutic agents and radiation therapy. *Cancer* 55: 2123-2130; 1985

García C. Nuevas líneas celulares tumorales pancreáticas: regulación de la proliferación por EGF y TGF-beta. Alternativas en los mecanismos de control del ciclo celular. Tesis doctoral, Dept. Ciencias químicas, UB. 1997: 90-103

Gelb MH, Tamanoi F, Yokoyama K. The inhibition of protein phenyltransferases by oxygenated metabolites of limonine an perillyl alcohol. *Cancer Lett* 91: 169-175; 1995

Gerweck Le, Zaidi ST, Sietman A.. Multivariate determinants of radiocurability. I: Prediction of single fraction tumor control doses. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29: 57-66; 1994-a

Gerweck LE, Dullea R, Zaidi ZT. Influence of experimental factors on intrinsic radiosensitivity assays at low doses of radiation: cell multiplicity. *Radiat Res* 138: 361-366; 1994-b

Gray LH, Conger AD, Ebert M. The concentration of oxygen solvent in tissues at the time of irradiation as factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26: 638-648; 1953

Grem JL. Fluorinate Pyrimidines. En: Chabner BA y Collins JM, eds. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1990; 180-224

Griffin JF, Smalley SR, Jewell W. Patterns of failure after curative resection of pancreatic carcinoma. *Cancer* 66: 56-61; 1990

Gunderson LL, Willett CG. En: Principles and practice of radiation oncology. Perez C y Brady L, eds. Pancreas and hepatobiliary tract. Philadelphia: Lippincott-Raven publishers. 1997; 1467-1489

Hall EJ. Radiobiology for the radiologist. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1988

Hartman KU, Heidelberg C. Studies on fluorinated pyrimidines. III. Inhibition of thymidylate synthetase. *J Biol Chem* 236: 3006-3013; 1961

Haslam JB, Cavanaugh PJ, Stroup SL. Radiation therapy in the treatment of irresectable adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer* 32: 1341-1345; 1973

Heidelberg C, Griesbach L, Montag BJ. Studies on fluorinated pyrimidines II. Effects of transplanted tumors. *Cancer Res* 18: 305-317; 1958

Heerden JA, Remine WH, Weiland LH. Total pancreatectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Surg* 142: 308-311; 1981

Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 47: 2203-2206; 1987

Herskovic A, Martz K, Al-Sarraf M. Combined chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in patients with cancer of the esophagus. *N Eng J Med* 326: 1593-1598; 1992

Hug O, Kellerer AM. *Stochastik der Strahlenwirkung*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1966

Hughes LI, van Ankeren SC, Rich TA. Radiosensitization of cultured human adenocarcinoma cells by 5-fluorouracil: Effects on cell survival, DNA repair, and cell recovery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23: 982-991; 1992

Hustu HO, Aur RJA, Verzosa MS. Prevention of central nervous system leukemia by irradiation. *Cancer* 32: 585-597; 1973

ICRU Report 50. Prescribing, recording and reporting photon beam therapy. Bethesda: ICRU Publications, 1993

Irie H, Honda H, Kanebo K. Comparison of helical CT and MR imaging in detecting and staging small pancreatic adenocarcinoma. *Abdomin Imag* 22: 429-433; 1997

Johansen J, Bentzen SM, Overgaard J. Relationship between the in vitro radiosensitivity of skin fibroblasts and the expression of subcutaneous fibrosis, teleangiectasia, and skin erythema after radiotherapy. *Radiother Oncol* 40: 101-109; 1996

Joiner MC. The linear-quadratic approach to fractionation. En: *Basic clinical radiobiology*. GG Steel, ed. Great Britain: Edward Arnold Publishers, 1993; 55-64

Kalser MH, Ellenberg SS. Pancreatic cancer adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 120: 899-903; 1985

Keane WF, Crosson JT, Staley NA. Radiation induced renal disease. *Am J Med* 60: 127-137; 1976

Kellerer AM, Rossi HH. The theory of dual radiation action. *Curr Topics Radiat Res Quarterly* 8: 85-158; 1972

Kinsella TJ. Radiosensitization and cell kinetics: clinical implications for S-phase-specific radiosensitizers. *Semin Oncol* 19: 41-47; 1992

Kogel AJ, Ruifrok ACC. Calculations of isoeffect relationships. En: *Basic clinical radiobiology*. GG Steel, ed. Great Britain: Edward Arnold Publishers, 1993; 72-79

Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. *N Eng J Med* 324: 709-715; 1991

Kruglikov IL. What does the mean inactivation dose characterize? *Radiat Research* 133: 391-392; 1993

Kufe DW, Major PP. 5-fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J Biol Chem* 256: 9802-9805; 1981

Latz D, Fleckenstein K, Eble M. Radiosensitizing potential of gemcitabine within the cell cycle in vitro. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 41: 875-882; 1998

Lawrence TS, Tepper JE, Blackstock AW. Fluoropyrimidines-radiation interactions in cell and tumors. *Semin Radiat Oncol* 7: 260-266; 1997

Lawrence TS, Robertson JM, Anscher MS. Hepatic toxicity resulting from cancer treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31: 1237-1248; 1995

La Vecchia C, Boyle P, Franceschi S. Smoking and cancer with emphasis on Europe. *Eur J Cancer* 27: 94-104; 1991

Leith JT, Faulkner LA, Papa G. In vitro radiation survival parameters of human colon tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 20: 203-206; 1991

Li ZR, Yin MB, Arredondo, MA. Down-regulation of c-myc gene expression with induction of high molecular weight DNA fragments by fluorodeoxyuridine. *Biochem Pharmacol* 48: 327-334; 1994

Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Ress W. Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the pancreas. *Int J Cancer* 15: 741-747; 1975

Liehr, R.M., Melnykovych, G. and Solomon, T.E. Growth effects of regulatory peptides on human pancreatic cancer lines PANC-1 and MIA PaCa-2. *Gastroenterology* 98: 1666-1674, 1990

Lu Z, Zhang R, Diasio RB. Purification and characterization of fluorodeoxyuridine dehydrogenase from human liver. *J Clin Chem* 267: 17102; 1992

Lynch HT. Genetics and pancreatic cancer. *Arch Surg* 129: 266-268; 1994

Maase H. Experimental studies on interaction of radiation and cancer chemotherapeutic drugs in normal tissues and a solid tumour. *Radiother Oncol* 7: 47-68; 1986

Mackie CR, Moossa AR. Surgical anatomy of the pancreas. En: Moossa AR, ed. *Tumors of the pancreas*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980; 1-19

Marincola FM, Drucker BJ, Siao DY. The nude mice as model for the study of human pancreatic cancer. *J Surg Res* 47: 520-529, 1989

McCarthy MJ, Evans J, Sagar. Prediction of resectability of pancreatic malignancy by computed tomography. *Br J Surg* 85: 320-325; 1998

McGinn CJ, Miller EM, Lindstrom MJ. The role of cell redistribution in radiosensitization: implication regarding the mechanism of fluorodeoxyuridine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30: 851-859; 1994

- McMinn RMH. Last's anatomy regional and applied. Churchill Livingstone, 1990; 351-354
- Milas L, Takashi F, Hunter N. Enhancement of tumor radioresponse in vivo by gemcitabine. *Cancer Res* 59; 107 - 114; 1999
- Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M. Reporting results of cancer. *Cancer* 47: 207-214; 1981
- Miller EM, Kinsella TJ. Radiosensitization by fluorodeoxyuridine: effects of thymidylate synthase inhibition and cell synchronization. *Cancer Res* 52: 1687-1694; 1992
- Mitchell JB, Russo A. The use of non-hypoxic cell sensitizers in radiobiology and radiotherapy, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1513-1518; 1986
- Moertel, CG, Childs DS Jr, Reitemeyer RJ. Combined 5-fluorouracil and super voltage radiation therapy of locally unresectable gastrointestinal cancer. *Cancer* 2: 865-867; 1969
- Moossa AR, Scott MB, Lavelle-Jones M. The place of total and extended total pancreatectomy in pancreatic cancer. *World J Surg* 8: 895-899; 1984
- Nagai H, Kuroda A, Morioka Y. Lymphatic and local spread of T1 and T2 pancreatic cancer. *Ann Surg* 204: 65-71; 1985
- Nakajima Y, Miyamoto T, Tanabe M. Enhancement of mammalian cell killing by 5-fluorouracil in combination with X-rays. *Cancer Res* 39: 3763-3767; 1979
- Naida JD, Davis MA, Lawrence TS. The effect of activation of wild type p53 functions on fluoropyrimidine-mediated radiosensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 35: 22, 1996
- National Institutes of Health Consensus Conference: Adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. *JAMA* 264:1444-1450;1990
- Neoptolemos JP. Adjuvant radiotherapy and follow-on chemotherapy in patients with pancreatic cancer. Results of the UK Pancreatic Cancer Study Group (UKPACA-1). *GI Cancer* 2: 235-245: 1998
- Novell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497; 1960
- Offerhaus GJ, Tersmette AC, Termette KW. Gastric, pancreatic, and colorectal carcinogenesis following remote peptic ulcer surgery. *Mod Pathol* 1: 352-356; 1988
- Overgaard J. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16:535-549; 1989
- Overgaard J, Horsman MR. Overcoming hypoxic cell radioresistance. En: *Basic clinical radiobiology*. GG Steel, ed. Great Britain: Edward Arnold Publishers, 1993; 163-172
- Palcic B, Skarsgard LD. Reduce oxygen enhancement ratio at low doses of ionizing radiation. *Radiat Res* 100; 328-339; 1984

Partanen T, Kauppinen T, Dergether R. Pancreatic cancer in industrial branches and occupations in Finland. *Am J Ind Med* 25: 851-866; 1994

Peacock JH, Ruiz de Almodóvar M, McMillan TJ. The nature of the initial slope of radiation cell survival curves. *Br J Cancer, Suppl* 24: 57-59; 1992

Perucho M, Schaeffer J, Velazquez A. En: *Facing pancreatic dilemma*. Pederzoli P, Cavallini G, Bassi C, Falconi M, eds. Berlin: Springer-Verlag, 1994; 229-233

Piedbois P, Buse M, Rustum Y. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer; evidence in terms of response-rate. Advanced colorectal meta-analysis project. *J Clin Oncol* 10: 896-903; 1992

Presant CA, Wolf W, Albright MJ. Human tumor fluorouracil trapping: Clinical correlations of in vivo ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy pharmacokinetics. *J Clin Onco* 8: 1868-1873; 1990

Piper AA, Milthorpe BK, Tattersall MHN. Flow microfluorimetric analysis of fluorouracil-induced cytotoxicity in cultured human lymphocytes: Differentiation of RNA- and DNA- dependent cytotoxicity effects. En: *Nucleosids and Cancer treatment*. Tattersall MHH, Fox RM, eds. New York: Academic Press, 1981; 266-286

Puck TT, Markus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exptl Med* 103: 653-666; 1957

Reddy NM, Stevenson AF, Lange CS. Trypsinization and the radiosensitivity of mitotic and log phase Chinese hamster V79 cells exposed to 250 kVp x-rays. *Int J Radiat Biol* 55: 105-107; 1989

Redston MS, Caldas C, Seymour AB. p53 Mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 54: 3025-3033; 1994

Rich TA. Irradiation plus 5-fluorouracil: cellular mechanisms of action and treatment schedules. *Sem Radiat Oncol* 4:267-273; 1997

Rotman MZ. Chemoirradiation: a new initiative in cancer treatment. *Radiology* 184: 319-327; 1992

Ruiz de Almodovar JM, Nuñez MI, McMillan TJ. Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer* 69: 457-462; 1994

Santi DV, Hardy LW. Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-methyl-transferase):evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26: 8599-8606; 1987

Sapti DV, McHenry CS, Raines RT. Kinetics and thermodynamics of the interaction of 5-fluoro-2'deoxyuridylylate and thymidylylate. *Biochemistry* 26: 8606-8613; 1987

Schilsky RL. Biochemical pharmacology of chemotherapeutic drugs used as radiation enhancers. *Sem Oncol* 19: 2-7; 1992

Siegel S. *Estadística no paramétrica*. México: Editorial Trillas, 1979

Smalley RS, Kimler BF, Evans RG. Heterogeneity of 5-fluorouracil radiosensitivity modulation in cultured mammalian cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 24: 519-525; 1992

Smith IA, Courtenay VD, Mills J. In vitro radiation response of cells from four human tumors propagated in immune-suppressed mice, *Cancer Res* 38: 390-392; 1978

Smith JP, Solomon TE, Bagheri E. Cholecystikinin stimulates growth of human pancreatic adenocarcinoma SW-1990. *Dig Dis Sci* 35: 1377-1384; 1990

Sinclair WK, Morton RA. X-ray sensitivity during the cell generations cycle of cultured Chinese hamster cell. *Radiat Res* 29: 450-474; 1966

Sinclair WK. Hidroxiurea: Effects on chinese hamster cells grown in culture. *Cancer Res* 27: 297-308; 1967

Staley CA, Lee JE, Cleary KA. Preoperative chemoradiation, pancreaticoduodenectomy, and intraoperative radiation therapy for adenocarcinoma of the pancreatic head. *Am J Surg* 171: 118-125; 1996

Steel GG, Peckham MJ. Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5: 85-91; 1979

Steel GG, Courtenay VC, Beckham MJ. The response to chemotherapy of a variety of human tumour xenografts. *Br J Cancer* 47: 1-13; 1983

Steel GG. The search for therapeutic gain in the combination of radiotherapy and chemotherapy. *Radiother Oncol* 11: 31-53; 1988

Steel GG, Peacock JH. Why are some tumors more radiosensitive than others? *Radiother Oncol* 15: 63-72; 1989

Steel GG. Clonogenic cells and the concept of cell survival. En: *Basic clinical radiobiology*. GG Steel, ed. Great Britain: Edward Arnold Publishers, 1993-a; 28-39

Steel GG. Combination of radiotherapy and chemotherapy. En: *Basic clinical radiobiology*. GG Steel, ed. Great Britain: Edward Arnold Publishers, 1993-b; 151-162

Tannock IF. The relation between cell proliferation and the vascular system in a trasplanted mouse mamamry tumor. *Br J Cancer* 22: 258-273; 1968

Tannock IF. Treatment of cancer with radiation and drugs. *J Clin Oncol* 14: 3156-3174; 1996

Terasima R, Tolmach LJ. X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells. *Science* 140: 490-492; 1963

The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 324: 1685-1690; 1991

Trevor J, McMillan, Steel GG. Molecular aspects of radiation biology. En: *Basic clinical radiobiology*. GG Steel, ed. Great Britain: Edward Arnold Publishers, 1993; 211-224

Tubiana M, Arriagada R, Cosset JM. Sequencing of drugs and Radiation. *Cancer* 55: 2131-2139; 1985

Tubiana M, Dutrix J, Wambersie A. *Radiobiologie*. Paris: Hermann, 1986

Tucker SL. Is the mean inactivation dose a good measure of cell radiosensitivity?. *Radiat Res* 105: 18-26, 1986

UICC. International Union Against Cancer: TNM Classification of malignant tumours. P. Hermanek, LH Sosin, eds. Berlin/Heidelberg/New York/Tokyo: Springer, 1987

Valeriotte F, Santelli G. 5-Fluorouracil. En: *International encyclopedia of pharmacology and therapeutics*, sección 121: Cell cycle effects of drugs. Sartorelli AC, eds. Oxford: Pergamon Press Ltd, 1986; 85-111

Vietti T, Eggerding F, Valeriotte F. Combined effect of X radiation and 5-fluorouracil on survival of transplanted leukemic cell. *J Natl Cancer Inst* 47: 865-870; 1970

Vijayakumar S, Raudkivi, U Meaney TJ. Mean: inactivation dose (\bar{D}). A critical analysis of a neglected parameter in radiotherapy. *Acta Oncol* 29: 65-72; 1990

Villanueva A, García C, Paules AB. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17: 1969-1978; 1998

Von Hoff DD, Casper J, Bradley E. Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* 70: 1027-1032; 1981

Vokes EE, Weichselbaum R. Concomitant chemoradiotherapy: rationale and clinical experience in patients with solid tumors. *Semin Oncol* 8: 911-934; 1990

Wang FS, Aschele C, Sobrero A. Decrease folypolyglutamate synthetase expression: a novel mechanism of fluorouracil resistance. *Cancer Res* 53: 3677-3780; 1993

Warshaw AL, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma. *N Engl J Med* 326: 455-465; 1992

Watanapa P, Flks B, Oztas H. Duodenogastric reflux enhances growth and carcinogenesis in the rat pancreas. *Br J Surg* 79: 791-794; 1992

Weese JL, Naussbaum ML, Paul AR. Increased resectability of locally advanced pancreatic and periampullary carcinoma with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Int J Pancreatol* 7: 177-185, 1990

Weinert TA, Hartwell LH. The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317-322; 1991

Wells J, Berry RJ, Laing AH. The effect of irradiated feeder cells on the X-ray survival curve shape of freshly explanted human tumor cells and a standard human tumor cell line. *Radiat Res* 81: 150-156; 1980

Weinberg MJ, Rauth AM. 5-Fluorouracil infusions and fractionated doses of radiation: Studies with murine squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 13: 1691-1699; 1987

West CM, Davidson SE, Elyan. The intrinsic radiosensitivity of normal and tumour cells. *Int J Radiat Biol* 73: 409-413; 1998

West CM, Hendry JH. Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *Br J Radiol. Supple* 24: 146-152; 1992

Whittington R, Bryer MP, Haller DG. Adjuvant therapy of resected adenocarcinoma of the pancreas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 21: 1137-1143; 1991

Withers HR, McBride WH. En: Principles and practice of radiation oncology. Perez C y Brady L, eds. Biological basis of radiation therapy. Philadelphia: Lippicott-Raven publishers. 1997; 79-118

WHO, Handbook for reporting results of cancer results of cancer treatment. Geneva: WHO, 1979

Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K. Frequent *c-Ki-ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasia of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 53: 953-956; 1993

Yasuda K, Mukai H, Fujimoto S. The diagnosis of pancreatic cancer by endoscopic ultrasonography in small pancreatic cancer. *Scand J Gastroentero* 19: 9-17; 1988

Yeo CJ, Cameron JL, Lillemore, KD. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas: 201 patients. *Ann Surg* 221: 721-733, 1995

Yohem KH, Slymen DJ, Bregman MD. Radiation survival of murine and human melanoma cells utilizing two assays systems: Monolayer and soft agar. *Br J Cancer* 57: 64-69; 1988

Yunis AA, Arimura GK, Russin DJ. Human pancreatic carcinoma MIA PaCa-2 in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int J Cancer* 19: 128-135, 1977

9.- ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CCK	Colecistocinina
CE	Cloning Efficiency
CFU	Colony-forming Unit
CREP	Colangiopancreatografía Retrograda Endoscópica
\bar{D}	Dosis Media de Inactivación
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DMEN	Dubelcco's Modified Eagle's Medium.
DMSO	Dimetilsulfóxido
DL50	Dosis letal para el 50% de los animales
DSB	Double Strand Break
dUMP	Desoxiuridin Monofosfato
dUTP	Desoxiuridin Trifosfato
dTMP	Desoxitimidin Monofosfato
dTTP	Desoxitimidin Trifosfato
EF	Enhancement Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
5-FU	5-Fluorouracilo
FUMP	Fluor UMP
FdUMP	Fluor dUMP
FdUTP	Fluor dUTP
LIG	Laboratorio de Investigación Gastrointestinal del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
LMDS	Local Multiply Damaged Sites

ñ	Multiplicidad celular
OER	Oxygen Enhancement Ratio
PAAF	Punción Aspiración con Aguja Fina
PBS	Phosphate Saline Buffer
PTV	Planing Treatment Volume
SF2	Fracción Superviviente tras 2 Gy
SSB	Single Strand Break
TGF- α	Transforming Growth factor α
TS	Timidilato Sintetasa
UMP	Uridin Monofostato
UTP	Uridin Trifosfato

10.- GLOSARIO

AZUL TRIPÁN. Colorante vital que en condiciones normales no penetra en el citoplasma de las células. Permite detectar células muertas, que aparecen de color azul al microscopio.

BOTÓN CELULAR. Precipitado formado por células obtenido a través de la centrifugación de una suspensión de células. Permite separar las células del medio de cultivo.

CÁMARA DE NEUBAUER. Dispositivo para contar células constituido por un portaobjetos y un cubreobjetos entre los que se disponen las células en suspensión. El portaobjetos incorpora una rejilla proporcional al número de células por ml.

CLONING EFFICIENCY. Es el cociente entre el número de colonias formadas y el número de células sembradas. Indica la capacidad de unas células para formar colonias. En condiciones ideales la CE podría ser 1.

COLONY-FORMING UNIT. Es una unidad potencialmente clonogénica. Al inicio, debería estar constituida por una célula; sin embargo, a medida que pasa el tiempo el número de células que forman una CFU va en aumento, en razón a la proliferación o multiplicidad celular.

DMSO. Sustancia antioxidante utilizada en la criopreservación.

DOSIS MEDIA DE INACTIVACIÓN. Es el área bajo la curva de supervivencia en coordenadas lineales. Es una medida directamente proporcional a la radiosensibilidad de una línea celular. Se mide en Gy.

dUMP. Ver UMP

dTMP. Ver UMP

FASE LAG. Fase del crecimiento de un cultivo con la que se conoce el período de recuperación de las células tras la siembra. En esta etapa, el crecimiento es nulo o muy lento.

FASE LOG. Fase que sigue a la fase lag. En ella, el crecimiento es exponencial. La expansión de un cultivo alcanza su máximo. La proporción de células en cada fase del ciclo es constante.

FEEDER CELLS. Células cuya actividad metabólica está preservada, pero que han sido letalmente irradiadas y que se utilizan como soporte para que las células con las que se experimenta proliferen con mayor facilidad.

GLUTATIÓN. Es un tripéptido (glutamil-cisteinilglicina) sintetizado durante el transporte transmembrana de los aminoácidos. Es un potente agente antioxidante.

GROWTH DELAY. Tiempo que requiere un tumor experimental en alcanzar de nuevo el volumen que presentaba antes de un tratamiento.

LMDS. Es un tipo de lesión del ADN que se produce por múltiples pequeñas lesiones (cambios de base, roturas simples y dobles) que ocurren en una longitud de ADN de aproximadamente 10 pares de bases. Esta clase de lesiones es muy difícil de reparar.

MULTIPLICIDAD CELULAR, ñ. La multiplicidad celular es el incremento de células que ocurre entre la siembra y el momento del tratamiento.

PTV. El PTV contiene el volumen tumoral conocido (por imágenes, descripción quirúrgica, etc), el volumen tumoral subclínico (más allá de la enfermedad objetivable) y un volumen adicional para que a pesar de los movimientos del paciente la dosis prescrita se administre al volumen tumoral conocido y al volumen subclínico. (El PTV se definió en el Informe 50 de la *International Commission on Radiation Units and Measurements*, en septiembre de 1993, y se ha incorporado extensamente en la práctica médica).

SEMICONFLUENCIA. Estado de un cultivo en el que la mayoría de la superficie cultivable esta ocupada por células. En esta situación el crecimiento celular es exponencial.

SF2. Es la fracción de células (supervivientes) con capacidad para formar colonias tras 2 Gy. Se considera la medida que mejor indica la radiosensibilidad de una línea celular. En terapia se suelen administrar sesiones diarias de 2 Gy.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN CELULAR. Es el tiempo necesario para que el número medio de células por CFU se duplique durante la fase de crecimiento exponencial.

UMP. Precursor del UTP, nucleótido pirimidínico que es necesario para la síntesis de ARN. Su homólogo desoxipentosa, dUMP, se metaboliza a dTMP por acción del enzima timidilato sintetasa. El dTMP es necesario para la síntesis de ADN