

Departamento de Radiología y Medicina Física



Universidad de Granada

**Los esferoides multicelulares como test predictivo de
radiosensibilidad y radiocurabilidad tumoral**

Tesis Doctoral

Manuel Aranda Haro

Granada 2.003

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Manuel Aranda Haro
D.L.: GR 1354-2014
ISBN: 978-84-9028-999-0



Universidad de Granada

Departamento de Radiología y Medicina Física

VICENTE PEDRAZA MURIEL, Director del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada,

CERTIFICA

Que el trabajo titulado “*Los esferoides multicelulares como test predictivo de radiosensibilidad y radiocurabilidad tumoral*”, presentado por el licenciado en Medicina y Cirugía D. Manuel Aranda Haro para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizado en el Departamento de Radiología y Medicina Física bajo la dirección de los doctores Mercedes Villalobos Torres, Nicolás Olea Serrano y Vicente Pedraza Muriel.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Granada a 22 de Julio de 2.003

Prof. Vicente Pedraza Muriel



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Radiología y Medicina Física

MERCEDES VILLALOBOS TORRES, Profesora Titular del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, **NICOLÁS OLEA SERRANO**, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y **VICENTE PEDRAZA MURIEL**, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada,

CERTIFICAN

Que el licenciado en Medicina y Cirugía D. Manuel Aranda Haro ha realizado en el Departamento de Radiología y Medicina Física y bajo nuestra dirección, el trabajo cuya memoria presenta para optar al grado de Doctor en Medicina, con el título:

“Los esferoides multicelulares como test predictivo de radiosensibilidad y radiocurabilidad tumoral”.

dando nuestra conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Granada a 22 julio de 2.003

Profa. Dra

Mercedes Villalobos Torres

Prof. Dr.

Nicolás Olea Serrano

Prof. Dr.

Vicente Pedraza Muriel

La memoria de Tesis Doctoral que lleva como título “*los esferoides multicelulare como test predictivo de radioensibilidad y radiocurabilidad tumoral*” ha sido presentada por el Ldo. Manuel Aranda Haro para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía, habiendo sido dirigida por Dña. Mercedes Villalobos Torres, Profesora titular del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada., D. Nicolás Olea Serrano, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y por D. Vicente Pedraza Muriel, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada.

Fdo. Manuel Aranda Haro

El presente trabajo ha sido parcialmente financiado con el proyecto de investigación FIS 01/1090.

Se agradece igualmente, la ayuda recibida de la Fundación Hospital Clínico de Granada.

Han sido muchos años y muchas las personas que he tenido ocasión de conocer durante todo este tiempo. No sería justo acordarme en estas páginas sólo de las últimas con las que he compartido espacio y tiempo. A todas tengo algo que agradecer y de todas he aprendido algo.

Vaya por delante mi respeto y admiración a mi director de tesis D. Vicente Pedraza Muriel, siempre me ha recibido con agrado, siendo para mí un ejemplo de constancia y rigor en el trabajo.

Sin el consejo, la experiencia y el tiempo que incondicional y amablemente me ha ofrecido mi director de tesis Nicolás Olea Serrano, esta memoria no hubiera pasado de ser una idea que él comenzó a convertirse en realidad.

A Mariano Ruiz de Almodóvar, por atenderme cordialmente en todo lo que he necesitado.

He requerido muchas veces la ayuda de mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Médicas y Biología Tumoral y la he encontrado en todo momento. Gracias a todos.

La parte experimental la he podido desarrollar de modo fluido por el diligente trabajo de las técnicas de laboratorio Concepción Fernández España, Concepción Fernández Guerrero y Francisca Aguilar Torres, ellas solas con su alegría y sus ocurrencias hacen del laboratorio un lugar muy agradable.

A Paqui, por todo lo que cree que sé hacer.

La cooperación del personal de radioterapia del H.U. San Cecilio ha sido inestimable. Gracias por encontrar siempre un hueco para “mis células”.

También he contado con los compañeros del Laboratorio de Anatomía Patológica para facilitarme la utilización del citómetro de flujo.

Los físicos de este hospital me han prestado su ayuda con su buena disposición para poder utilizar a horas “raras” el acelerador de electrones.

Las “cuentas” de Damián han hecho posible trasladar la significación matemática al terreno biológico.

Mi agradecimiento a la Fundación del Hospital Clínico de Granada por facilitar y apoyar este trabajo de investigación.

Por último dar las gracias a las personas que quiero. Como hijo reconozco el esfuerzo realizado por mis padres para darme todo lo que he necesitado, por ellos soy como soy. Mi hermano Fermín ha sido siempre un ejemplo. El me metió el gusanillo de la investigación y con él empecé a conocer lo que todo este mundillo conlleva.

José Villalobos y Pilar Torres siempre pensaron que este momento llegaría aun cuando yo no lo tenía tan claro. Ellos me hacen recordar que, ante todo, soy médico.

Mi íntimo agradecimiento a Mercedes, además de dirigirme con paciencia esta tesis doctoral, su apoyo incondicional y la tranquilidad que en todo momento me aporta, hacen que cualquier dificultad sea superable.

Mis hijos Manolo, Pilar y Carlos han retrasado un poco este trabajo pero sin duda ha merecido la pena.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	FACTORES PREDICTIVOS DE RADIOSENSIBILIDAD	5
1.2	LOS ESFEROIDES MULTICELULARES COMO MODELO TUMORAL..	11
1.2.1	Estructura.....	12
1.3	CÁNCER DE MAMA.....	15
1.3.1	Un problema creciente.....	15
1.3.2	Crecimiento tumoral.....	15
<i>1.3.2.1</i>	<i>Esferoides de las células de cáncer de mama MCF7</i>	<i>17</i>
<i>1.3.2.2</i>	<i>Cinética de proliferación</i>	<i>20</i>
1.4	RADIOSENSIBILIDAD Y RESPUESTA CELULAR A LA RADIACIÓN IONIZANTE.....	23
1.4.1	Respuesta a la radiación de los esferoides multicelulares	23
1.4.2	Radiosensibilidad: daño inducido y reparación.....	26
1.4.3	Radiosensibilidad durante la radioterapia fraccionada	28
1.4.4	Modificadores de la respuesta a la radiación: estrógenos y antiestrógenos	30
2	OBJETIVOS.....	35
3	MATERIAL Y MÉTODOS	39
3.1	INSTRUMENTACIÓN	39

3.1.1	Estufa para cultivos celulares	39
3.1.2	Cámara de flujo laminar	40
3.1.3	Microscopios	40
3.1.4	Contador automático de células	41
3.1.5	Unidad de irradiación.....	41
3.1.6	Sistema de electroforesis de campo pulsado (PFGE).....	41
3.1.7	Transiluminador	42
3.1.8	Sistema de reproducción fotográfica.....	42
3.1.9	Análisis de imagen.....	42
3.1.10	Citómetro de flujo	43
3.1.11	Otros.....	43
3.2	REACTIVOS.....	45
3.2.1	Medios de cultivo.....	45
3.2.2	Suero bovino fetal (FBS)	45
3.2.3	Enzimas.....	45
3.2.4	Reactivo de Hanks (modificado).....	46
3.2.5	Ágar	46
3.2.6	Tampón estándar de fosfato (PBS).....	46
3.2.7	Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE x10)	47
3.2.8	Tampón de lisis.....	47
3.2.9	Agarosa	47
3.2.10	Bromuro de Etidio	48
3.2.11	Disolución de Vindelov	48
3.2.12	Violeta de genciana	48
3.2.13	Hidroxitamoxifeno	48
3.2.14	Estradiol.....	49
3.3	MATERIAL FUNGIBLE.....	50
3.3.1	Material de plástico para cultivos celulares	50
3.3.2	Pipetas	50
3.3.3	Filtros	51
3.3.4	Películas fotográficas	51
3.3.5	Otro material fungible.....	51

3.4	MODELOS TUMORALES	51
3.5	ESFEROIDES MULTICELULARES MCF7	52
3.5.1	Iniciación de los esferoides multicelulares.....	52
3.5.2	Método de preparación del ágar.....	53
3.5.3	Evaluación del tamaño de los esferoides.....	53
3.5.4	Disgregación y conteo del número de células por esferoide.....	53
3.5.5	Cinética de proliferación de los esferoides multicelulares	54
3.6	CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LOS ESFEROIDES MCF 7 SOMETIDOS A IRRADIACIÓN.	56
3.6.1	Retraso del crecimiento o <i>Growth delay</i> (GD)	56
3.6.2	Recrecimiento tras irradiación	57
3.6.3	Probabilidad de control de esferoides (PCS).....	58
3.6.4	Ensayo clonogénico o de formación de colonias.....	59
3.6.5	Lesión molecular inicial radioinducida.....	61
3.6.6	Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	62
3.6.7	Reagrupamiento de cadenas de DNA fragmentado tras irradiación.....	63
3.6.8	Estimación de los parámetros de radiosensibilidad molecular.....	64
3.6.8.1	<i>Método de análisis semicuantitativo</i>	64
3.6.8.2	<i>Determinación del número de rupturas dobles de cadena de DNA. Método de análisis cuantitativo</i>	65
3.6.8.3	<i>Método de estudio de la cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA.</i>	68
3.6.9	Ciclo celular	69
3.6.10	Tratamiento de los esferoides con antiestrógenos.....	70
4	RESULTADOS	75
4.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE ESFEROIDES MCF7. MODELOS MATEMÁTICOS DE AJUSTE.....	75
4.2	EFEECTO DEL ANTIESTRÓGENO HIDROXITAMOXIFENO (OH-TAM) SOBRE LOS ESFEROIDES MCF7.....	77
4.3	RESPUESTA A LA RADIACIÓN DE LOS ESFEROIDES MCF7.....	81

4.3.1	Procedimientos experimentales que no modifican la estructura tridimensional del modelo	81
4.3.1.1	<i>Recrecimiento tras irradiación de esferoides multicelulares</i>	81
4.3.1.2	<i>Control tumoral o cure</i>	87
4.3.2	Procedimientos experimentales que requieren la ruptura de la estructura tridimensional del modelo	91
4.3.2.1	<i>Ensayo clonogénico</i>	91
4.3.3	Ensayos moleculares de radiosensibilidad.....	94
4.3.3.1	<i>Daño inicial radioinducido sobre el DNA</i>	94
4.3.3.2	<i>Cinetica de reagrupamiento</i>	98
4.3.4	Ciclo celular	100
4.3.4.1	<i>Distribución en el ciclo celular de las células de los esferoides MCF7 sometidos a dosis aguda de radiación</i>	102
4.4	RESPUESTA DE LOS ESFEROIDES MULTICELULARES AL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN FRACCIONADA	105
4.4.1	Ensayo clonogénico	105
4.4.2	Distribución de las células en el ciclo celular.....	107
4.4.3	Recrecimiento en monocapa tras irradiación o <i>cure</i>	111
4.4.4	Lesión molecular radioinducida	115
4.4.5	Estimación de la cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA en esferoides multicelulares MCF7.	121
5	DISCUSIÓN	127
	TRATAMIENTO HORMONAL DE LOS ESFEROIDES MCF7	131
	RESPUESTA A LA RADIACIÓN DE LOS ESFEROIDES MULTICELULARES MCF7	135
	RADIOSENSIBILIDAD MOLECULAR DE ESFEROIDES MCF7	144
	COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD EN ESFEROIDES MULTICELULARES MCF7...	148
	RESPUESTA DE LOS ESFEROIDES MULTICELULARES AL TRATAMIENT-O CON RADIACIÓN FRACCIONADA	153
6	CONCLUSIONES	163
7	BIBLIOGRAFÍA	169

Introducción

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, cualquier terapia o protocolo terapéutico novedoso requiere, en primer lugar, ensayos experimentales sobre modelos más o menos complejos para, posteriormente, comprobar mediante ensayos clínicos, si los resultados experimentales son reproducibles clínicamente. En general, los ensayos clínicos se basan en la distribución de forma aleatoria de los pacientes en dos o más protocolos terapéuticos. Generalmente, uno de estos protocolos viene representado por un tratamiento de eficacia conocida, estandarizado, y los otros suponen variaciones cuya eficacia quiere ser comparada. En el caso de que el nuevo protocolo represente un beneficio para el paciente, sería necesario analizar su costo-beneficio en toda la amplitud del término. A este respecto, la inclusión de algún instrumento que ayude a controlar la homogeneidad de la muestra en el proceso de aleatorización es altamente recomendable. El empleo de tests predictivos podrían ayudar a clasificar a los pacientes en función de la susceptibilidad individual a cada maniobra terapéutica y esto significaría una reducción importante de la yatrogenia, sobre todo ante tratamientos con alto coste en salud.

Introducción

El uso de un test predictivo presupone, por otra parte, que la muestra no es homogénea, es decir, que no todos los pacientes incluidos en cada grupo tendrán, en principio, un comportamiento idéntico. Un test predictivo identificaría a aquellos pacientes en los que un determinado tratamiento no sería eficaz o representaría un costo, en términos de morbilidad, mayor en algunos casos que el beneficio obtenido

En la actualidad, las pautas terapéuticas en oncología dependen, esencialmente de las siguientes variables: i) tipo de tumor, ii) estadio evolutivo de la enfermedad y características individuales del enfermo, y pueden incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia o combinaciones de algunas de ellas. La radioterapia juega un papel esencial en el tratamiento del cáncer ya que es curativa en pacientes con enfermedad localizada y, asociada a la cirugía, proporciona también al menos la prolongación del tiempo de supervivencia a los pacientes en los que la enfermedad se limita al plano loco-regional. Autores como Tubiana (Tubiana 1992) y Steel (Steel *et al.*, 1997) apuntan que en el momento del diagnóstico, hasta el 78% de los pacientes pueden estar libres de metástasis y pueden ser curados con tratamientos loco-regionales; además, entre estos pacientes con enfermedad localizada, se estima que en el 30% la radioterapia desempeña un papel relevante. Esto último debe hacernos reflexionar sobre la importancia de que el protocolo aplicado a cada paciente y más concretamente en Radioterapia, debe ser individualizado y adaptado a las necesidades de cada uno de ellos. En esta individualización del tratamiento sería necesario considerar entre los múltiples factores que determinan su elección, los que constituyen en sí mismos el éxito o fracaso de la Radioterapia o, al menos, pueden influir de una forma definitiva. Esto es, la respuesta a la radiación de las células tumorales y los tejidos sanos en cada paciente.

En todo protocolo radioterápico, dejando a un lado las consideraciones particulares, se hace mención a algunos parámetros útiles en la práctica clínica: i) dosis total administrada especificando la dosis por fracción, ii) intervalo entre fracciones y iii) duración total del tratamiento.

Entre los elementos de orden clínico, biológico y molecular teóricamente disponibles para la predicción de la respuesta tumoral a las diferentes modalidades terapéuticas, la estimación de la radiosensibilidad celular intrínseca de los tumores y/o de

los tejidos sanos- una vez asegurada una dosimetría y planimetría precisa que confirmara que las diferencias en radiosensibilidad tienen un carácter intrínseco- constituiría, sin duda, un instrumento de gran utilidad en la terapéutica del cáncer. En este sentido, la reducción en la incidencia de complicaciones de la radioterapia que suponen una pesada carga no sólo para el paciente sino también, a través de su costo, para el sistema de salud, y la mejora en la eficacia terapéutica e incremento en los porcentajes de probabilidad de control tumoral, justifican cualquier intervención investigadora en este campo.

1.1 FACTORES PREDICTIVOS DE RADIOSENSIBILIDAD

Según Brahme, (1999, 2001) para tomar una correcta decisión clínica en Radioterapia, es cada vez más necesario el uso de los conocimientos aportados por la biología de la radiación y la biología molecular del tumor. Un gran número de problemas clínicos, requieren modelos radiobiológicos serios que los resuelvan satisfactoriamente. La esperanza de que en un futuro no muy lejano se pueda disponer de algunos ensayos *in vitro* que valoren la radiosensibilidad de forma rápida, unos pocos días tras la obtención de la muestra biológica del tumor o de los tejidos sanos --fibroblastos, linfocitos-- tomados del paciente, abre nuevas expectativas sobre un tema que ha apasionado vehementemente a los radioterapeutas clínicos durante años: la individualización del tratamiento radioterápico utilizando datos de orden biológico.

El primer paso hacia la individualización de la terapia con radiación, es el establecimiento de un test para la cuantificación de la radiosensibilidad en un tiempo corto tras la obtención de una muestra o biopsia tumoral. Sin embargo, la puesta a punto de este tipo de ensayos predictivos presenta en principio dos graves inconvenientes de orden técnico: i) la imposibilidad de obtener siempre en la clínica, material biológico en condiciones óptimas que posibiliten la realización del ensayo predictivo *in vitro*, y ii) la dificultad, en muchos de los casos, de dar una respuesta individualizada en un período de tiempo lo suficientemente corto que permita su utilización previa al tratamiento con radiación.

Introducción

En este sentido se ha hecho un gran progreso en los últimos años ya que es posible, hoy día, estimar la radiosensibilidad intrínseca de las células tumorales. El test de radiosensibilidad más representativo ha sido sin duda el de supervivencia celular estimada como capacidad de formar colonias tras irradiación. La interpretación de los datos experimentales sin embargo ha sufrido algunos cambios. Resumiendo, las curvas de supervivencia utilizadas para predecir la respuesta de un tumor a la radiación, relacionan la dosis de radiación administrada con la capacidad de formar colonias de las células que sobreviven.

A diferencia de lo que ocurre con las bacterias, en la mayoría de células de mamífero esta relación no es exponencial decreciente sino que las curvas de supervivencia presentan dos componentes diferenciados; un hombro en la región de baja dosis, y el mantenimiento de la relación exponencial a altas dosis ajustándose con suficiente precisión a un modelo denominado lineal cuadrático cuya expresión matemática es:

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

El coeficiente α estaría relacionado, según el Modelo del Daño Letal - Potencialmente Letal de Curtis (Curtis, 1986) con la eficacia de la radiación en producir lesiones letales (no reparables) sobre la célula, mientras que el coeficiente β reflejaría la contribución, en términos de probabilidad de muerte celular, de los mecanismos de interacción de lesiones potencialmente reparables o de la fijación del daño subletal radioinducido.

El estado actual de la interpretación de las curvas de supervivencias tras irradiación considera que: i) el modelo lineal-cuadrático se ajusta con suficiente precisión a los datos experimentales; ii) la pendiente inicial de la curva está dominada por un componente lineal de muerte celular; iii) este componente lineal podría ser debido a la producción de lesiones severas en el ADN, probablemente por los racimos de ionización producidos al final de la trayectoria de los electrones; iv) que los cambios de radiosensibilidad observados en distintas líneas celulares se traducen, en mayor o menor medida, en valores diferentes de la magnitud de uno o de ambos parámetros; v) que las lesiones severas del ADN consisten en las denominadas lesiones locales en múltiples sitios

(LMDS, *Local Multiply Damaged Sites*), entendidas como la existencia de un pequeño número de lesiones (lesión de bases, rotura simple de cadena, rotura doble de cadena) en una escasa longitud de ADN (en torno a los 10 pares de bases) y vi) que la modificación de la pendiente inicial depende de la habilidad de los factores implicados en la reparación para actuar sobre sublesiones individuales.

Clínicamente, los datos presentados por el grupo francés del Institute Gustave-Roussy de Francia, (Fertil y Malise, 1981,1985; Malaise *et al.*, 1987) y confirmados por los investigadores del Institut for Carcer Research de Sutton (Deacon *et al.*, 1984) sugirieron que, la relación dosis de radiación /supervivencia celular estimada en la región inicial de las curvas de supervivencia realizadas *in vitro* puede ser un buen indicador de la respuesta del tumor clínico a la radioterapia. La fracción de supervivencia tras una dosis única de 2 Gy -FS 2Gy- se presentó como un método fiable para comparar la respuesta a la radiación de líneas celulares *in vitro* con la radiorrespuesta clínica de idénticas estirpes tumorales, por lo que se propuso que este parámetro calculado de forma individual podría ser de utilidad en la predicción de la respuesta al tratamiento radioterápico en tumores clínicos (Fertil y Malaise, 1981,1985). Revisiones posteriores (Eschwege *et al.*, 1997) no son concluyentes respecto a esta asociación.

Independientemente de las variaciones metodológicas que ha sufrido el ensayo de clonogenicidad *in vitro*, ya que en el test de predicción de respuesta la estimación de la radiosensibilidad se hace a niveles de dosis clínicamente significativos (1,5-2 Gy), su empleo rutinario en la clínica ha demostrado ser de gran utilidad en el planteamiento del tratamiento con radiación (Deacon *et al.*, 1984; West 1995; Buffa *et al.*, 2001; Girinsky *et al.*, 1998). No obstante algunas dificultades de orden técnico han añadido alguna complejidad a la realización de un test predictivo *in vitro*. Así por ejemplo, la influencia de las células no tumorales incluidas en la biopsia tomada del paciente podría desvirtuar un ensayo que pretenda hacer una estimación rápida de la sensibilidad a la radiación. Por otra parte, los ensayos de clonogenicidad tumoral realizados en agar blando *in vitro* se fundamentan en la idea de que el número de células con capacidad de crecimiento en este medio refleja de forma cuantitativa la habilidad del tumor clínico de recrecer *in situ* una vez tratado. Tal correlación parece ser cierta, al menos, en la predicción de la respuesta a la

Introducción

radiación (West, 1995), si bien se discute si realmente una célula incapaz de generar una colonia en el ensayo *in vitro* es una célula no importante desde el punto de vista radiobiológico o una célula quiescente en un medio no favorable para dividirse (Hoffman, 1991; Gura, 1997).

Durante los últimos años, han surgido dudas sobre la validez de la estimación puntual de la radiosensibilidad celular efectuada al inicio del tratamiento con radiación, ya que se sospecha que ésta pueda no ser constante durante el curso de la radiación fraccionada. En efecto, el resultado de un test *in vitro* basado en una simple determinación de la muerte celular puede *a priori* quedar afecto de excesiva incertidumbre. De una parte por la dificultad en la definición de los límites de confianza de la estimación propuesta. De otra, porque la estimación de la sensibilidad a una sola dosis se hace sobre la región de la curva de supervivencia a baja dosis (2 Gy) en donde el peso de la respuesta de las células tumorales más sensibles a la radiación puede ser preferente, mientras que la destrucción definitiva del tumor por radiación -radiocuración- podría descansar sobre la sensibilidad de las células más radiorresistentes. Es razonable pensar que cualquier curva de respuesta tumoral a la radiación realizada *in vitro* representa la suma de la respuesta individual de varias poblaciones celulares con diferente sensibilidad, por lo que el test de radiosensibilidad propuesto podría subestimar la heterogeneidad tumoral (Suwinski *et al.*, 1999). Surge por tanto la duda de que la estimación de la radiosensibilidad celular efectuada a dosis clínicas, sobre los primeros puntos de la curva de supervivencia, y antes de haber comenzado el tratamiento con radiación, en la predicción de la radiorrespuesta tumoral en protocolos de tratamiento con irradiación fraccionada, sea el procedimiento más adecuado (Stuchke *et al.*, 1995; Djordjevic *et al.*, 1998; Sham y Durand, 1999)

Siguiendo a Hoffman (Hoffman, 1991) las mayores objeciones argumentadas contra los ensayos de clonogenicidad *in vitro* pueden resumirse de la siguiente forma: i) la baja eficacia de crecimiento de las células tumorales obtenidas en la disgregación de la muestra tumoral. De hecho, se sitúa en torno a 1 por cada 10.000 células las que tienen capacidad de crecer, por ejemplo, en un test en ágar, lo que trae consigo que en series grandes como la de San Antonio (Von Hoff, 1990) de 14.000 muestras tumorales ensayadas en tan solo un 30% hubiera un crecimiento adecuado como para ser

objetivamente analizado; ii) la lentitud en la generación de resultados; iii) la dificultad, en algún caso, en distinguir colonias verdaderas de agregados celulares, iv) la imposibilidad de diferenciar células reversiblemente situadas en estadios no proliferativos del ciclo divisorio de células en que su capacidad divisoria ha sido permanentemente anulada por la medida terapéutica a evaluación y, v) la pérdida de la estructura tridimensional y el contacto celular característico de la morfología tumoral y moduladores de la respuesta celular a la radiación y/o drogas antineoplásicas.

En línea con la última de las observaciones presentadas se han propuesto diferentes aproximaciones técnicas con objeto de resolver la artificialidad impuesta por la disgregación de los especímenes tumorales para el ensayo clonogénico. Una de las propuestas más apropiadas parece ser aquella en la que la muestra tumoral se somete a una digestión suave de tal manera que se generan estructuras en forma de agregados celulares que semejan histológicamente la estructura tisular tumoral.

Las principales ventajas de los tests de predicción de respuesta a terapias antitumorales que emplean fragmentos de tejido tumoral son: i) la conservación de la arquitectura tisular tridimensional; ii) el uso de criterios histológicos en la evaluación del efecto; iii) la alta probabilidad de establecimiento de los mínimos para que la muestra se mantenga *in vitro* al menos durante un período de dos semanas; iv) la posibilidad de testar varios agentes simultáneamente o consecutivamente y, por último, v) la posibilidad de testar fragmentos tumorales y de tejido normal en un mismo ensayo.

Parece ser que uno de los mayores inconvenientes del test propuesto por Hoffman es su gran laboriosidad, por lo que el éxito de su empleo queda mediatizado por la habilidad técnica y la experiencia alcanzada por el experimentador.

Por otro lado, parece existir una evidencia clara de que la radiosensibilidad de los tejidos sanos estimada en los pacientes sometidos a tratamientos con radiación ionizante puede ser útil para identificar aquellos con una alta probabilidad de sufrir reacciones severas (West y Hendry, 1992; López *et al.*, 2002). Por esta razón, se han popularizado los tests de radiosensibilidad que emplean fibroblastos o linfocitos periféricos en orden a identificar entre la población de individuos sometidos a tratamiento con radiación

Introducción

ionizante ese subgrupo de pacientes en los que la dosis total de radiación administrada al tumor queda comprometida por la alta morbilidad del tejido sano.(Núñez, *et al.*, 1998; López *et al.*, 2002; Ruiz de Almodóvar, *et al.*, 2002; Popanda *et al.*, 2003). De igual forma, se podrían identificar aquellos pacientes que al presentar menor radiosensibilidad del tejido sano podrían ser susceptibles de un tratamiento radioterápico más agresivo y por tanto con mayor probabilidad de control tumoral.

Por último, se hace necesario hacer notar el interés despertado por la aplicación de forma rutinaria de los tests moleculares de respuesta a la radiación y a los agentes antineoplásicos. En este sentido, la estimación de la lesión producida sobre el DNA por la radiación ionizante o por los compuestos químicos usados en el tratamiento del cáncer, parece correlacionar de forma muy precisa con los resultados de tests más laboriosos y complejos como el ensayo clonogénico (Siles *et al.*, 1996; Dahlberg *et al.*, 1999; Ruiz de Almodóvar *et al.*, 2002). De hecho, se acepta que la rotura doble de cadena de DNA (rdc) es la lesión responsable de la muerte celular. Radford (Radford, 1986) demostró que la modificación de las condiciones de irradiación que afectan a la producción de rdc provoca cambios en la supervivencia celular. Asimismo, la capacidad de reparación de las lesiones producidas por la radiación sobre el ADN (Núñez *et al.*, 1995) y de las alteraciones sobre moléculas como la proteína p53 o p16 relacionadas con el proceso de muerte celular por apoptosis (Siles *et al.*, 1998; Lotem *et al.*, 2003) son vías cuya implementación de forma experimental en la clínica servirán para confirmar los hallazgos preliminares y ver si responde a las grandes expectativas levantadas.

Desafortunadamente, la estimación de muchos de los factores que condicionan la radiocuración no pueden hacerse en tumores humanos *in vivo* sin vulnerar las reglas éticas. Además, su implementación de forma rutinaria choca con dificultades técnicas de difícil resolución. Por este motivo se han buscado modelos alternativos *in vitro* en los que los fenómenos de redistribución en el ciclo celular, progresión y repoblación que ocurren en el curso de la radioterapia fraccionada, así como la reparación de la lesión celular subletal, puedan ser tenidos en cuenta a la hora de evaluar la respuesta global de la población tumoral a la radiación ionizante.

El modelo de elección deberá permitir que cada factor pueda ser analizado por separado, bien por eliminación de los otros o mediante el diseño de protocolos experimentales en que una de las variables sea claramente dominante.

1.2 LOS ESFEROIDES MULTICELULARES COMO MODELO TUMORAL.

En 1977, T.C. Hsu (Hsu, 1977) resumía en los siguientes puntos las ventajas de la utilización de los sistemas de cultivo celular sobre los animales de experimentación: i) los cultivos celulares proveen una fuente inagotable de material cuya característica principal es la homogeneidad; ii) las células *in vitro* pueden manipularse de forma que no es posible hacerlo con poblaciones *in vivo*; iii) las células en cultivo pueden ser almacenadas en condiciones especiales, sin que al recuperarlas hayan cambiado ni sus cualidades proliferativas ni su composición genética; iv) el uso de los cultivos celulares supone menor inversión económica que el mantenimiento y manipulación de animales de experimentación y, v) la utilización de los cultivos celulares ahorra muchas vidas animales.

Son muy numerosos los estudios que abordan los tratamientos experimentales en cáncer utilizando modelos tumorales *in vitro*. Con frecuencia se trata del cultivo de células tumorales establecidas creciendo en monocapa en los que las células crecen adheridas al soporte plástico de forma tal que el aporte de nutrientes es igual para todas las células y la proporción de células en las distintas fases del ciclo se mantiene constante. En otras ocasiones se utilizan primocultivos procedentes de biopsias tumorales que a pesar de su difícil manipulación, proporcionan información *personalizada* de la respuesta tumoral. Con menor frecuencia se han usado modelos experimentales, que reproducen en mayor medida las condiciones de proliferación celular de un tumor real, como en el caso de los esferoides multicelulares.

1.2.1 Estructura

Los esferoides tumorales son agrupaciones celulares que crecen en suspensión *in vitro* sin ningún soporte sólido, en donde los elementos formes que los constituyen se unen fuertemente entre sí y reproducen estructuras que reflejan, en diferente grado, la organización tisular de la que proceden. Hasta el momento presente se han obtenido esferoides multicelulares a partir de líneas celulares tumorales establecidas (Carlsson *et al.*, 1983; Tsukikawa *et al.*, 2003; Kelm *et al.*, 2003), primotransplantes (Moore *et al.*, 1987; Riccalton-Banks *et al.*, 2003;) y especímenes quirúrgicos (Rofstad, 1986; Tonn *et al.*, 1999) procedentes tanto de tejidos humanos como animales.

Los esferoides tumorales multicelulares presentan cualidades biológicas comunes con los tumores sólidos (Acker *et al.*, 1984; Mueller-Kliesser, 1987; Olive y Durand 1994), pudiendo simular las metástasis en sus primeras etapas de desarrollo constituyendo así un modelo fundamental en la investigación de la biología del cáncer (Olea *et al.*, 1992; Kunz-Schughart, 1999; Oloumi *et al.*, 2002). El crecimiento de los esferoides multicelulares es consecuencia de la multiplicación de los clonógenos de la población celular que los constituye, crecimiento que puede ser manipulado modificando las condiciones medio ambientales en donde éstos se desarrollan. Los esferoides de gran tamaño presentan, invariablemente, áreas de necrosis central como consecuencia de la muerte celular provocada por la disminución local de oxígeno, déficit en el aporte de nutrientes y descenso del pH (Gorlach y Acker, 1994; Rofstad *et al.*, 1996; Hamilton, 1998).

Al igual que los tumores en animales de experimentación, tienen unas características de crecimiento - tiempo de duplicación del volumen, distribución en el ciclo celular, densidad de empaquetamiento y adherencia intercelular- que los hacen muy semejantes a los tumores humanos *in vivo*; sin embargo dos factores los hacen claramente diferentes de éstos: i) la ausencia de vascularización, lo que supone que oxígeno y nutrientes se suplen enteramente por difusión y, ii) la inexistencia de un hospedador, por lo que el sistema inmune o la respuesta antitumoral de éste no influyen sobre el devenir de la

población celular, al menos en los modelos de esferoides más sencillos (Chignola *et al.*, 1994).

La respuesta de los esferoides a la radiación y sus posibilidades predictivas acerca del comportamiento tumoral, dependen en gran medida de su estructura y de su cinética de crecimiento.

La distribución compartimental de la población celular en los esferoides multicelulares, en los que se distinguen células bien oxigenadas con alta capacidad proliferativa frente a células hipóxicas con baja actividad divisoria pero potencialmente clonogénicas, ha servido para que el modelo tumoral constituya una de las herramientas más útiles para el estudio de la respuesta tumoral a la radiación (Durand, 1990; Santini *et al.*, 1999).

En los esferoides de menor tamaño no existe el déficit en la oxigenación celular, por lo que los determinantes que predominan en la respuesta a la radiación son: i) el efecto del contacto célula-célula, (Moussa *et al.*, 2000), ii) la disposición *tridimensional* del núcleo celular y la cromatina (Illiakis *et al.*, 1991; Olive, 1994; Biade *et al.*, 2001) y, iii) las diferencias en reparación del daño celular (Dertinger y Hulser, 1981; Durand y Sutherland, 1984).

El modelo de los esferoides multicelulares puede ser utilizado en experimentación en el campo de la respuesta tumoral a la radiación o los agentes quimioterápicos antineoplásicos aprovechando todas y cada una de las características que definen el modelo en sí mismo y con indudables ventajas sobre el cultivo bidimensional en *monocapa* (Steeg *et al.*, 1994). Así, por ejemplo, se puede obtener información referente a: i) distribución en el ciclo celular, ii) nivel de oxigenación, iii) difusión intercelular de nutrientes y fármacos, iv) heterogeneidad en la presentación de antígenos de diferenciación, v) efecto del contacto y la interacción célula-célula y, vi) la disposición tridimensional de la cromatina.

El efecto de la radiación puede ser estimado en los esferoides multicelulares en la misma forma y con los mismos criterios que en los tumores sólidos: i) supervivencia celular en un ensayo clonogénico tras disgregación del esferoide en sus elementos formes

Introducción

constituyentes, ii) cinética de crecimiento de los esferoides tratados con respecto a esferoides no tratados y, iii) control tumoral o *curación* -tomado directamente del término inglés *cure*- que traduce la capacidad del esferoide para recrecer en monocapa una vez tratado.

En nuestro caso, se hace necesario un modelo esferoidal de cáncer de mama que reproduzca, en la medida de lo posible, las características de crecimiento y sensibilidad hormonal del tumor.

1.3 CÁNCER DE MAMA

1.3.1 Un problema creciente

La incidencia de enfermedad neoplásica en Europa (excluyendo los cánceres de piel no melanoma) es del orden de $1,4 \times 10^6$ nuevos casos por año. Concretamente, el cáncer de mama ha ido aumentando alrededor de un 2% anualmente desde 1980 alcanzándose en el momento actual una incidencia anual de alrededor de 135.000 casos nuevos en la Unión Europea y 184.000 en Estados Unidos (Black *et al.*, 1997; Landis *et al.*, 1999). La tasa de mortalidad es de aproximadamente 18 por 100.000 cada año. Causa la muerte a casi 58.000 mujeres al año en la Unión Europea y a 46.000 mujeres sólo en los Estados Unidos. En estos países, el riesgo acumulado a través de la vida de la mujer para desarrollar cáncer de mama esporádico es del 12,2 % (Hankey *et al.*, 1990). Considerando además que los avances terapéuticos no han dado el resultado deseado ya que hoy día constituye la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres, se hace necesario investigar nuevos protocolos terapéuticos y, a la vez, mejorar en términos de morbilidad y calidad de vida del paciente los protocolos ya existentes.

1.3.2 Crecimiento tumoral

El índice proliferativo de los tumores primarios del cáncer de mama y de sus metástasis es un factor altamente importante para la supervivencia y está determinado por una compleja serie de eventos interrelacionados que representan un equilibrio entre ganancia de células, proliferación celular, y pérdida de células. La ganancia de células está determinada a su vez por la fracción de la masa celular tumoral que se divide activamente, fracción de crecimiento (GD) y por el tiempo que cada célula en vías de división consume para completar el ciclo celular, tiempo de ciclo, (Tc) (Tubiana, 1983).

Introducción

Mientras un tumor crece también pierde células debido a la muerte celular por anoxia y déficit nutritivo y al desprendimiento de células tumorales en la circulación vascular o linfática (metastatización) o en una cavidad corporal vecina. En consecuencia, el tiempo de duplicación real (TD) de un tumor representa el efecto neto de estos procesos concurrentes (Spratt y Spratt 1979).

Spratt y Spratt (1979) proponen dos patrones distintos de crecimiento tumoral:

- Crecimiento lineal: describe una población tumoral en la cual las dimensiones de la masa resultante aumentan en una magnitud específica cada día, incremento que no es modificado por el tamaño tumoral. Este patrón implica que la mayor parte de la proliferación celular tiene lugar solamente en la periferia de la masa.

-Crecimiento exponencial: mediante el cuál el tumor muestra un incremento aleatorio constante del volumen por unidad de tiempo. Este modelo requiere un ciclo celular uniforme y un índice uniforme aunque aleatorio de ingreso de células en el proceso de división celular. Además, la pérdida de células debe ser mínima o por lo menos constante.

Sin embargo, existen numerosos factores capaces de afectar la velocidad de crecimiento de los tumores humanos. Por ejemplo, a medida que el tamaño tumoral aumenta, una parte del tumor puede sufrir un déficit importante en el aporte sanguíneo y desarrollar zonas de necrosis o isquemia. En consecuencia, el índice de proliferación celular puede variar incluso en el seno de un mismo tumor. En el caso concreto del cáncer de mama, el crecimiento también se afecta de forma significativa por mecanismos hormonales, sobre todo estrógenos y factores de crecimiento, que unas veces operan como estimulantes y otras como inhibidores (Niederhuber, 1993).

Esta forma de crecimiento se describe matemáticamente como una función gompertziana en la que la población tumoral experimenta un incremento en el número celular rápido en una fase inicial, pero a medida que su volumen aumenta, la curva de crecimiento dibuja una concavidad inferior y se aproxima a una asíntota horizontal. La disminución potencial de la velocidad de crecimiento a medida que el tumor aumenta de tamaño dificulta la estimación del momento concreto en que se inició el crecimiento

tumoral mediante la simple extrapolación del tiempo de duplicación observado. Sin embargo, a pesar de las características especiales de la curva de crecimiento gompertziana, la medición del tiempo de duplicación durante la fase clínica del crecimiento tumoral puede proporcionar información valiosa.

También es importante reseñar que, si bien el mismo tipo tumoral en diferentes pacientes puede mostrar distintos tiempos de duplicación, las diversas lesiones metastásicas en un paciente individual suelen poseer una velocidad de crecimiento muy uniforme, la cual por lo general es mayor que la de la sesión primaria original (Tubiana, 1983).

1.3.2.1 Esferoides de las células de cáncer de mama MCF7

No siempre con éxito se ha ensayado la formación de esferoides multicelulares a partir de un tejido tumoral mamario (Yuhas *et al.*, 1978; Pourreau-Schneider *et al.*, 1984a). Entre otras razones estos autores han aducido que debido a que muchas de las líneas celulares que proceden de enfermas portadoras de tumores mamarios se establecieron a partir de derrames pleurales metastásicos, las células se adaptaron al crecimiento individualizado en suspensión. En el caso específico de cáncer de mama se han presentado trabajos de establecimiento de esferoides multicelulares con líneas celulares establecidas en monocapa y con muestras de tumores tomadas en la clínica.

Varias líneas celulares de cáncer de mama establecidas en cultivo en monocapa se han mostrado eficaces para crecer en suspensión formando los esferoides multicelulares. El primer informe de crecimiento en suspensión formando esferoides multicelulares de las células de cáncer mamario MCF7 fue presentado en 1978 por Yuhas (Yuhas *et al.*, 1978), aunque con anterioridad estas células ya habían sido adaptadas al cultivo en esponja de celulosa impregnada con colágeno (Russo *et al.*, 1977). Posteriormente Pourreau-Schneider y colaboradores (1984a, 1984b), compararon diferentes substratos capaces de mantener el crecimiento indefinido de las células MCF7, entre los que se incluía el crecimiento en suspensión formando esferoides multicelulares. Pero el trabajo más amplio realizado con las células MCF7 corresponde a las publicaciones de nuestro grupo (Olea *et*

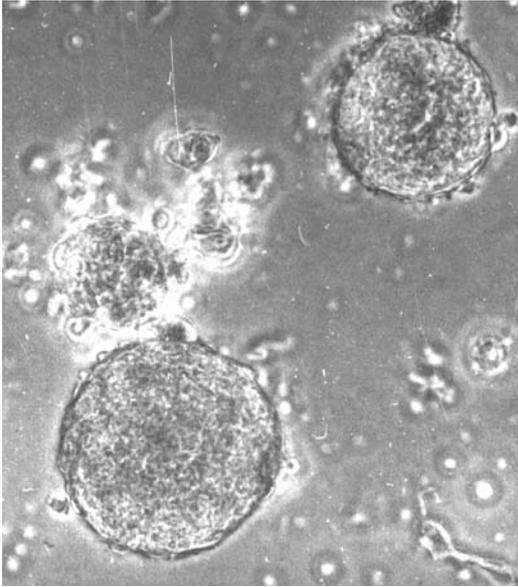
Introducción

al., 1992, 1994; Villalobos *et al.*, 1995; Guirado *et al.*, 2003). Con posterioridad el modelo ha sido empleado con muy diferentes propósitos (Beaupin *et al.*, 1993; Chignola *et al.*, 1994). Las características morfológicas, cinética de crecimiento y la expresión de marcadores de diferenciación han sido descritas por nuestro grupo y comparadas entre sí cuando el cultivo se realiza en diferentes condiciones experimentales: presencia o ausencia de estrógenos y antiestrógenos.

De forma resumida estos datos experimentales indican: i) La necesidad del cultivo en presencia de estradiol para que los esferoides se inicien, lo que indica una dependencia hormonal clara en el proceso de organización tridimensional, ii) la necesidad de originar los esferoides a partir de un número mínimo de células, y iii) la siembra de éstas en una superficie apropiada que impida la adherencia al sustrato del cultivo.

Dos parámetros determinan la cinética inicial de la agregación celular de los esferoides MCF7. Uno que hace referencia a la frecuencia de colisión de las células, depende de las características físicas del sistema experimental escogido para la iniciación de los esferoides. El segundo, también relacionado con las condiciones físicas del medio, parece ligado a las propiedades biológicas de las superficies celulares que interaccionan. De forma resumida se puede considerar que el primero de estos factores es dependiente, casi exclusivamente, de la concentración de elementos formes en el medio de cultivo. A este respecto, hemos podido observar cómo la concentración de células MCF7 inoculadas por unidad de volumen de medio para iniciar los esferoides, predetermina tanto el número de esferoides resultantes como su tamaño.

El examen microscópico de los esferoides de células MCF7 pone en evidencia que mientras algunas células desarrollan sus diámetros longitudinales y crecen en la superficie externa del esferoide, la mayoría adoptan formas esféricas o globulares como se ha descrito para el modelo esferoidal (Podczeczek y Newton, 1994).



La forma globular que adoptan los elementos formes que componen el esferoide así como la esfera que es en sí mismo el agregado multicelular, determinan que en los esferoides la relación superficie/volumen alcance valores mínimos. Se puede fácilmente deducir que la superficie celular total expuesta al medio extracelular es tan solo de un 5%. Este valor es claramente inferior al encontrado para los cultivos en monocapa, en donde la superficie en contacto con el medio extracelular alcanza

al 50 % del total. Por otra parte, el empaquetamiento de los elementos formes en los distintos niveles del esferoide parece igualmente responsable de la extensión del espacio intercelular. Espacios extracelulares del 40-50% han sido observados en tejidos tumorales *in vivo*. Una cierta aproximación a la cuantificación del espacio extracelular de los esferoides puede hacerse si se conoce el número de células por esferoide y el volumen correspondiente al tamaño celular medio. La discrepancia existente entre la previsión teórica y el contenido real de células de los esferoides, se podría explicar por el desarrollo de necrosis en la región central de los esferoides de gran tamaño.

Ahora bien, como el volumen ocupado por el área central necrótica en los esferoides de tamaño medio corresponde a un espacio útil capaz de albergar tan solo a unos pocos elementos celulares, es evidente que la necrosis intraesferoidal tiene poco que ver con la citada discrepancia. Probablemente la razón última de la discordancia resida en la existencia dentro de los esferoides, de un importante espacio intercelular cuya estimación indirecta parece superar el 50% del volumen total.

1.3.2.2 Cinética de proliferación

Durante las primeras fases del crecimiento, acabada la fase de agregado inicial, las células tienen un acceso directo al medio de cultivo. Más tarde, por el contrario, en las capas más internas del esferoide, a partir de un determinado valor de diámetro del esferoide, se hace ostensible una población celular anóxica. Las células MCF7 cuando se mantienen en condiciones basales de iniciación, desarrollan esferoides que a partir de un diámetro medio de 350 μm comienzan a mostrar signos de necrosis en su región central y adoptan una particular estructura consistente en un anillo de espesor variable de células viables que rodean a un centro necrótico. El estudio de la relación existente entre el radio del centro necrótico y el radio del esferoide permitió calcular algunos parámetros de especial importancia.

La relación existente permite, extrapolando la recta de regresión a valores iguales a 0 para la necrosis central, concluir que: el esferoide de mayor tamaño compatible con la inexistencia del núcleo de necrosis central tendrá menos de 320 μm de diámetro. La profundidad mínima, contada desde la superficie externa del esferoide, en la que aparecen fenómenos de necrosis es de aproximadamente 160 μm (Olea *et al.*, 1992)

Mediante la medida diaria de los diámetros ortogonales de los esferoides multicelulares MCF7 mantenidos en condiciones basales de cultivo, se pueden conocer las características del crecimiento de los mismos, que ajustan, en lo esencial, con las observaciones descritas para otros esferoides multicelulares. Tras la formación de los agregados celulares iniciales, la cinética de proliferación de los esferoides multicelulares MCF7 ajusta bien al modelo matemático gompertziano descrito para tumores *in vivo*.

La expresión cuantitativa de los incrementos de volumen de los esferoides MCF7 ha permitido realizar ajustes matemáticos a ecuaciones de diverso origen con los datos experimentales de crecimiento. Así, se analizaron los modelos empíricos de Gompertz, logístico o de Verhulst-Pearl y el de Bertalanffy (Olea *et al.*, 1994). Se han deducido los

valores de las constantes incluidas en cada una de estas ecuaciones y los límites de precisión del ajuste.

El modelo de Gompertz supone que el crecimiento tumoral está gobernado por dos procesos antagónico: uno que incrementa el volumen del sistema y otro que lo limita. El modelo gompertziano simple asume que el aumento de tamaño es proporcional al volumen del tumor en un instante determinado, y la disminución, proporcional al producto del volumen y su logaritmo, esto es:

$$\frac{dV_{(t)}}{dt} = AV - \alpha V \ln V$$

la solución de esta ecuación es de la forma:

$$V_t = V_0 \cdot e^{\left(\frac{A}{\alpha} \cdot (1 - e^{\alpha t})\right)}$$

dónde A y α son los parámetros del modelo y V_0 es el volumen inicial. Parámetros derivados de este ajuste son, entre otros, el volumen máximo (V_{\max}) y el tiempo de duplicación (TD)

$$V_{\max.} = \lim_{t \rightarrow \infty} V_{(t)} = V_0 e^{\frac{A}{\alpha}}$$

$$TD = -\frac{1}{\alpha} \cdot \ln \left\{ 1 + \frac{\ln 2}{\ln [V_{(t)} / V_{\max}]} \right\}$$

El excelente grado de adecuación de los parámetros de crecimiento de los esferoides MCF7 a la ecuación de Gompertz permite: i) estimar el volumen máximo que podrán alcanzar los esferoides MCF7 en el medio de cultivo basal, máximo que se sitúa en torno a los 4 mm³; ii) conocer el número de duplicaciones que sufre la población inicial para alcanzar el volumen máximo estimado, que se sitúa alrededor de 9-11 duplicaciones; iii) calcular el parámetro tiempo de duplicación (TD) para diferentes volúmenes de los esferoides MCF7 que, en nuestro modelo, y de acuerdo con la ecuación de Gompertz, no es constante sino que disminuye al aumentar el volumen del esferoide (Olea *et al.*, 1994)

Introducción

Las diferencias de comportamiento existentes entre distintas líneas celulares y la búsqueda de una explicación para el desigual tipo de crecimiento de los elementos de una misma estirpe celular cultivados en monocapa o en suspensión esferoidal, hace interesante el estudio de la cinética de crecimiento y la distribución en el ciclo celular.

1.4 RADIOSENSIBILIDAD Y RESPUESTA CELULAR A LA RADIACIÓN IONIZANTE

1.4.1 Respuesta a la radiación de los esferoides multicelulares

Cuando la evaluación de la respuesta tumoral a la radiación se hace mediante un test *in vitro* el modelo de los esferoides multicelulares destaca sobre el resto de los tests propuestos por las siguientes propiedades: i) el contacto célula-célula en los esferoides tridimensionales protege frente a los efectos de la radiación en la progresión en el ciclo celular y puede directamente influir en la recuperación del daño subletal (Durand y Sutherland 1984; Kwok y Sutherland, 1991; Frank *et al.*, 1993; Moussa *et al.*, 2000); ii) la conformación tridimensional de la estructura celular sin predominio de un diámetro sobre el resto determina una disposición de la cromatina intranuclear similar a la encontrada en los tejidos y distinta a la presente en los cultivos rutinarios en *monocapa* y que puede ser determinante de la respuesta a la radiación (Olive y Durand 1994; Durand y Olive 2001) y, iii) la cinética de proliferación celular en el tumor queda mejor representada en el modelo tridimensional que en los sistemas que emplean cultivos celulares en monocapa en crecimiento exponencial (Bristow y Hill 1990). De hecho existe una gran similitud entre los tiempos de duplicación del volumen de los esferoides y el tiempo potencial de duplicación tumoral (T_{pot}) estimado para idénticas estirpes tumorales. La velocidad de progresión en el ciclo celular, la duración de las fases del ciclo así como la fracción de células con actividad proliferativa son, ciertamente, variables de necesaria inclusión en los modelos experimentales en radioterapia. Además, es posible obtener cultivos de esferoides en los que alguna de estas características sea dominante sobre el resto, de tal manera que la respuesta obtenida en el protocolo de irradiación diseñado sea atribuible principalmente a una de esas variables de forma predominante.

Los esferoides que contienen entre 100 y 1500 células están generalmente bien oxigenados en las condiciones experimentales de un ensayo estandarizado. En este caso particular el efecto oxígeno queda simplificado, ya que todas las células presentarán un

Introducción

grado de lesión por la radiación equiparable, o en todo caso no diferente en lo que respecta a la presencia de oxígeno en mayor o menor abundancia. A este respecto, en el caso particular de los protocolos de irradiación fraccionada se opta, generalmente, por espaciar cada una de las fracciones de la dosis total en un tiempo no superior a las 6 horas (Stuschke *et al.*, 1995) con objeto de mantener el efecto de la regeneración tumoral en sus mínimos. Además se aconsejan tiempos de tratamiento no superiores a las 50 horas, siempre tomando como referencia los tiempos de ciclo estimados para cada estirpe celular y los tiempos de duplicación del volumen del esferoide. Se ha sugerido que este intervalo de 6 horas entre fracciones es suficiente para la recuperación celular completa para la mayoría de las líneas celulares (Stuschke *et al.*, 1995), aunque en algunos casos los protocolos optan por intervalos aun mayores (Matthews *et al.*, 1989).

La utilización de esferoides de mayor tamaño supone la aparición de áreas de hipoxia, anoxia y necrosis. La introducción de esta variable supone un avance de importancia sobre la experimentación con líneas celulares establecidas en monocapa e irradiadas en esa situación. No obstante, la complejidad de la respuesta a la radiación es mayor que para esferoides más pequeños, lo que supone una mayor dificultad en la derivación de datos útiles y de fácil interpretación.

La presencia o ausencia de oxígeno molecular en el estroma de un tejido (tumoral o sano) es de importancia fundamental en el efecto biológico de la radiación. Para radiación X o gamma de cualquier energía y dosis de radiación comprendidas entre 50 y 250 cGy el factor de incremento de eficacia biológica de la radiación es 2-3/1 en condiciones de buena *versus* mala oxigenación. Los tumores humanos poseen, por lo general, una fracción de células hipóxicas que, aunque oscilan grandemente de unos tumores a otros, correlaciona de manera estrecha con el volumen o masa tumoral. Esta fracción, que varía según los casos entre el 1% y el 15% , aunque puede alcanzar el 50% de la población tumoral en ciertas situaciones, resulta difícil de estimar. En animales de experimentación, el procedimiento más satisfactorio para ello y el más ampliamente usado está basado en la obtención de parejas de curvas de supervivencia de explantes tumorales procedentes de tumores irradiados manteniendo al animal en atmósfera de nitrógeno (hipoxia completa) o respirando normalmente aire. La diferencia existente en la fracción

de supervivencia, correspondiente a la parte exponencial de ambas curvas en una y otra situación, representa una medida bastante aproximada del contenido en células hipóxicas del tumor irradiado.

El modelo de los esferoides multicelulares se ha empleado con frecuencia para estudiar el efecto de la fracción de células hipóxicas en la respuesta a la radiación (Carlsson *et al.*, 1979; Mueller-Klieser, 1987; Sminia *et al.*, 2003) así como el efecto del déficit nutritivo concomitante (Li, 1982; Mueller-Klieser *et al.*, 1982, Mueller-Klieser, 1987), el estudio de la influencia de células apoptóticas tras irradiación (Olive *et al.*, 1999) y las características de la repoblación tras irradiación (Sham y Durand 1999). Se ha propuesto que la disminución del aporte de glucosa a nivel de los estratos más internos del esferoide se asocia con un decrecimiento del anillo de células viables y un incremento persistente del consumo de oxígeno (Li, 1982; Casciari *et al.*, 1988; Rofstad *et al.*, 1996), por lo que es difícil disociar en el modelo el peso correspondiente a hipoxia y déficit nutritivo en la respuesta a la radiación.

Por último, cuando la variable predominante es la especial configuración de la cromatina durante el tiempo de irradiación, la elección del modelo esferoide destaca sobre la irradiación en monocapa. La mayor eficacia de los procesos de reparación en el caso de esferoides (Durand y Olive, 1979; Gordon *et al.*, 1990, Durand y Olive, 2001) hace de nuevo al modelo tridimensional, portador de mayor información para la correcta protocolización de los tratamientos con radiaciones en la clínica que otros modelos más sencillos.

La estimación del porcentaje de control o ausencia de recrecimiento en monocapa tras el tratamiento, la cuantificación del retraso en el crecimiento respecto a grupos de tumores/esferoides no expuestos, la cinética de crecimiento de esferoides tratados y no tratados y la evaluación de la supervivencia celular mediante un ensayo clonogénico tras disgregación del tumor/esferoide han sido empleados indistintamente, como se ha indicado previamente, para derivar parámetros de sensibilidad en protocolos de radioterapia a dosis única o fraccionada, a partir de tumores humanos crecidos como heterotransplantes en los animales adecuados o en sistemas de cultivo tridimensional formando esferoides

Introducción

multicelulares (Olea *et al.*, 1992; Stuschke *et al.*, 1995; Buffa *et al.*, 2001; Guirado *et al.*, 2003).

Los tres primeros procedimientos, control tumoral y retraso en el crecimiento, son considerados métodos *in situ* que pueden reflejar con mayor precisión los protocolos de tratamiento con radioterapia en la clínica. En ambos casos la interacción célula-célula se mantiene durante y tras el tratamiento ya que no es necesario la disgregación del esferoide en sus elementos constituyentes, como ocurre en el ensayo clonogénico. La disociación enzimática o mecánica de los tumores puede constituir una perturbación importante que afecta a la supervivencia celular por sí misma. Cada uno de los procedimientos de estimación cuantitativa del efecto de la radiación ha exigido, además, una aproximación matemática para la obtención de los parámetros de radiosensibilidad.

1.4.2 Radiosensibilidad: daño inducido y reparación

En los últimos años ha surgido el concepto de *caracterización biológica de los tumores* que agrupa una serie de parámetros celulares de muy diversa índole, los cuales evidenciados en el propio tejido, antes de que se ejerza una acción complementaria a la cirugía e independientemente del estadio morfoanatómico, son el reflejo de ciertas propiedades de los tumores relacionadas con su génesis, grado de diferenciación, capacidad metastásica y susceptibilidad terapéutica (Ruibal Morell, 1992). Así, por ejemplo se ha sugerido que la susceptibilidad a la radioterapia puede establecerse mediante test moleculares representativos del daño producido en la estructura y/o la función en el DNA (Sutherland *et al.*, 2000). Sin embargo, la relación entre lesión molecular, cuantificada en términos de lesión del DNA, y letalidad celular no está aún firmemente establecida. En este sentido se ha puesto en relación: i) la supervivencia celular con el nivel de rupturas dobles de cadena de DNA (rdc) cuantificado inmediatamente después de la aplicación de una dosis única de radiación (McMillan *et al.*, 1990; Whitaker *et al.*, 1995; Wada *et al.*, 2003); ii) la velocidad del reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación con la radiosensibilidad de las células irradiadas (Kemp *et al.*, 1984; Schwartz *et*

al., 1996; Price *et al.*, 2000); y, iii) el nivel de rupturas dobles de cadena de DNA no reparadas después de cierto intervalo de tiempo y la supervivencia celular obtenida tras irradiación cuando se utilizan ritmos de administración de la dosis diferentes (Sham y Durand, 1999).

Para explicar cómo la lesión molecular radioinducida puede encontrar su traducción finalmente en la supervivencia celular hay que incluir el fenómeno de reparación del daño celular tras irradiación. A este respecto se han planteado distintas hipótesis: i) la radiación de bajo LET produce sobre las células dos tipos de lesiones diferentes: lesión letal (irreparable) y lesión potencialmente letal (que puede ser reparada si las condiciones experimentales lo permiten o fijada por reparación equivocada o interacción con otra lesión y convertida en letal (Curtis, 1986); ii) a bajos niveles de dosis, o cuando las células se irradian a baja velocidad, la mayor parte de las lesiones potencialmente letales se reparan (Steel, 1989) y iii) la radiosensibilidad a bajas dosis debe estar fundamentalmente determinada por la inducción de lesiones no reparables (Steel 1989).

La comprobación experimental de estas hipótesis, exige, al menos, lo siguiente: i) la aceptación de que la rdc de DNA es la causa determinante de la pérdida de la capacidad reproductora de la célula clonogénica; ii) la disponibilidad de métodos y técnicas que hagan posible el estudio cuantitativo del nivel de rdc inducidas por la radiación en diferentes condiciones experimentales y, iii) la demostración de la existencia de un nivel de correlación estrecho entre los estudios cuantitativos de lesión molecular radioinducida y supervivencia celular estimada por ensayo de formación de colonias.

Son numerosos los trabajos que encuentran concordancia entre los ensayos moleculares y celulares en cultivos en monocapa con protocolos de irradiación aguda. Así, nuestro grupo de investigación correlaciona, i) supervivencia y radiación (Ruiz de Almodovar *et al.*, 1994); ii) cinética de reagrupamiento y supervivencia celular tras ensayo clonogénico (Nuñez *et al.*, 1995), iii) estado funcional de la proteína p53, apoptosis y FS a 2 Gy (Siles *et al.*, 1996) y, iv) supervivencia celular y radiación en células hormonodependientes sometidas a distintos protocolos de tratamiento secuencial hormonal/ radiación (Villalobos *et al.*, 1996).

1.4.3 Radiosensibilidad durante la radioterapia fraccionada

Una adaptación de los test descritos con anterioridad en esta memoria es el ensayo celular clonogénico realizado tras la administración de una dosis única de 2 Gy. Mediante este test se ha podido conocer la gran variabilidad de la radiosensibilidad intrínseca de los tumores humanos, que se define por una fracción de supervivencia que se mueve en el rango de 0.1 a 0.8 (Fertil y Malaise, 1985) y es de suponer que tan amplio margen se vea magnificado si la administración de la dosis total se hace de forma fraccionada (Matthews *et al.*, 1989).

Si la radiosensibilidad intrínseca de un tumor se estima mediante la medida de la fracción de supervivencia a 2 Gy y ésta se mantiene invariable a lo largo del curso del tratamiento fraccionado es de esperar que los test propuestos *in vitro* con material fresco de explantes tumorales (Brock *et al.*, 1989, Carmichael *et al.*, 1989) sean buenos predictores de radiosensibilidad y radorrespuesta clínica (Matthews *et al.*, 1989). En otras palabras, si el tiempo entre fracción es adecuado y la reparación de la lesión subletal es igualmente eficaz tras la primera dosis de radiación que tras haber administrado de forma regular la radiación en forma de fracciones cuidadosamente programadas, la estimación de FS 2 Gy está más cerca de ser un buen parámetro de radorrespuesta tumoral.

No obstante, algunos factores de orden tumoral podrían ir actuando sobre la radorrespuesta celular y, por tanto, afectando a la posibilidad de esterilización tumoral al fin del tratamiento programado. Al hablar de fraccionamiento es obligado considerar tanto la redistribución celular como la regeneración tumoral a partir de los clonógenos celulares indemnes. Numerosos estudios han coincidido en afirmar que existen modificaciones de la radiosensibilidad a través del ciclo divisorio (Dewey y Humprey, 1965; Sinclair y Morton, 1965; Sinclair, 1972; Stobbe *et al.*, 2002) que a su vez se ve influida por tratamientos de partición de dosis (Sham y Durand, 1998). Así por ejemplo el retraso mitótico es conocido desde los trabajos iniciales de Gray en 1940 (Gray, 1940). Asimismo, modificaciones en el porcentaje de células apoptóticas y/o necróticas durante el fraccionamiento ha sido

revisado últimamente (Olive *et al.*, 1999) si bien los resultados no son concluyentes aunque apuntan hacia una contribución poco importante de la muerte celular por apoptosis en la supervivencia celular global tras radiación.

Se ha demostrado en tumores humanos irradiados *in vivo* que el fenómeno de regeneración celular durante el curso de la radioterapia fraccionada puede ser, en muchos casos, un proceso terriblemente eficaz. Así, es evidente que el alargamiento del tiempo total de tratamiento en el curso de la irradiación fraccionada exige un incremento en la dosis administrada en cada fracción (Fowler 1986, 1989; Withers *et al.*, 1988; Trott 1990; Peter y Withers 1997).

De hecho los tumores con un alto índice proliferativo escapan al control por radiación cuando se tratan con protocolos de radioterapia convencional. El término de regeneración acelerada asignado con frecuencia a determinados tumores se utiliza cada vez con más familiaridad, aunque no se haya podido distinguir en muchos de los casos si la causa de este fenómeno es el acortamiento en el ciclo divisorio o se trata de un incremento en la fracción de crecimiento con disminución o no del factor de pérdida celular (Fowler 1986; Trott 1990; Kummermehr 2001).

Los fenómenos que rigen el proceso del incremento en el índice proliferativo durante el curso del tratamiento fraccionado con radiación pueden ser de origen diverso, pero no cabe duda de que muchos de ellos son comunes a los mecanismos que controlan la proliferación celular en las estirpes tumorales en que los tumores se han desarrollado. Así no es de extrañar que factores de crecimiento, expresión del producto proteico de genes supresores y hormonas tengan un papel crucial en la respuesta de adaptación del tumor a la muerte celular provocada por el tratamiento radioterápico.

La importancia de la eficacia de la reparación del daño potencialmente letal durante el fraccionamiento ha sido descrita ampliamente. En la revisión de Barendsen (Barendsen *et al.*, 2001) se atribuye una especial relevancia al estado proliferativo o quiescente de las células en su capacidad de reparar dicho daño. Dado que la proporción de células en las distintas fases del ciclo se ve modificada durante el fraccionamiento debido

básicamente a la regeneración acelerada del tumor, esta capacidad de reparación puede ir variando a lo largo del tratamiento haciéndose menos efectivo al final del mismo.

En definitiva, habría que considerar el efecto combinado de la capacidad de reparación celular, de la regeneración y de la redistribución en el ciclo mitótico en la probabilidad de supervivencia celular tras irradiación.

Por tanto, la estimación de la radiosensibilidad tumoral a dosis únicas de radiación, puede ser insuficiente para valorar el conjunto de fenómenos que a lo largo del tratamiento participan influyendo definitivamente en el resultado.

De nuevo, su implementación de forma rutinaria choca con dificultades técnicas y planteamientos éticos de difícil resolución. Por este motivo se han buscado modelos alternativos *in vitro* en los que los fenómenos de redistribución en el ciclo celular, progresión y regeneración en el curso de la radioterapia fraccionada, así como la reparación de la lesión celular subletal, puedan ser tenidos en cuenta a la hora de evaluar la respuesta global de la población tumoral a la radiación ionizante. El modelo de elección deberá permitir que cada factor pueda ser analizado por separado, bien por eliminación de los otros o mediante el diseño de protocolos experimentales en los que una de las variables sea claramente dominante.

1.4.4 Modificadores de la respuesta a la radiación: estrógenos y antiestrógenos

En el tratamiento actual del cáncer de mama ocupa un lugar prominente el uso de los antiestrógenos: el trifeniletileno tamoxifeno administrado a pacientes con tumores mamarios con fenotipo positivo para el receptor estrogénico se acompaña de un incremento de la supervivencia a los 5 y 10 años (EBCTCG, 1992). La acción antiestrogénica del tamoxifeno sobre las células estrógenodependientes contenidas en los tumores mamarios se traduce en un cúmulo de células en fases no proliferativas del ciclo celular (G_0/G_1), y enlentecimiento de su ritmo proliferativo (Osborne, *et al.*, 1983; Doisneau-Sixou *et al.*, 2003).

Las células MCF7 mantenidas en cultivo en monocapa responden al tratamiento con hidroxitamoxifeno de forma que el tiempo de duplicación se alarga considerablemente (Villalobos *et al.*, 1987; Koester *et al.*, 1994). Este efecto inhibitorio de la progresión en el ciclo celular es bloqueado por el tratamiento concomitante con estradiol-17 β , el cual a concentraciones 100 veces inferiores revierte el efecto antiestrogénico (Osborne *et al.*, 1984; Sonnenschein *et al.*, 1985; Del Moral *et al.*, 1991).

La interacción entre radiación y cinética de proliferación celular ha sido objeto de estudio en diferentes modelos celulares que utilizan cultivos en monocapa en los cuales es posible modificar el ritmo de crecimiento celular. Así es conocido que los tratamientos que retardan el progreso de las células a través del ciclo divisorio reducen la efectividad de la radiación incrementando la radiorresistencia celular (Kwok y Sutherland 1991). En algunos casos este efecto protector ha sido relacionado con una mayor oportunidad por parte de las células *enlentecidas* para reparar el daño inducido (Haimovitz-Friedman *et al.*, 1991).

Las modificaciones de la cinética de crecimiento de las células MCF7 impuestas por el tratamiento con antiestrógenos o el cultivo en medios carentes de estrógenos y sus implicaciones en la respuesta al tratamiento con radiaciones han sido investigadas por varios autores (Wazer *et al.*, 1989; 1993; Sarkaria *et al.*, 1994; Villalobos *et al.*, 1995; Becerra, 2002). Aunque los resultados de los diferentes grupos de investigación son en algún punto contradictorios o bien no comparables debido a la disparidad en los protocolos experimentales, lo que sí parecen indicar es que los estrógenos modulan la radiosensibilidad de las células estrógeno dependientes, pero no son concluyentes para determinar si las diferencias en respuesta a la radiación son exclusivamente atribuibles a la distribución de la población celular en diferentes fases del ciclo mitótico o están también ligados a la peculiar estructura de la cromatina intranuclear impuesta por el tratamiento con estrógenos.

En definitiva, en el tratamiento radioterápico del cáncer de mama hormonodependiente, es necesario establecer la influencia y cuantificar en la medida de lo posible su variación en el curso del tratamiento de manera que cada una de las dosis

Introducción

administradas lo sea de forma más racional y adecuada a las características individuales de cada tumor.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Dada la similitud estructural y la semejanza en el comportamiento proliferativo existente entre el modelo tumoral de los esferoides multicelulares con las micrometástasis y las agrupaciones celulares tumorales en fases tempranas del desarrollo, tiene interés, desde un punto de vista clínico, desarrollar un método de estimación de la radiosensibilidad celular usando tal modelo tumoral, y estudiar su aplicación en la práctica de la radioterapia antitumoral.

Por ello, la presente Memoria de Tesis la hemos planteado con el fin de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un test de radiosensibilidad *in vitro* usando el modelo de los esferoides multicelulares MCF7, con objeto de estimar los parámetros de radiosensibilidad celular tumoral.

1.2. Definir los factores que condicionan la respuesta a la radiación en el sistema de cultivo tridimensional y compararlos con los que rigen la respuesta en el cultivo en monocapa.

1.3. Estudiar la relación existente entre dosis de radiación y efecto a: i) nivel molecular -cuantificación del número de rupturas dobles de cadena de DNA y cinética de reagrupamiento, ii) nivel celular estimando el porcentaje de células irradiadas que conservan la capacidad clonogénica -supervivencia celular tras irradiación y la distribución de las células supervivientes en el ciclo celular- e investigar el efecto de la radiación sobre el crecimiento de la población celular en conjunto -cinética de crecimiento y probabilidad de control tumoral de los esferoides multicelulares tras irradiación.

1.4. Correlacionar los resultados de los distintos procedimientos de estudio utilizados en la determinación de la respuesta a la radiación de los esferoides y valorar la influencia de la perturbación experimental del modelo tridimensional en la valoración de la radiosensibilidad.

2. Establecer las condiciones de cultivo óptimas en las que evaluar el efecto de la radiación ionizante, administrada en dosis única y fraccionada, sobre los esferoides multicelulares MCF7.

2.1. Desarrollar un protocolo de irradiación sobre esferoides MCF7 que permita el estudio de la respuesta tras irradiación fraccionada.

2.2. Cuantificar el efecto de la variación del protocolo de irradiación sobre la cinética de proliferación celular y la probabilidad de control o curación de los esferoides y, a nivel molecular y celular, determinando el daño inicial radioinducido, la capacidad de reagrupamiento de las cadenas de DNA y la supervivencia celular.

3. Investigar el efecto de las modificaciones de la cinética de proliferación celular provocada por el tratamiento hormonal y antihormonal sobre la respuesta a la radiación de los esferoides multicelulares.

Material y Métodos

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTACIÓN

3.1.1 Estufa para cultivos celulares

Hemos utilizado incubadores ASSAB t/304, termostatizados y con regulador de dióxido de carbono. Los experimentos los realizamos a la temperatura de 37 °C, en aire con 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad.

La temperatura se regula mediante un termostato electrónico cuya exactitud se sitúa en torno a 0.05°C. El mantenimiento de la presión parcial de CO₂ se lleva a cabo mediante un sensor de la conductividad térmica de la mezcla de gases, capaz de detectar cambios en el nivel de CO₂ que superen el intervalo de 0.1%.

La saturación de la atmósfera con vapor de agua se logra al hacer burbujear el CO₂

inyectado en la incubadora en dos cubetas llenas de agua destilada.

3.1.2 Cámara de flujo laminar

La contaminación biológica de los cultivos celulares durante su manipulación, se puede evitar utilizando una cabina de flujo laminar. La que se encuentra en nuestro laboratorio fue suministrada por Flow Laboratories. La circulación de aire en sentido vertical, con velocidad máxima de 0.46 m/s se establece mediante un ventilador. La filtración del aire, antes de entrar en la cabina, y el rendimiento del proceso de filtración (99.997 % de retención de todas las partículas mayores de 0.3 μm de diámetro) garantizan el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo los experimentos.

3.1.3 Microscopios

El microscopio invertido de contraste de fases utilizado (Olympus IMT/201 está dotado con tres objetivos x10, x20 y x40 y ocular para fotografía con contraste de fases.

Asimismo, en algunos de los experimentos realizados hemos requerido el microscopio óptico convencional Olympus CHB con aumentos x10, x40, x100 para efectuar los contejes celulares (cámara de Neubauer).

Para tallar las muestras nos hemos valido de una rejilla graduada acoplable al ocular del microscopio, dividida en cuarenta cuadrados con una superficie total de 1 mm^2 . La rejilla se calibró previamente utilizando un calibrador de 1mm de longitud dividido en 100 espacios. En otros casos, ha sido suficiente para medir el tamaño de los esferoides, utilizar una reglilla graduada acoplada al ocular del microscopio.

3.1.4 Contador automático de células

Hemos empleado un contador de células Coulter (Sampling Stand & ZM, USA), para el análisis, de forma automatizada, del tamaño y número de elementos celulares presentes en las suspensiones celulares estudiadas.

3.1.5 Unidad de irradiación

Hemos utilizado como fuente de irradiación una unidad de ⁶⁰Cobalto Theraton 780 con tasa de dosis de 170 cGy/mn y a una distancia fuente/células de 70 cm.

Un acelerador linear de electrones (Mevatron KDS, Siemens, Germany) agilizó la radiación en algunos experimentos en los que las dosis administradas eran más altas. Los esferoides se irradiaron según el protocolo elegido con 18 MeV de RX. El equilibrio electrónico se aseguró interponiendo el material biológico entre láminas sólidas de agua (RW3 o PTW Freiburg). El espesor total fue de 3 cm por encima y 20 cm por debajo de las muestras.

3.1.6 Sistema de electroforesis de campo pulsado (PFGE)

El equipo de electroforesis de campo pulsado CHEF-DRII (BioRad) utilizado permite separar fragmentos de DNA (desde 100 bases hasta 10-12 .10⁶ pares de bases) en función de su tamaño. El sistema incluye cubeta de electroforesis, fuente de alimentación capaz de alcanzar los 120 voltios y dos módulos de control, el primero de los cuales (200/2.0 power supply) permite regular la diferencia de potencial e indica la intensidad de corriente que circula por el sistema y, el segundo (Pulsewave 760 switcher) regula la intermitencia del

campo pulsante y la duración total del proceso de electroforesis.

El sistema lleva incorporado una bomba peristáltica de velocidad variable (BioRad) que hace circular el tampón de electroforesis a través de un criostato (Selecta) para mantener la temperatura de dicho tampón entre 14-16 °C aproximadamente.

Los geles que se someten a electroforesis se han preparado utilizando soportes de lucita de dimensiones variables. En estos geles se introducen unos *peines* que, al retirarlos, originan un orificio o *pocillo* en el que se depositan las muestras a analizar.

3.1.7 Transiluminador

Para la visualización de geles teñidos con bromuro de etidio es necesario un transiluminador ultravioleta que en este trabajo fue de 20 x 20 (312 nm de longitud de onda) modelo TC-312 A (TDI laboratorios). Como protector de luz UV hemos utilizado una pantalla de protección-UV facial completa.

3.1.8 Sistema de reproducción fotográfica

Los geles de la electroforesis de campo pulsado, bajo iluminación ultravioleta, los fotografiamos utilizando una cámara Polaroid modelo CU-5 88-48 y una cámara de vídeo SONY CCD IRIS acoplada a un sistema de análisis de imagen.

3.1.9 Análisis de imagen

La lectura densitométrica de geles procedentes de los experimentos de PFGE, ha requerido un sistema de análisis de imagen compuesto por un microscopio Olympus con lente Neofluor 25 y lámpara HQ con filtro de reflexión (verde) y transmisión (rojo), un

monitor de televisión Sony, una vídeo-impresora color Sony y una impresora Epson LX-400 WIN. Al microscopio se le puede acoplar una cámara de vídeo de alta resolución Sony CCD-IRIS que a su vez se encuentra conectada a un ordenador con un procesador Pentium II a 233Mhz.

La información se procesa utilizando el programa de análisis de imagen *Visilog Geles (Microptic)*. Con este sistema se analiza la distribución de fragmentos de DNA tras la electroforesis de campo pulsado por comparación con marcadores de peso molecular de tamaño conocido.

3.1.10 Citómetro de flujo

Para estudiar la distribución de elementos celulares en cada una de las fases del ciclo celular, hemos utilizado un citómetro de flujo ORTHO CYTERON cuyo uso nos fue facilitado por el Departamento de Anatomía Patológica de la Universidad de Granada.

La proporción de células existente en las diferentes fases del ciclo la calculó el programa "Cell Cycle" de Ortho adaptado al citómetro de flujo para este fin.

3.1.11 Otros

Cuando los experimentos lo han requerido, hicimos uso de la instrumentación propia de un laboratorio general:

- pHmetro
- balanza de precisión
- unidad de filtración
- centrífugas

Material y métodos

- cámara fría y sistemas frigoríficos
- microcentrífuga
- ebullidor
- microondas
- baño termostatzado
- pipeteros automáticos

3.2 REACTIVOS

3.2.1 Medios de cultivo

El mantenimiento en cultivo de las células MCF7 lo realizamos en el medio Eagle Esencial Mínimo complementado con sales de Earle y suplementado con glutamina (MEM) y Medio Mínimo Esencial con sales de Earle modificado por Dulbecco (DMEM) y suplementado con bicarbonato y glutamina. Todos ellos suministrados por Sigma.

3.2.2 Suero bovino fetal (FBS)

Los medios de cultivo empleados para el mantenimiento de las células contuvieron, además de los componentes específicos de los medios de cultivo, un complemento de suero bovino fetal suministrado por Biowhitaker a una concentración que osciló entre el 5-10% según los requerimientos del experimento. El suero, fue inactivado térmicamente a 56 °C durante 30 minutos antes de añadirse al medio de cultivo

3.2.3 Enzimas

Para la obtención de una suspensión monocelular homogénea a partir de la monocapa celular hemos utilizado una solución estéril de tripsina (0.05%)-Verseno (0.02%) capaz de romper las uniones intercelulares y la sujeción de los elementos formes al soporte plástico. Ambos reactivos se obtuvieron de ICN Flor Laboratoios, Irving (Reino Unido)

Para disgregar en sus componentes formes los esferoides multicelulares fue necesario

Material y métodos

utilizar una mezcla enzimática que contiene 2% de colagenasa 1% de DNasa y 1% de pronasa en reactivo de Hanks.

3.2.4 Reactivo de Hanks (modificado)

Como disolvente de la disolución enzimática necesaria para disgregar los esferoides multicelulares en células individuales preparamos el reactivo de Hanks modificado. La composición es: 0.8% de cloruro sódico, 0.04 % de cloruro potásico, 0.006% de fosfato disódico, 0.006% de fosfato monopotásico; 0.1% de glucosa y 0.035% de carbonato sódico en agua bidestilada.

3.2.5 Ágar

En los experimentos en que fue necesario que las células no crecieran adheridas a la superficie plástica del recipiente de cultivo se cubrieron los discos Petri o las placas multipozo con una solución de ágar purificado (Bacto-ágar de Gifco, Detroit, Michigan) esterilizado previamente por ebullición en microondas.

3.2.6 Tampón estándar de fosfato (PBS)

El tampón PBS se preparó disolviendo 3.56g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.52g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 8.5 g de NaCl en un litro de agua bidestilada. Todos los reactivos químicos fueron suministrados por Merck. El pH de la disolución tampón se regula a 7.2. Si sobre ese tampón se adiciona albúmina bovina al 1% se habla de tampón PBS-BSA al 1%

3.2.7 Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE x10)

El tampón TBE de concentración diez veces superior (10x) a la estándar utilizado en electroforesis de campo pulsado contiene en disolución 108 g de Tris-base (Merck), 55 g de ácido bórico (Sigma) y 9.3 g de EDTA (Sigma), en un litro de agua bidestilada. En los experimentos de PFGE la solución stock se diluye 20 veces (0.5x). El pH de la disolución se ajustó a 8.2.

3.2.8 Tampón de lisis

Para lisar las células tumorales y permitir la movilidad del DNA en el gel de electroforesis de campo pulsado empleamos un tampón preparado con n-lauryl-sarcosil (Sigma) al 2% y proteinasa K 0.5 mg/ml en sal disódica de etilén diamino tetra acético (EDTA) 0.5 M. El pH del tampón de lisis se ajustó a 7.6

3.2.9 Agarosa

Los geles para electroforesis de campo pulsado que hemos utilizado contienen Agarosa Tipo VII (Sigma) de bajo punto de fusión (temperatura de gelificación inferior a 30 °C que vuelve a fundir a temperatura superior a 65 °C). Para la preparación de *plugs* o moldes (suspensión de células en agarosa) utilizamos Agarosa Tipo IX (Sigma) de muy baja temperatura de fusión (la gelificación ocurre a menos de 15 °C y el gel vuelve a fundir a temperatura inferior a 50 °C).

3.2.10 Bromuro de Etidio

La tinción del DNA sometido a electroforesis en gel la realizamos utilizando una disolución de bromuro de etidio (Sigma) de concentración 0.5 µg/ml.

3.2.11 Disolución de Vindelov

Previo al estudio de la población celular por citometría de flujo la membrana celular se permeabiliza y se tiñe el DNA con la llamada disolución de Vindelov durante 10 minutos a 4°C. Este reactivo lleva en su composición un 2% de yoduro de propidio (Sigma) para la tinción del DNA.

3.2.12 Violeta de genciana

La tinción de las colonias formadas por las células (ensayo clonogénico) se realizó con una disolución de violeta de genciana al 2% en alcohol absoluto. Utilizamos esta misma disolución para teñir las células en los ensayos de recrecimiento en monocapa tras irradiación.

3.2.13 Hidroxitamoxifeno

En la realización de experimentos cuyo objetivo era observar el efecto de agentes antihormonales sobre la cinética de crecimiento de los esferoides multicelulares, hemos utilizado como compuesto antiestrogénico un derivado hidroxílico del tamoxifeno; se trata de

un trifeniletieno no esteroideo denominado hidroxitamoxifeno (OH-TAM) (ICI-46.474).

3.2.14 Estradiol

Como compuesto estrogénico hemos empleado el 17 β -estradiol (Calbiochem). Se preparó una solución stock en etanol en una concentración de 1 mM. La concentración final de etanol en los cultivos no superó el 0.1%.

3.3 MATERIAL FUNGIBLE

3.3.1 Material de plástico para cultivos celulares

Para el mantenimiento de los cultivos celulares hemos empleado cajas de cultivo de poliestireno tratado de 25 (T-25) y 80 (T-80) cm² de superficie útil para cultivo y volúmenes de 50 y 300 ml respectivamente (Nunc). Las cajas de cultivo son de un solo uso, estériles y de buena calidad óptica. El poliestireno manufacturado tiene naturaleza hidrofóbica por lo que ha de ser tratado con radiación gamma, compuestos químicos o con electricidad para así proporcionar una superficie adecuada para el crecimiento celular. Procediendo así, la superficie plana queda cargada eléctricamente y preparada para permitir la adherencia de las células y originar cultivos de distribución celular uniforme.

La iniciación de los esferoides multicelulares de forma individual la realizamos en placas de cultivo de 48 pocillos también de poliestireno (Nunc), en las que se evita la adherencia al soporte plástico mediante una fina capa de ágar.

Cuando la experimentación no requirió el tratamiento individual, los esferoides multicelulares se iniciaron y mantuvieron en discos de plástico *bacteriológico* tipo Petri de 10 cm de diámetro suministrados por Nunc.

3.3.2 Pipetas

Las pipetas empleadas rutinariamente en la manipulación de los cultivos han sido de plástico de un solo uso de volumen variable (de 1 a 25 ml) (Nunc), micropipetas también de volumen variable (de 2 a 1000 µl) (Costar) y pipetas tipo Pasteur tanto de vidrio como de plástico.

3.3.3 Filtros

Para la esterilización de pequeños volúmenes de disoluciones o de medios de cultivo hemos utilizado filtros Millipore HAWR 02500 de un solo uso, con tamaño de poro 0.22 μm y 25 mm de diámetro, así como unidades de filtración con capacidad de 250 ml.

3.3.4 Películas fotográficas

Para fotografiar geles expuestos a luz ultravioleta hemos empleado una película fotográfica Polaroid modelo 667. Para la vídeo-impresora el papel utilizado ha sido Sony UPC-1010.

3.3.5 Otro material fungible

Algunos experimentos requirieron utilizar diverso material tanto de vidrio como de plástico: Tubos de polipropileno con tapón de rosca y fondo cónico de distintas capacidades, estériles. Vasos de precipitado, probetas, erlenmeyer, quitasatos, filtros, embudos, tubos eppendorf y puntas de pipeta de volumen variable, entre otros.

3.4 MODELOS TUMORALES

En esta memoria hemos experimentado con la línea celular denominada MCF7 adaptada al cultivo en monocapa. Es de origen tumoral y fue obtenida en 1973 (Soule *et al.*, 1973) a partir de un derrame pleural metastásico de una enferma afecta de adenocarcinoma

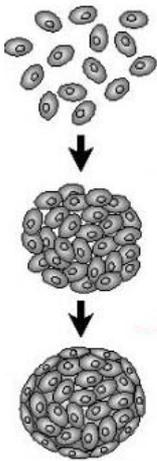
mamario.

Los distintos clones de esta línea celular difieren ligeramente en parámetros cinéticos y muestran mayores diferencias en respuesta a la privación de hormonas esteroideas en el medio de cultivo (Villalobos *et al.*, 1995).

La razón que justifica la utilización del clon MCF7 BB, procedente del Instituto “Jules Bordet” (Bruselas) es la capacidad de formar esferoides multicelulares que presenta, característica no apreciada en los clones MCF7 BUS y MCF7 GS (Olea *et al.*, 1992).

3.5 ESFEROIDES MULTICELULARES MCF7

3.5.1 Iniciación de los esferoides multicelulares



La formación de esferoides multicelulares a partir de la línea celular MCF7 BB cultivada en monocapa requiere en primer lugar despegar el tapiz celular que forma la monocapa celular del soporte de plástico. Este primer paso se realiza con una solución enzimática de tripsina. EDTA. Una vez obtenida la suspensión monocelular, se deposita una alícuota sobre discos Petri de 10 cm de diámetro cuya superficie de plástico no permite la adherencia de las células. A continuación, se añade medio de cultivo estándar que permite la formación y el crecimiento óptimo de los esferoides. De la densidad de células

del cultivo dependen tanto la velocidad de formación de los esferoides como el tamaño de los mismos.

Cuando los experimentos lo requieren, la formación de esferoides se lleva a cabo de forma individual en cajas de 48 pocillos con una capa de ágar cubriendo el fondo para evitar la adherencia de las células al plástico. Una vez enfriado el ágar, se dispensan 1.000-2.000 células por pocillo de una suspensión celular procedente de cultivo en monocapa. A

continuación, se mantienen en agitación continua en un agitador para favorecer la agregación celular durante 3-4 horas y se dejan reposar en estufa de cultivos para que adopten la conformación propia de los esferoides multicelulares. Transcurridas 24 horas se dispone de esferoides homogéneos de aproximadamente 100 μm de diámetro lo que asegura la ausencia de un núcleo necrótico.

3.5.2 Método de preparación del ágar

En un matraz adecuado se prepara una disolución al 3% de ágar en agua bidestilada y desionizada. Dicha solución se somete a agitación durante algunos minutos en un agitador magnético hasta que la disolución resulte perfectamente homogénea. El ágar así preparado, se recoge en botellas de cristal para su esterilización. Una vez el ágar completamente líquido por calentamiento a una temperatura de 70 °C utilizando un microondas convencional o bien un baño termostático, se mezcla con MEM en una proporción 3:1 y se dispensan 0.2 ml sobre cada pocillo de las placas multipozo. Éstas se dejan enfriar y se almacenan en frigorífico en condiciones de esterilidad hasta su uso.

3.5.3 Evaluación del tamaño de los esferoides

La medida de dos diámetros ortogonales de cada uno de los esferoides mediante rejilla o reglilla graduada nos ha permitido evaluar el crecimiento diario de los esferoides

3.5.4 Disgregación y conteo del número de células por esferoide

Los esferoides, una vez aislados y tallados se incuban con una solución enzimática que contiene colagenasa, DNAsa y pronasa en estufa a 37 °C durante 10 minutos. En algunos

casos se puede terminar la disgregación de forma mecánica con jeringa de insulina. Una alícuota de la suspensión monocelular obtenida se mezcla con igual cantidad de azul tripán y se deposita en la cámara de Neubauer para proceder a cuantificar los elementos celulares pertenecientes a cada esferoide.

En otros casos la suspensión celular resultante de la acción enzimática se neutraliza con medio completo y se resuspende en Isoton, procediéndose al contaje del número de elementos formes en un contador automático (Coulter Counter).

3.5.5 Cinética de proliferación de los esferoides multicelulares

En esta Memoria, el modelo de elección para definir la cinética de proliferación de los esferoides MCF7 ha sido el propuesto por Gompertz (Gompertz, 1825) ya que los datos experimentales se ajustan con gran precisión a la fórmula:

$$V_{(t)} = V_0 \cdot e^{\left(\frac{A}{\alpha} \cdot e^{(1-\alpha t)}\right)},$$

en la cual V_0 y V_t traducen el volumen del esferoide en el momento inicial y transcurrido un cierto tiempo t después de iniciado el crecimiento respectivamente, y A y α son constantes.

Una vez conocidos los valores de las constantes es fácil deducir algunos parámetros más precisos como el volumen máximo teórico alcanzado por los esferoides definido por la ecuación:

$$V_{\max} = V_0 \cdot e^{A/\alpha}$$

o el tiempo de duplicación para los diferentes volúmenes por los que pasa la vida biológica de un esferoide. Lo resuelve la ecuación:

$$TD = -\frac{1}{\alpha} \operatorname{Ln} \left\{ 1 + \frac{\operatorname{Ln} 2}{\operatorname{Ln}(V/V_{\max})} \right\}$$

Los parámetros A y α de la curva estándar que define el crecimiento de los esferoides

multicelulares MCF7 analizados en esta Memoria se han obtenido mediante dos formas distintas de normalización a un volumen inicial común:

1. Procedimiento clásico. Se obtiene dividiendo el volumen del esferoide en un tiempo t (V_t) entre la primera medida efectuada sobre él (V_0). Una vez calculados los valores de A y α para cada esferoide, se realiza la curva estándar de crecimiento utilizando la media aritmética de los parámetros obtenidos en cada uno de ellos.
2. Nuevo modelo de normalización (Guirado *et al.*, 2003). Considera que el mismo esferoide debe seguir la misma curva de crecimiento gompertziano independientemente del momento de observación y, por tanto, el volumen inicial considerado debe ser el mismo para todos los esferoides independientemente de que éste no haya sido observado experimentalmente. Así, el valor obtenido no debe modificar los parámetros derivados de la ecuación para un mismo esferoide.

La expresión utilizada es:

$$V_0' = V_0 \cdot e^{\left(\frac{A}{\alpha} \cdot (1 - e^{-\alpha T})\right)}$$

En la que V_0' es el volumen inicial común al que se normalizan los volúmenes experimentales y T , el tiempo transcurrido entre los volúmenes V_0 y V_0' . Una vez fijado el volumen de normalización, los valores para el parámetro A' se obtienen según:

$$A' = A e^{-\alpha T}$$

3.6 CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN DE LOS ESFEROIDES MCF 7 SOMETIDOS A IRRADIACIÓN.

3.6.1 Retraso del crecimiento o *Growth delay* (GD)

La observación de la velocidad de crecimiento de los esferoides tras el tratamiento radioterápico permite deducir ciertos parámetros de utilidad para la cuantificación del efecto de la radiación.

De forma práctica un test de este tipo incluye la individualización de los esferoides y su medida de forma seriada justo antes y progresivamente tras la administración de la dosis de radiación. El retraso en el crecimiento (GD) se define como la diferencia entre el tiempo estimado para que un esferoide irradiado y otro no irradiado (Control) alcancen un determinado volumen

El procedimiento a seguir es el siguiente:

Esferoides de aproximadamente 200 μm de diámetro creciendo de forma individual en placas de 48 pocillos, se irradian a dosis agudas comprendidas entre 0 y 12 Gy por placa.

A continuación se procede a la medida diaria de los diámetros ortogonales de cada esferoide durante al menos 30 días.

Para la estimación del retraso en el crecimiento es necesario definir previamente el factor de incremento de volumen que se ha de considerar para los esferoides tratados con diferentes dosis de radiación, respecto al volumen de los esferoides antes de la irradiación. Este factor de multiplicación se elige de forma arbitraria y en nuestro caso es de 5 veces el volumen tras el tratamiento respecto al volumen inicial, antes del tratamiento. La representación gráfica del cociente entre el tiempo empleado por los esferoides tratados y los esferoides no tratados para alcanzar un volumen 5 veces superior al inicial, frente a la dosis de radiación, muestra la relación existente entre ambos parámetros y permite calcular la

llamada constante de retraso g . La expresión matemática utilizada sería: $(T_d/T_0) = e^{gD}$, donde T_d es el tiempo necesario para incrementar 5 veces el volumen inicial de un esferoide irradiado a dosis D . T_0 es el tiempo necesario para que el esferoide no irradiado incremente 5 veces su volumen inicial.

3.6.2 Recrecimiento tras irradiación

El procedimiento experimental a seguir es el mismo que en el caso anterior. El análisis de los datos se realiza considerando un crecimiento gompertziano de los esferoides no tratados. Para representar la curva de crecimiento de los esferoides control, utilizamos el valor medio de los parámetros A correspondiente a cada esferoide mediante los procedimientos de normalización descritos en el apartado anterior.

En lo que se refiere a los esferoides tratados, el modelo propuesto por nosotros (Guirado *et al.*, 2003) presupone que, tras la irradiación, las células supervivientes son las únicas responsables del crecimiento tumoral y su crecimiento es idéntico al de las células Control sin irradiar.

La ecuación utilizada sería:

$$V_{(t)} = (V_0 - V_0^{\text{sup}}) + V_0^{\text{sup}} \cdot e^{\frac{A}{\alpha} [1 - e^{-\alpha t}]}$$

dónde V_0^{sup} es el volumen de la población superviviente que produce el recrecimiento del sistema, A y α son los parámetros del modelo de Gompertz para el crecimiento de dicha población y V_0 el volumen estimado a $t = 0$ (antes de la irradiación) para cada esferoide tratado.

Se procede entonces al ajuste de los parámetros de la ecuación V_0 , V_0^{sup} , A y α de modo que describan la variación del volumen de cada esferoide irradiado a distintas dosis, con el tiempo (Guirado *et al.*, 2003).

Una vez obtenidos los datos, puede obtenerse la fracción de supervivencia de forma

inmediata como:

$$S = \frac{V_0^{\text{sup}}}{V_0}$$

Por último, habrá de nuevo que normalizar los valores de A para un mismo volumen inicial, V_0^{sup} , de forma que se puedan obtener un conjunto de valores de A para cada dosis, comparable con los del grupo control.

Protocolos de irradiación:

Tanto para la estimación del retraso del crecimiento (GD) como para el recalcimiento tras irradiación, se ha aplicado una dosis aguda de 0, 2, 3, 5, 7, 9 y 12 Gy utilizando ^{60}Co como fuente de irradiación y una tasa de dosis de 1Gy/mn o bien el acelerador de electrones con las características citadas con anterioridad.

3.6.3 Probabilidad de control de esferoides (PCS)

Experimentalmente, los test útiles para identificar la población de esferoides multicelulares que tras irradiación no consiguen sobrevivir (esferoides controlados o *curados*), se realizan mediante la evaluación del crecimiento en monocapa de esferoides tratados con diferentes dosis de radiación.

Tras la exposición de los esferoides a la radiación según el protocolo de dosis, tiempo y fraccionamiento elegido, éstos se trasladan de forma individual a cajas de cultivo de 24 pocillos de superficie de cultivo apta para el crecimiento en monocapa. Una vez adherido el esferoide al plástico, se producirá el crecimiento en extensión de las células que lo componen.

Un esferoide se considera controlado, si es incapaz de crecer formando una monocapa de al menos 50.000 células alrededor del sitio de anclaje en un período de 90 días tras la siembra según algunos protocolos o bien observando el crecimiento de los esferoides no tratados y utilizándolos como modelo.

El protocolo es el siguiente:

- Se preparan esferoides de forma individual en placas que permitan su crecimiento en suspensión.
- Cada placa se somete a la dosis de radiación adecuada según el protocolo elegido, dejando siempre una placa sin irradiar o placa Control.
- Se trasladan los esferoides de forma individual a placas de cultivo que permitan su crecimiento en monocapa durante, al menos, 30 días. El medio de cultivo se debe cambiar cada 3-4 días.
- Se valora el crecimiento en monocapa del grupo de esferoides no sometidos a radiación (Grupo Control)
- El porcentaje de esferoides controlados se calcula como el radio entre los esferoides que no han recrecido y el número de esferoides puestos en cultivo para esa dosis.

Experimentalmente, una vez conocida la relación dosis efecto, es posible calcular la dosis que controla el 50% de los esferoides (SCD₅₀) y comparar la efectividad de diferentes protocolos de irradiación.

Protocolos de irradiación

- Dosis única de 0, 2,3,5,7,9 y 12 Gy
- Dosis partida en dos fracciones separadas 6 horas hasta completar una dosis total de 2, 3, 5, 7, 9 y 12 Gy.

3.6.4 Ensayo clonogénico o de formación de colonias

Los esferoides MCF7 de diámetro inferior a 200 μm , se irradian con un protocolo predeterminado en placas Petri de plástico bacteriológico en medio DMEM suplementado con 10% de FBS. En todos los casos hemos incluido un grupo control de

Material y métodos

esferoides no tratados con los que se sigue un protocolo idéntico al de los demás grupos, esto es, son trasladados al lugar de irradiación y manipulados en idénticas condiciones a cada uno de los grupos experimentales.

Transcurrido un tiempo variable tras el tratamiento, dependiendo de si el protocolo incluye la reparación del daño previo a la disgregación-siembra de clonógenos o de forma inmediata, se centrifugan a 1000 rpm durante 3 mn y se disgregan enzimática y mecánicamente obteniéndose así una suspensión de células individualizadas cuya densidad habrá de ser ajustada por nivel de dosis para obtener suficientes células clonogénicas tras el tratamiento.

Una vez ajustado el número de células para cada grupo experimental (Control y diferentes dosis de radiación) se procede a la siembra en las cajas de cultivo T-25 (tres cajas de cultivo para cada dosis), en condiciones de cultivo óptimo durante 14-21 días, transcurridos los cuales se elimina el medio de cultivo y las colonias formadas se tiñen con violeta de genciana. Finalmente, se contabilizan considerando como verdaderas colonias sólo aquellas agrupaciones de células con al menos 50 elementos.

La fracción de supervivencia celular (FS) para cada dosis se calcula mediante la expresión:

$$FS = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias observadas } \times \text{ eficiencia de clonaje}}{N^{\circ} \text{ de células sembradas}}$$

siendo la eficiencia de clonaje la capacidad clonogénica o capacidad de formación de colonias de las células no tratadas. Cada experimento se repitió, al menos, tres veces.

Finalmente se construyó la curva de supervivencia en la que se representa gráficamente, en coordenadas semilogarítmicas, la relación existente entre la fracción de supervivencia y Dosis. Para calcular los parámetros de supervivencia celular los valores de la fracción de supervivencia en función de la dosis se ajustaron al modelo lineal cuadrático utilizando un sistema de ajuste de curvas por el procedimiento de regresión no lineal.

La ecuación matemática del modelo lineal cuadrático (L-Q) es la siguiente:

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

Ajustando los puntos experimentales a este modelo se pueden deducir los parámetros α y β que son indicadores de la radiosensibilidad celular intrínseca. Otro parámetro de enorme interés en radiobiología, calculado también a partir de las distintas curvas de supervivencia, es la llamada fracción de supervivencia a 2 Gy (FS2).

Protocolos de irradiación

Utilizando bien Co^{60} bien acelerador de electrones el procedimiento de aplicación de dosis ha sido el siguiente:

Dosis única de: 0, 2, 3, 4, 5, 7,9, y 12 Gy y ensayo clonogénico inmediato tras irradiación.

Dosis previa de 9 Gy distribuida en 3 fracciones separadas 24 horas + dosis aguda de 0, 2, 3, 5, 7, 9 y 12 Gy.y ensayo clonogénico inmediato tras irradiación o retardando el ensayo clonogénico 24 horas.

Dosis previa de 3 Gy o de 6 Gy + dosis aguda de 0, 2, 3, 5, 7, 9, y 12 Gy dejando un intervalo entre la dosis previa y la dosis aguda de 4 horas.

3.6.5 Lesión molecular inicial radioinducida

La irradiación de esferoides multicelulares de diámetro inferior a 200 μm se efectuó en discos Petri situados sobre una base de hielo para impedir el reagrupamiento de fragmentos de ADN originados durante la irradiación tras la cual, los esferoides se colectan y centrifugan a 1000 rpm durante 10 mn y el *pellet* celular se resuspende en 300 μl de agarosa tipo IX al 1% en PBS. Una alícuota de la suspensión celular resultante se pipetea sobre un molde (BioRad, 250 μl) y se mantiene a 4°C hasta su completa gelificación (aproximadamente 1 hora).

Para permitir la movilidad en la electroforesis del DNA de las células tratadas, el

Material y métodos

plug de agarosa conteniendo las células se somete a la acción de una disolución tampón (tampón de lisis) con objeto de destruir la membrana celular por solubilización y separar las proteínas que junto con el DNA constituyen la cromatina (Iliakis, 1991). El tampón se deja actuar, primero, durante una hora a 4° C de temperatura y, después, a 37° C durante 24 horas más. Este procedimiento se estima suficiente para la liberación completa del DNA realizada inmediatamente o tras almacenamiento de las muestras a 4° C durante períodos de tiempo no superiores a 15 días. Tiempos de almacenamiento superiores facilitan la degradación del DNA (Whitaker y McMillan, 1992).

Protocolos de irradiación

1. Dosis aguda: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 Gy
2. Dosis previa: 18 Gy fraccionada en 6 Gy/24 horas + dosis aguda de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 Gy
3. Dosis previa: 6 Gy + dosis aguda de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, y 45 Gy con un intervalo entre la dosis previa y la dosis aguda de 6 horas en algunos experimentos y de 24 horas en otros.

3.6.6 Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Una vez lisadas las células contenidas en los *plugs*, se cortan los fragmentos de los mismos y se depositan en los pozos de un gel de agarosa (agarosa tipo VII (Sigma) al 0.8% en TBE 0,5x). Tras sellar con agarosa los pozos del gel, éste se introduce en la cubeta de electroforesis previamente cargada con tampón TBE 0.5x (pH=8.2) termostatzado a una temperatura de 14-16 °C.

Los geles se sometieron durante 96 horas al campo eléctrico creado por una diferencia de potencial de 45 voltios. El sentido del campo eléctrico (pulso) se reguló cada 60 minutos en dos direcciones distintas con un ángulo de separación de 120°. Cuando finalizó el tiempo de electroforesis programado, el gel se tiñó con una

disolución acuosa de bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) durante al menos dos horas. Finalmente, se lava con agua destilada (mínimo 4 horas) y se fotografía bajo iluminación ultravioleta.

Dos de los pocillos del gel, en cada uno de los experimentos, se cargaron con *plugs* que incluían cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (BioRad) y *Schizosacharomyces pombe* (BioRad) de tamaño conocido (*S.Cerevisiae*: 2.2; 1.6 y 1.1 megapares de bases (Mpb) y *S. Pombe* 5.7; 4.6 y 3.5 Mpb) y la posición a la que cada uno de ellos migra tras la electroforesis, sirvió para calibrar los fragmentos de DNA de cada una de las muestras del gel en función de su tamaño. Entre el tamaño del cromosoma expresado en Mpb y su distancia de migración existe una relación lineal. Los puntos experimentales de cada una de las relaciones tamaño/distancia se ajustaron a una línea recta, utilizando para ello el método de mínimos cuadrados. De esta manera es posible calcular el tamaño medio de los fragmentos de DNA separados por electroforesis según su posición en el gel.

3.6.7 Reagrupamiento de cadenas de DNA fragmentado tras irradiación

Para estudiar la cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación seguimos, inicialmente, un procedimiento experimental análogo al descrito en el apartado anterior.

Las cajas Petri conteniendo los esferoides multicelulares se irradiaron a una dosis total de 45 Gy sobre una superficie de hielo picado fundente para evitar procesos de reparación de las lesiones moleculares radioinducidas durante el tiempo de irradiación. Tras irradiación, se centrifugan los esferoides en centrífuga refrigerada a 4 °C y se reemplaza el medio frío por medio nutriente completo a 37 °C para permitir los procesos enzimáticos de reparación y reagrupamiento de lesiones moleculares. El tiempo de reparación/reagrupamiento permitido ha sido variable: 0, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos y 2, 3, 4, 6, 8, 18 y 24 horas. El reagrupamiento de las cadenas de DNA

Material y métodos

rotas se detuvo en cada uno de los tiempos especificados, centrifugando el medio en centrífuga refrigerada a 4°C durante 3 minutos y sustituyendo el medio de cultivo por otro frío que no contiene FBS. Las placas se mantuvieron en cámara fría sobre hielo picado. Al término del período máximo de reagrupamiento permitido (24 horas), los esferoides se colectan y se centrifugan a 4°C. El sedimento celular obtenido se resuspende en 300 µl de agarosa tipo IX al 1% en PBS. Una alícuota de esta suspensión resultante se pipetea sobre un molde (Biorad, 250 µl) y se mantiene a 4° C hasta completar la gelificación (aproximadamente 1 hora). Una vez obtenidos los *plugs* o moldes, la lisis celular se realiza de acuerdo con el procedimiento descrito para la lesión molecular inicial radioinducida.

Protocolos de irradiación:

- Dosis única de 45 Gy y tiempos de reparación variables hasta 24 horas
- Dosis previa de 6 Gy + dosis de 45 Gy y tiempos de reparación variables. El tiempo de separación entre la dosis previa y la administración de los 45 Gy en una sola dosis ha sido de 6 horas para algunos experimentos y de 24 horas para otros.

3.6.8 Estimación de los parámetros de radiosensibilidad molecular

3.6.8.1 Método de análisis semicuantitativo

El número de rupturas dobles de cadena de DNA inducido inicialmente sobre las células expuestas a distintos agentes citotóxicos se cree que está relacionado con la fracción de DNA fragmentado tras tratamiento y que posee el tamaño apropiado para migrar en el gel en las condiciones de electroforesis anteriormente descritas (Ruiz de Almodóvar *et al.*, 1994).

La relación entre la dosis de radiación administrada en los distintos protocolos y el daño inducido sobre el DNA se estima, una vez sometido el gel a electroforesis de

campo pulsado y teñido con bromuro de etidio, por la fracción de DNA que queda retenida en el pozo (FR) que será proporcional a la intensidad de tinción por el bromuro de etidio a ese nivel.

Esta fracción se calcula de la siguiente forma:

$$FR = \frac{I(\text{pozo})}{I(\text{pozo}) + I(\text{línea})}$$

siendo I la intensidad de tinción.

3.6.8.2 Determinación del número de rupturas dobles de cadena de DNA. Método de análisis cuantitativo

Para cuantificar de manera más precisa los datos obtenidos de los experimentos de lesión inicial radioinducida con PFGE, Cook y Mortimer (Cook y Mortimer, 1991) han propuesto un modelo de análisis basado en las siguientes premisas:

1. La producción de una rdc de DNA en cualquier localización del genoma es equiprobable e independiente de la localización de rupturas anteriores.

2.- Si lo anterior es válido, el promedio del número de rdc en moléculas o partes de moléculas debe ser proporcional a su longitud.

3.- La ecuación de Poisson describe la frecuencia del número de rupturas dobles de cadena y la distribución de tamaño de los fragmentos rotos.

La ecuación que describe la frecuencia de la distribución del tamaño de los fragmentos de DNA, cuando se realiza el análisis de la intensidad de tinción con bromuro de etidio, detectada en la línea del gel de electroforesis es:

$$F(x) = (\mu / S) e^{-(\mu / S)} G(x) \quad [I]$$

donde

$$G(x) = x \cdot [2 + \mu(S - x) / S]$$

siendo:

$F(x)$, la *intensidad* de distribución de los fragmentos

x , el tamaño del fragmento

S , el tamaño del cromosoma intacto

μ , el promedio de rupturas por cromosoma.

Utilizando como base este modelo matemático, se ha derivado un sistema de ecuaciones que permite la aplicación del mismo al estudio de la distribución de tamaños de fragmentos de ADN procedentes de células humanas sometidas a irradiación (Ruiz de Almodóvar *et al.*, 1.994). Para ello, se hace uso de los datos cuantitativos de intensidad lumínica relativa por segmento, tras PFGE, medida en cada sección de la línea del gel relacionándose esta distribución con el tamaño medio relativo (x/S) del fragmento de ADN. En este trabajo hemos utilizado para S el valor de 200 Mpb.

Aplicando la ecuación [I] a cada una de las distribuciones de intensidad lumínica originadas tras la irradiación de las células a dos dosis D_1 y D_2 distintas (siendo $D_2 > D_1$), tenemos:

$$F(x_1) = (\mu_1 / S) e^{-(\mu_1 x / S)} G(x_1)$$

$$F(x_2) = (\mu_2 / S) e^{-(\mu_2 x / S)} G(x_2)$$

dividiendo, ahora, una ecuación por otra, tenemos:

$$F_R = \frac{F(x_1)}{F(x_2)} = A e^{[(\mu_1 - \mu_2) x / S]}$$

donde

$$A = \frac{x \frac{\mu_1}{S} \left[2 + (S-x) \frac{\mu_1}{S} \right]}{x \frac{\mu_2}{S} \left[2 + (S-x) \frac{\mu_2}{S} \right]}$$

Si x tiende a cero, esto es, cuando los fragmentos de ADN son muy pequeños en relación al tamaño del cromosoma, circunstancia que ocurre para la técnica de PFGE en la que el límite de tamaño de ADN que penetra en el gel es del orden del 5% del tamaño del cromosoma humano (Ahn, 1991), podemos simplificar la ecuación anterior y, llamando A_0 al límite de A cuando x tiende a 0, tenemos:

$$A_0 = \frac{\mu_1 (2 + \mu_1)}{\mu_2 (2 + \mu_2)} \quad \text{[II]}$$

y

$$F_R = A_0 e^{\frac{(\mu_2 - \mu_1)x}{S}} \quad \text{[III]}$$

o

$$\ln(F_R) = (\mu_2 - \mu_1) \frac{x}{S} + \ln(A_0) \quad \text{[IV]}$$

La representación gráfica de $\ln(F_R)$ frente a x/S da una línea recta de pendiente $(\mu_2 - \mu_1)$ e intercepción en el origen, $\ln(A_0)$. Si B es el valor de la pendiente de esa recta, entonces $B = \mu_2 - \mu_1$. Utilizando este valor en la ecuación [III], podemos resolver un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas y obtener los valores individuales del

Material y métodos

promedio de rdc de ADN para cada una de las dos dosis de radiación utilizadas: (μ_1), promedio de rdc originadas por la dosis D_1 , y (μ_2), promedio de rdc originadas por la dosis D_2 .

La solución para μ_1 es:

$$2\mu_1 + \mu_1^2 = 2A_0(B + \mu_1) + A_0(B + \mu_1)^2 \quad [V]$$

y despejando μ_1 , se obtiene:

$$\mu_1 = \frac{-(2 - 2A_0 - 2A_0B) + \sqrt{(2 - 2A_0 - 2A_0B)^2 + 4(1 - A_0)(A_0B)(2 + B)}}{2(1 - A_0)}$$

μ_2 se calcula, una vez conocido μ_1 , a partir de $B = \mu_2 - \mu_1$.

Así, la comparación de distribuciones de actividad para dos dosis produce un número de rdc (μ) para cada dosis. La representación de μ frente a la dosis (D) está compuesta por una combinación de todos los valores μ derivados de todas las posibles comparaciones entre dos dosis diferentes. La pendiente de esta línea da la frecuencia de inducción de rdc de ADN (en términos de rdc Gy^{-1} unidad de ADN^{-1}).

3.6.8.3 Método de estudio de la cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA.

Para estudiar de manera cuantitativa la capacidad de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA hemos procedido de la siguiente forma.

La fracción de DNA retenida en el pocillo (FR) en función del tiempo de incubación postirradiación se calculó para cada uno de los puntos experimentales siempre a la fracción de DNA retenida en el pocillo del tiempo 0 y estableciendo un

seguimiento en el tiempo partiendo del tiempo 0 tras irradiación. La capacidad de reagrupamiento de rdc se evaluó calculando la relación:

$$FR = FE_{(t)} / FE_{(0)}$$

Dónde FR significa fracción de reagrupamiento, $FE_{(t)}$ y $FE_{(0)}$ representan, respectivamente la fracción extraída al tiempo t y la fracción extraída al tiempo 0. Los valores de FR obtenidos se representan finalmente en función del tiempo de incubación permitido tras irradiación ajustando los datos experimentales a una ecuación doble exponencial.

3.6.9 Ciclo celular

Para estudiar la distribución celular en las distintas fases del ciclo mitótico, tras distintos protocolos de tratamiento con radiación ionizante, hemos utilizado técnicas de citometría de flujo. Para ello, se disgregan los esferoides multicelulares con una mezcla enzimática primero seguida de disgregación mecánica con jeringa de insulina hasta obtener una suspensión monocelular. A continuación, se centrifugan durante 3 minutos a 1000 rpm y se retira el sobrenadante. El sedimento celular resultante se resuspende de nuevo en 1ml de la llamada disolución de Vindelov que contiene ioduro de propidio. La suspensión celular resultante se incuba a 4°C durante 10 minutos, tras lo cual una parte alícuota de la misma ya se puede analizar en el citómetro de flujo (Ortho Cyteron Absolute Flow Cytometer) utilizando 488nm como longitud de onda de excitación y 560 nm como longitud de onda de emisión. La proporción de células existente en cada una de las diferentes fases del ciclo se calculó, en nuestro caso, a partir de su contenido en DNA, utilizando el programa “Cell Cycle” de Ortho

Material y métodos

Protocolos de irradiación:

Los experimentos encaminados a determinar cuantitativamente la distribución celular se realizaron en las siguientes situaciones:

- 1.- Tras irradiación celular con dosis única de 3 y de 6 Gy.
- 2.- Tras irradiación con 6 Gy de dosis total en 2 fracciones de 3 Gy separadas 24 horas.
- 3.- Tras irradiación con 9 Gy de dosis total en 3 fracciones de 3 Gy separadas 24 horas
- 4.- Tras irradiación de 12 Gy de dosis total en 2 fracciones de 6 Gy separadas 24 horas.

Las perturbaciones del ciclo celular ocasionadas en cada caso, se estudiaron a intervalos de tiempo de 4 horas hasta completar un total de 48 horas tras la irradiación.

3.6.10 Tratamiento de los esferoides con antiestrógenos.

El protocolo experimental seguido para evaluar el efecto del Hidroxitamoxifeno sobre la cinética de proliferación de los esferoides fue el siguiente:

Los esferoides multicelulares se mantuvieron durante 3 días con medio de cultivo estándar al que se le adicionó OH-TAM a concentraciones de 0.1 μM o 0.01 μM .

En estas condiciones se procedió a realizar los siguientes experimentos:

1. Análisis de la distribución en el ciclo celular de las células que componen el esferoide
2. Irradiación según el protocolo de dosis aguda con rango de dosis comprendido entre 2 y 7 Gy y posteriormente análisis de la capacidad de recrecimiento en suspensión y en monocapa.

Los experimentos realizados para determinar la cinética de crecimiento de los esferoides sometidos a terapia antihormonal y el posterior efecto *rescate* del 17 β estradiol se realizaron de la siguiente forma:

1. Mantenimiento y seguimiento de los esferoides durante 14 días con medio de cultivo estándar al que se le adicionó OH-TAM a concentraciones de 0.01 a 1 μ M.

2. Mantenimiento y seguimiento de los esferoides durante 7 días con medio de cultivo estándar al que se le adicionó OH-TAM a concentración de 0.1 μ M y posterior cambio de medio por otro conteniendo 17 β estradiol a concentración de 1 μ M.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE ESFEROIDES MCF7. MODELOS MATEMÁTICOS DE AJUSTE.

La cinética de crecimiento de los esferoides multicelulares MCF7 se ajustan con gran precisión al modelo gompertziano. Los parámetros A y \forall obtenidos a partir de este modelo matemático y que definen la curva estándar de crecimiento se han calculado mediante los dos procedimientos de normalización a un volumen inicial común (V_0) descrito en el apartado de Material y Métodos:

i) El procedimiento clásico que considera el volumen inicial relativo igual a 1, y
ii) el procedimiento descrito por Guirado *et al.*, (2003) que establece un valor de V_0 tras el ajuste de los datos a un modelo de crecimiento Gompertziano. La consideración de un V_0 estimado por uno u otro procedimiento influye en los parámetros derivados de la ecuación de Gompertz. Así, el volumen teórico máximo que alcanza un mismo esferoide es distinto si se calcula considerando un volumen inicial u otro, sin embargo, la normalización a un volumen inicial común de forma adecuada subsana esta

Resultados

diferencia. Igualmente, el parámetro A de la ecuación de Gompertz también ofrece un resultado diferente según se emplee uno u otro procedimiento. Así, si consideramos un volumen inicial V_0 y otro distinto V'_0 observados experimentalmente, y deducimos el valor de A para ambas situaciones la ecuación de Gompertz para una y otra situación quedaría como:

$$V_{(t)} = V_0 \cdot e^{\left(\frac{A}{\alpha} \cdot e^{(1-\alpha)t}\right)}$$

$$V_{(t)} = V'_0 \cdot e^{\left(\frac{A'}{\alpha'} \cdot e^{(1-\alpha')t}\right)}$$

de donde
$$V_0 \cdot e^{\frac{A}{\alpha}} = V'_0 \cdot e^{\frac{A'}{\alpha'}}$$

$$\frac{V_0}{V'_0} = \frac{e^{\frac{A'}{\alpha'}}}{e^{\frac{A}{\alpha}}} = e^{\left(\frac{A' - A}{\alpha' \alpha}\right)}$$

$$\text{Ln}\left(\frac{V_0}{V'_0}\right) = \frac{A' - A}{\alpha' \alpha} \Rightarrow \frac{A'}{\alpha'} = \frac{A}{\alpha} + \text{Ln}\left(\frac{V_0}{V'_0}\right)$$

se puede demostrar que $\alpha = \alpha'$ por tanto

$$A' = A + \alpha \cdot \text{Ln}\left(\frac{V_0}{V'_0}\right)$$

deduciéndose que el parámetro A tiene un valor diferente y por tanto es necesario una normalización que no altere los parámetros de la ecuación.

Los resultados de ambos procedimientos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Valores de los parámetros A, α , A' y α' derivados de la ecuación de Gompertz obtenidos mediante la aproximación clásica y por el método de renormalización a VIC (volumen inicial común) respectivamente. Se expresan valores medios y desviación estándar de 14 esferoides seguidos durante 20 días.

	A	A'	α	α'
Media	0.358	0.506	0.063	0.066
Desviación estándar	0.015	0.021	0.003	0.003

4.2 EFECTO DEL ANTIESTRÓGENO HIDROXITAMOXIFENO (OH-TAM) SOBRE LOS ESFEROIDES MCF7.

Los esferoides multicelulares MCF7 presentan una acusada dependencia a los estrógenos tanto para su formación como para su crecimiento. La adición al medio de cultivo del antiestrógeno OH-TAM a concentraciones adecuadas modifica su cinética de crecimiento. Hemos estudiado el efecto inhibitorio que el antiestrógeno tiene sobre el crecimiento de los esferoides MCF7 de tres formas: i) comprobando el efecto antiproliferativo del antiestrógeno en concentraciones comprendidas entre 0.01 y 1 μM en esferoides individualizados creciendo en medio de cultivo estándar; ii) una vez elegida la concentración fija de 0.1 μM , para un grupo de esferoides mantenidos en conjunto en discos Petri hemos evaluado su crecimiento durante 30 días y, iii) determinando la evolución de los esferoides sometidos a tratamiento secuencial, primero OH-TAM, 0.1 μM durante 8-10 días, y posteriormente *rescatados* mediante el cambio de medio de cultivo por medio estándar con 17 β estradiol 1 nM.

Resultados

La Figura 1 muestra la variación del volumen de esferoides creciendo en condiciones óptimas de cultivo (Control) y el de aquellos otros sometidos a tratamiento antihormonal en un rango de concentraciones comprendidas entre 0.01: M y 1 μ M. El tiempo de seguimiento de los esferoides varió desde 20 a 40 días en función de su capacidad para mantener una estructura tridimensional.

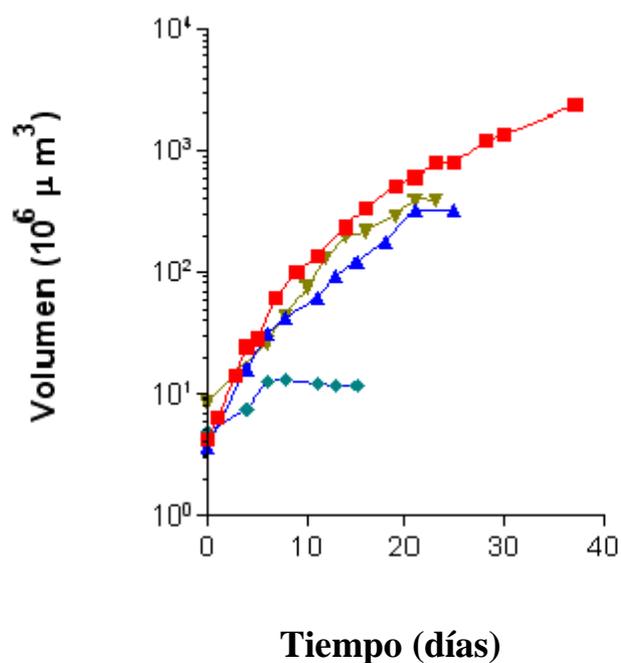


Figura 1. Crecimiento de los esferoides MCF7 en condiciones de cultivo estándar (○) y tratados con 0.01 (◻), 0.1 (◻) y 1: M (◻) de OH-Tamoxifeno.

En la Figura 2 se muestra el crecimiento de los esferoides sometidos a tratamiento antiestrogénico con OH-TAM a concentración de 0.1 μ M y aquellos a los que transcurridas 168 horas se les cambia el medio de cultivo por otro conteniendo estradiol a concentración 0.1 μ M.

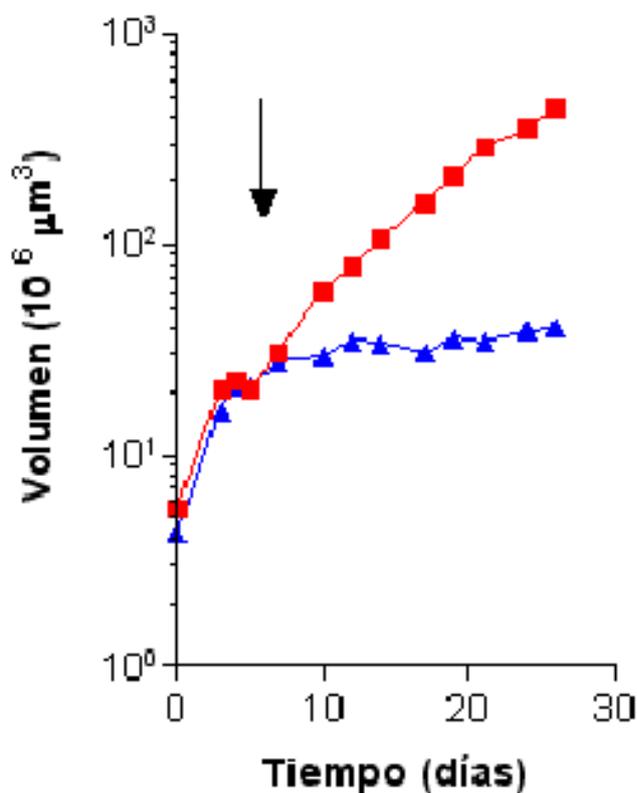


Figura 2. Efecto del rescate estrogénico (□) sobre el crecimiento de los esferoideos tratados durante 168 horas con OH-TAM (0.1 μM) (▣)

Mediante citometría de flujo es posible determinar el estado proliferativo de la población celular que conforma los esferoideos. La distribución en el ciclo celular de los elementos formes de los esferoideos MCF7 durante el tratamiento con OH-TAM y posterior rescate con estradiol se muestran en la Figura 3. Los datos utilizados en la elaboración de esta figura se muestran en la Tabla 2 y se comparan con los obtenidos para esferoideos MCF7 del mismo tamaño creciendo en condiciones de cultivo estándar.

Tabla 2

Distribución en las distintas fases del ciclo celular de las células de los esferoides MCF7 de tamaño inferior a 200 μm de diámetro cultivadas en: a) condiciones de cultivo estándar (DMEM + 10% FBS) y b) cultivadas durante 72 h con OH-TAM a concentración 1 μM y posterior rescate con estradiol (E_2) 10 nM. Se representan los porcentajes medios y la desviación estándar de al menos tres experimentos.

Fases del ciclo celular	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
DMEM+10% FBS	47 ∇ 3	35 ∇ 11	18 ∇ 2
OH-TAM 1 μM (72 h)	70 ∇ 14	16 ∇ 5	14 ∇ 7
OH-TAM (72 h)/E ₂ (28 h)	46 ∇ 4	50 ∇ 8	4 ∇ 1

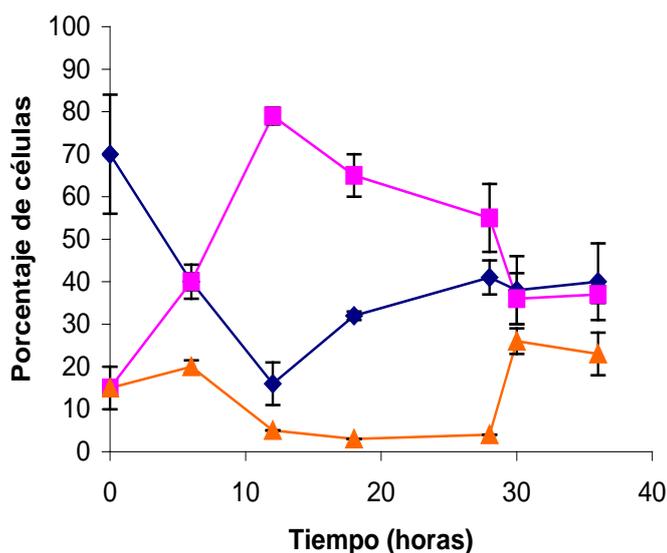


Figura 3. Efecto del rescate estrogénico sobre la distribución de las células de esferoides MCF7 tratados durante 72 horas con OH-TAM (0.1 μM) en fases G₀/G₁ (□), S (▣) y G₂/M (▢) del ciclo celular.

4.3 RESPUESTA A LA RADIACIÓN DE LOS ESFEROIDES MCF7

4.3.1 Procedimientos experimentales que no modifican la estructura tridimensional del modelo

Para valorar las posibles modificaciones de la cinética de crecimiento tras irradiación de los esferoides MCF7 hemos seguido una serie de procedimientos experimentales, por ejemplo la disgregación enzimática, que requieren la modificación de la estructura del modelo. Esto podría favorecer el estudio de la expresión del daño, sin embargo, también es posible estudiar la radiosensibilidad celular sin necesidad de disgregar el esferoide así como considerar la respuesta global de los esferoides tras la administración de distintas dosis de radiación. A continuación se muestran los valores de los parámetros obtenidos para cada uno de los protocolos experimentales.

4.3.1.1 Recrecimiento tras irradiación de esferoides multicelulares

Para llevar a cabo este protocolo experimental se procede a la medida de los volúmenes de los esferoides irradiados, obtenida mediante tallado diario de los esferoides cultivados de forma individual. Se comparan con las medidas obtenidas de los esferoides no irradiados creciendo en las mismas condiciones de cultivo. En todos los casos se procede al cambio de medio de cultivo cada 72 horas lo que garantiza el correcto aporte de nutrientes.

En la Figura 4 se muestra la evolución en el tiempo del crecimiento de los esferoides MCF7 sometidos a dosis de radiación comprendidas entre 0 (Control) y 12 Gy, normalizado a un volumen inicial común por el procedimiento clásico.

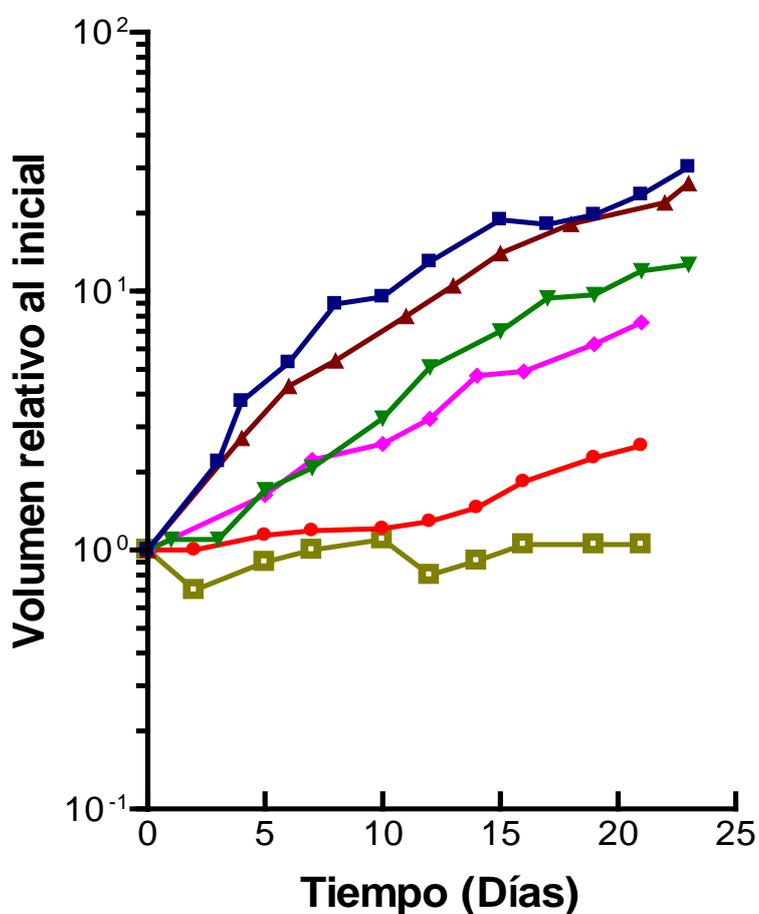


Figura 4. Efecto de la radiación sobre la cinética de crecimiento de los esferoides MCF7 (Control ■, 2 ◻, 3 ▼, 6 ◻, 9 ◻ y 12 Gy ●)

Con los datos de crecimiento de los esferoides tras irradiación se puede calcular el retraso en el crecimiento (GD) o tiempo necesario para que el esferoide irradiado recupere la cinética de crecimiento correspondiente al grupo Control. En nuestro caso,

como se ha detallado en el apartado de Material y Métodos, se ha elegido un factor de multiplicación 5 sobre el volumen inicial. De esta forma, mediante el procedimiento de normalización clásico, hemos obtenido el GD, expresado por el valor g (pendiente de la recta de ajuste) de los esferoides sometidos a una dosis de radiación de 0 a 9 Gy y seguidos en su crecimiento durante 20 días, (Figura 5).

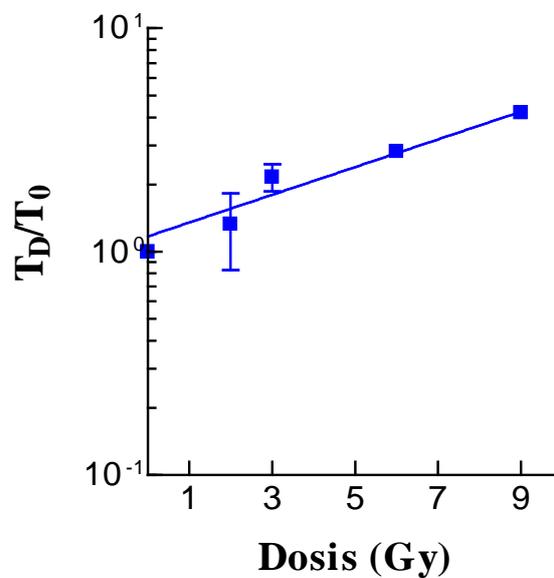


Figura 5. Radiosensibilidad de esferoides MCF7 expresada como cociente de tiempos requeridos para incrementar 5 veces el volumen inicial tras dosis aguda de irradiación.

Resultados

En la **Tabla 3** se muestran los valores de GD para el mismo rango de dosis utilizando distintos factores de multiplicación.

	Dosis (Gy)	t	
		5 x	8 x
Growth delay (GD)	0	5.70	8.29
	2	7.56	11.06
	3	12.32	16.19
	6	15.99	20.93
	9	27.45	32.75

Tabla 4

Volumen de los esferoides MCF7 relativo al volumen inicial considerado como la primera medida experimental. Los esferoides irradiados con dosis única de 0 (Control) a 9 Gy, se tallan cada 2 ó 3 días hasta un total de 23 días.

Tiempo (días)	Volumen relativo				
	Control	2 Gy	3 Gy	6 Gy	9 Gy
0	1	1	1	1	1
1	-	-	1.1	-	-
2	-	-	-	-	1
3	2.2	-	1.1	-	-
4	3.76	2.71	-	-	-
5	-	-	1.71	1.63	1.14
6	5.3	4.3	-	-	-
7	-	-	2.08	2.23	1.19
8	8.91	5.4	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	9.5	-	3.23	2.57	1.21
11	-	8	-	-	-
12	13	-	5.08	3.22	1.29
13	-	10.5	-	-	-
14	-	-	-	4.72	1.46
15	18.9	14	7.01	-	-
16	-	-	-	4.9	1.84
17	18.14	-	9.39	-	-
18	-	18.2	-	-	-
19	19.75	-	9.69	6.24	2.27
20	-	-	-	-	-
21	23.6	-	11.98	7.57	2.53
22	-	22.0	-	-	-
23	30.24	26.1	12.68	-	-

Una vez elegido el factor de multiplicación (x5) y calculado el retraso del crecimiento, hemos estimado la fracción de supervivencia (FS). Los datos experimentales (Tabla 4),

Resultados

una vez ajustados a la ecuación del modelo lineal cuadrático permiten deducir los parámetros α y β para estos esferoides. (Tabla 5).

Tabla 5

Parámetros de radiosensibilidad derivados del recrecimiento tras irradiación. Se expresa la media y la desviación estándar de al menos 3 experimentos

Parámetros	
α (Gy ⁻¹)	0.674 ± 0.231
β (Gy ⁻²)	0.112 ± 0.041
FS (2 Gy) (%)	43.8 ± 12.6

Como en el caso de los esferoides no tratados es interesante también estudiar para los esferoides irradiados el efecto de la normalización a volumen inicial común (VIC). Para ello hemos analizado una serie de esferoides irradiados de 0 a 5 Gy, tallados día a día durante 14 días. En la Figura 6 se representan los resultados del parámetro A de la ecuación de Gompertz obtenido sin normalizar a un volumen inicial común (\square), los normalizados (\sim). Se observan dos hechos destacables: i) que la incertidumbre asociada a la determinación de A es mayor que para los esferoides no tratados antes y ii) que los valores de A obtenidos son compatibles con el correspondiente a los esferoides control. Por tanto, la ausencia de normalización impide detectar la influencia que la radiación ejerce sobre la forma de crecimiento de los esferoides; esto es consecuencia de la mezcla estadística de etapas de crecimiento distintas en el conjunto de esferoides analizados.

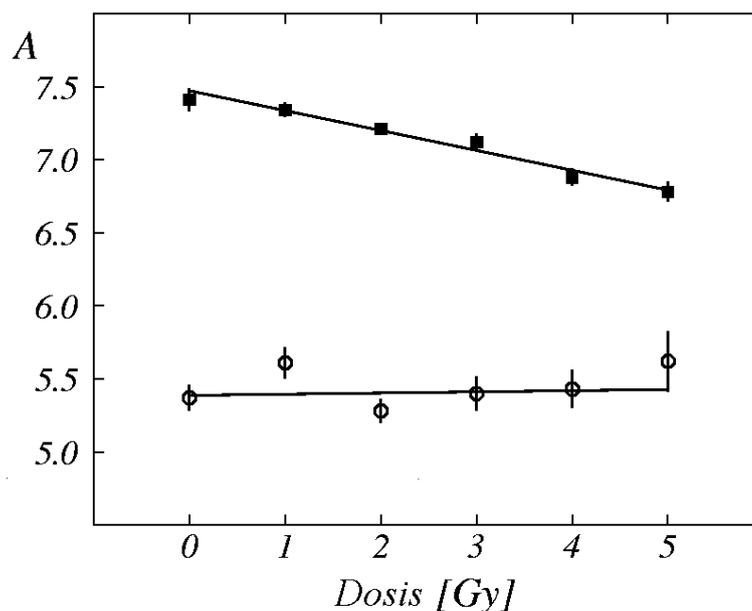


Figura 6. Variación del parámetro A con la dosis. Los cuadrados negros corresponden a nuestro método de análisis de normalización a volumen inicial común (VIC), los círculos representan los datos obtenidos sin normalizar a un volumen común inicial (VIC). Las incertidumbres corresponden a una desviación estándar.

4.3.1.2 Control tumoral o cure

Experimentalmente, los test de control tumoral o *cure*, se basan en la capacidad de los esferoides no disgregados para recrecer en monocapa tras irradiación como se ha descrito en el apartado de Material y Métodos. Por este procedimiento, es posible estimar no solo la dosis de radiación capaz de controlar el 50% de los esferoides (PCS50) sino que además permite la derivación de los parámetros de radiosensibilidad del modelo lineal-cuadrático α y β .

La Figura 7 muestra la relación entre dosis de radiación y probabilidad de control tumoral tras distintas dosis de radiación. Se han realizado al menos tres

Resultados

experimentos para cada dosis de radiación. Los resultados se expresan como la media aritmética comprendida en un rango de dosis con un intervalo de confianza del 95%. Igualmente, es posible calcular la fracción de supervivencia y los parámetros α y β del modelo lineal cuadrático obtenidos por este procedimiento experimental así como el parámetro k que representa la unidad de regeneración celular (Tabla 6).

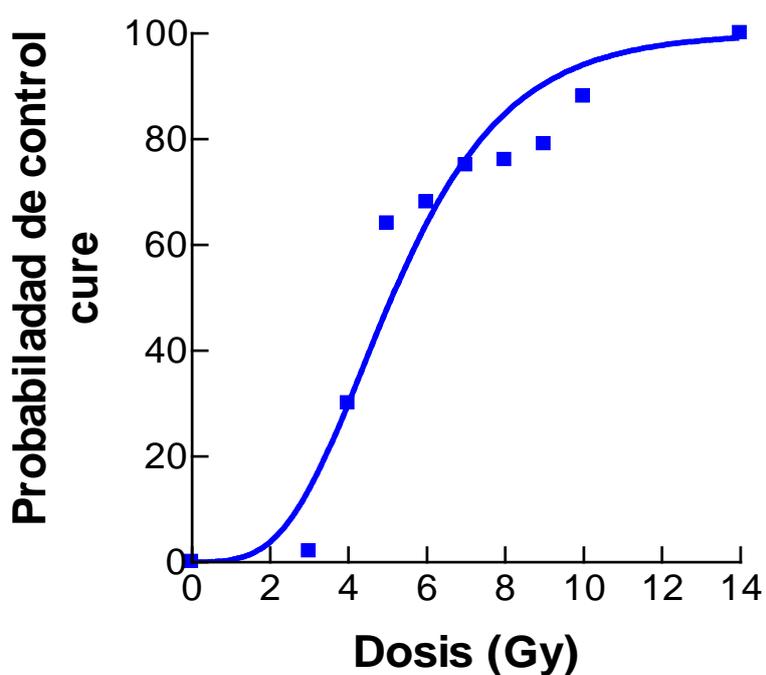


Figura 7. Curva de control de esferoides MCF7 de 200-250 μm de diámetro tras irradiación única a dosis comprendida entre 0 y 14 Gy. La probabilidad se expresa como porcentaje referido al Control

Tabla 6

Parámetros de radiosensibilidad α y β derivados del ajuste lineal cuadrático, constante k y dosis que controla el 50% de los esferoides según la capacidad de recrecimiento en monocapa tras irradiación de los esferoides MCF7 irradiados a dosis comprendidas entre 0 y 14 Gy. Se muestran los valores para un intervalo de confianza del 95%.

Parámetros de radiosensibilidad	
\forall (Gy ⁻¹)	0.161 ± 0.110
\exists (Gy ⁻²)	0.022 ± 0.005
k	2.36(IC95%:0.52-10.66)
SCD 50%	5.51 \forall 0.26

Una vez obtenidos los parámetros de radiosensibilidad de los esferoides MCF7 utilizando procedimientos experimentales que no requieren la alteración del modelo tras irradiación, se muestra en la Tabla 7 los datos correspondientes a ambos ajuste y los que se estiman para la línea celular MCF7 crecida en monocapa.

Tabla 7

Parámetros de radiosensibilidad de esferoides multicelulares estimados sin alterar la estructura tridimensional del modelo. Se expresan los valores de SF2Gy obtenidos por el procedimiento de seguimiento del volumen tras irradiación por el procedimiento de recrecimiento en monocapa. Se expresan también los valores de los parámetros \forall y \exists correspondientes al ajuste de los datos al modelo lineal cuadrático y el factor g para un factor de multiplicación 5x

	Cultivo en esferoides	Cultivo en monocapa
Recrecimiento tras irradiación sin normalizar	SF2Gy = $43.8 \pm 3\%$	SF2Gy = $50 \pm 2\%$
	$\forall = 0.674. \pm 0.03 \text{ Gy}^{-1}$	$\forall = 0.321 \forall 0.02 \text{ Gy}^{-1}$
	$\exists = 0.112 \pm 0.008 \text{ Gy}^{-2}$	$\exists = 0.023 \forall 0.006 \text{ Gy}^{-2}$
	$g = 0.17 \text{ días}^{-1} \forall 0.01$	-
Recrecimiento tras irradiación con normalización	SF2Gy = $76 \pm 3\%$	-
	$\forall = 0.125. \pm 0.03 \text{ Gy}^{-1}$	-
	$\exists = 0.019 \pm 0.008 \text{ Gy}^{-2}$	-
Recrecimiento en monocapa	SF2Gy = $66 \pm 2\%$	-
	$\forall = 0.161. \pm 0.110 \text{ Gy}^{-1}$	-
	$\exists = 0.022 \pm 0.005 \text{ Gy}^{-2}$	-
	SCD 50% = 5.51 ± 0.26	-

4.3.2 Procedimientos experimentales que requieren la ruptura de la estructura tridimensional del modelo

4.3.2.1 Ensayo clonogénico

El ensayo clonogénico es un ensayo de referencia para valorar la capacidad de supervivencia celular tras irradiación en muchos modelos experimentales. En orden a determinar si es posible utilizar este ensayo en nuestro modelo y cuantificar la radiosensibilidad con el mismo procedimiento que el empleado para las células MCF7 cultivadas en monocapa lo hemos aplicado sobre los esferoides mantenidos en suspensión tras tratamiento con dosis de radiación comprendidas, entre 0 y 12 Gy.

Los experimentos de irradiación aguda en los que se ha estimado la supervivencia celular clonogénica de los esferoides MCF7 se han realizado para volúmenes de esferoides que no sobrepasen las 300 μm de diámetro lo que asegura el correcto aporte de nutrientes. La Tabla 8 muestra un ejemplo de los datos de supervivencia obtenidos en esferoides multicelulares tras una dosis de radiación de 0 (Control) a 12 Gy. Los datos se refieren a tres puntos experimentales para cada dosis considerando el 100% la media aritmética de la dosis 0 o Control. Asimismo, en las Figura 8 y 9, se representan dos ejemplos de estos experimentos en los que se muestra la relación entre la fracción de supervivencia en escala logarítmica y la Dosis. Los valores de los parámetros α y β del ajuste al modelo lineal cuadrático se muestran dentro de cada figura no variando significativamente entre experimentos.

Los buenos ajustes de los resultados al modelo lineal cuadrático vienen avalados por unos coeficientes de correlación de 0.975 y 0.966, respectivamente.

Tabla 8

Ensayo de supervivencia celular en esferoides multicelulares

Dosis (Gy)	FS*		
0	100		
2	72.89	82.24	74.51
3	48.59	47.66	47.66
5	16.91	18.69	14.01
7	7.38	6.54	
9	0.0016	0.0018	
12	0.000205	0.000308	

**Corregida por eficiencia de clonaje de 10.76 %*

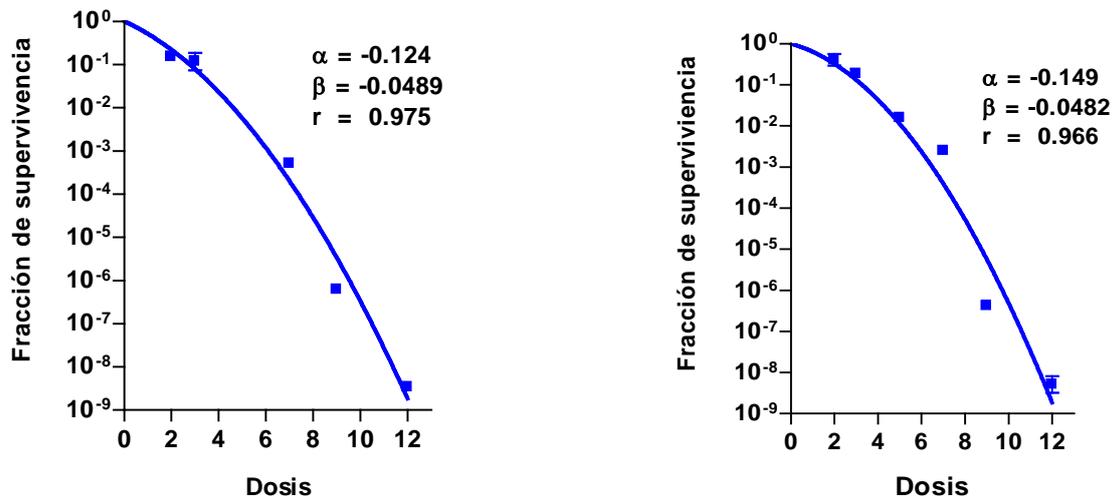


Figura 8 y 9. Ensayo de supervivencia celular de esferoides $\leq 300 \mu$ de diámetro irradiados con dosis única

Así mismo, en la figura 10, se muestra la supervivencia celular en las células MCF7 BB cultivadas en monocapa.

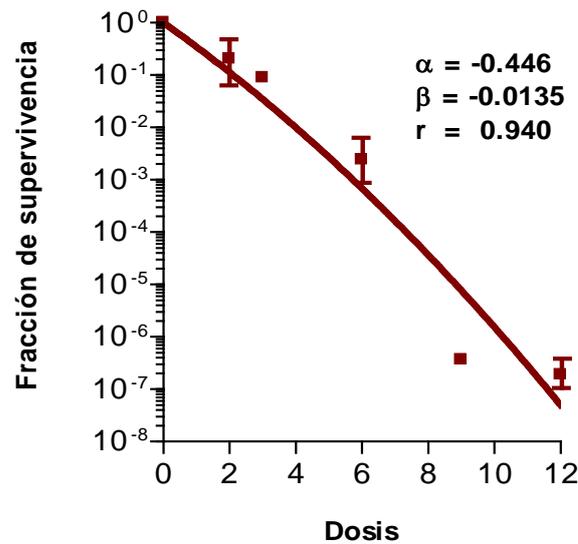


Figura 10. Ensayo de supervivencia celular de células MCF7 en cultivo en monocapa irradiadas con un rango de dosis de 0 a 12 Gy. Se muestran los parámetros α y β derivados del ajuste de los datos de supervivencia al modelo lineal cuadrático

Resultados

En la Tabla 9, se muestran los valores de los parámetros de radiosensibilidad celular estimados tras el ajuste de los datos de supervivencia a la ecuación que define el modelo lineal cuadrático en células MCF7 cultivada como esferoides multicelulares y en cultivo en monocapa.

Tabla 9

Parámetros de radiosensibilidad α y β derivados del ajuste lineal cuadrático obtenidos en células MCF7 cultivadas en monocapa y como esferoides multicelulares irradiados con dosis aguda de 0 a 12 Gy. Se expresan los valores medios y la desviación estándar de al menos tres experimentos.

MCF7	\forall (Gy^{-1})	\exists (Gy^{-2})	\forall/\exists	FS 2 Gy
Monocapa	0,316 \forall 0.059	0,023 \forall 0,006	13,73	50%
Esferoides	0,149 \forall 0.002	0.031 \forall 0,01	4,8	70%

4.3.3 Ensayos moleculares de radiosensibilidad

4.3.3.1 Daño inicial radioinducido sobre el DNA

La radiosensibilidad celular a nivel molecular viene definida por dos factores: i) daño inicial radioinducido sobre el DNA y ii) capacidad de las células para reparar dicho daño. El primero de los efectos se ha estimado como *número de roturas dobles de la cadena de DNA*. Una vez procesadas las muestras como se describe en Material y Métodos, hemos podido observar que, la aplicación del procedimiento matemático para cálculo de las rupturas dobles de cadena de DNA a los resultados de la electroforesis de campo pulsado, permite conocer la magnitud de la lesión molecular inicialmente

radioinducida, en función de la dosis de radiación administrada. Los resultados obtenidos de dos experimentos tipo se muestran en la Tablas 10. En la Figura 11 hemos recogido el valor medio del número de rupturas dobles de cadena de DNA estimado y el error estándar de dicho valor medio.

La relación lineal obtenida entre el número de rupturas dobles de cadena de DNA originadas por la radiación ionizante, por unidad de dosis (Gy) y por unidad de DNA se traduce en una pendiente de 1.36 ± 0.2 . En la Figura 12, se muestra un experimento similar pero efectuado sobre las células MCF7 BB cultivadas en monocapa.

La pendiente obtenida en este último caso alcanza un valor de 2.15 ± 0.19 .

Tabla 10

Estimación cuantitativa de la lesión molecular inicial de esferoides MCF7 irradiados a dosis aguda de 5 a 45 Gy. Se expresan la media aritmética y la desviación estándar del número de roturas dobles de cadena/ unidad de DNA (200 Mpb) de dos experimentos.

Dosis (Gy)	Exp 1	Exp 2	Exp 3
5.0		21.9 \pm 1.31	3.9 \pm 1.31
10.0	66.28 \pm 3.7	29.6 \pm 2.16	14.6 \pm 1.2
15.0	89.6 \pm 9.97	33.2 \pm 2.0	15.9 \pm 2.3
20.0	98.13 \pm 2.35	38.4 \pm 8.0	45.4 \pm 13.0
25.0	97.5 \pm 4.01	43.4 \pm 1.53	26.4 \pm 0.2
35.0	107.5 \pm 3.47	48.2 \pm 3.47	44.2 \pm 5.47
40.0	113.7 \pm 9.2	80.7 \pm 2.19	55.9 \pm 6.31
45.0	-	76.6 \pm 4.18	49.6 \pm 8.3

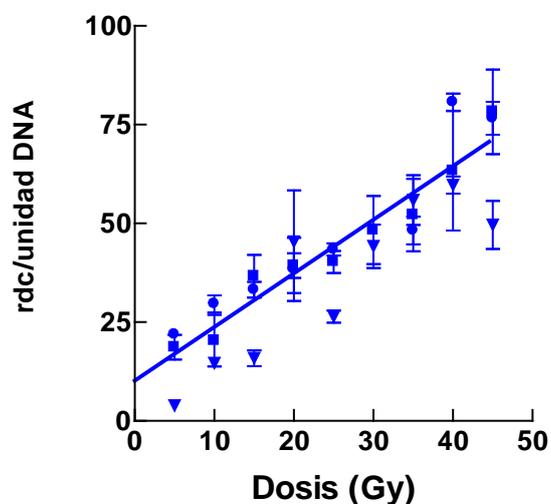


Figura 11. Roturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis. Se representan los valores medios y la desviación estándar de tres experimentos de irradiación con dosis aguda en esferoides MCF7.

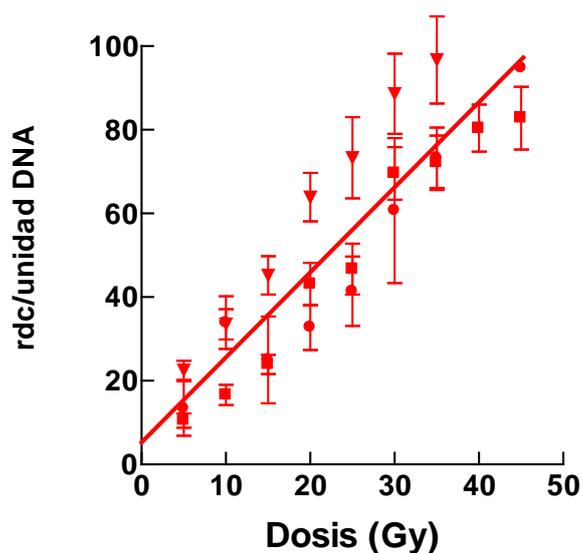


Figura 12. Roturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis. Se representan los valores medios y la desviación estándar de tres experimentos de irradiación con dosis aguda de células MCF7 cultivadas en monocapa.

Además, en la Figura 13, se muestra un gel de agarosa con células MCF7 en cultivo en monocapa (líneas superiores) y como esferoides multicelulares (línea inferior) irradiados ambos con dosis única de irradiación de 0 a 45 Gy y sometidas a electroforesis de campo pulsado. Como puede observarse, aunque la muestra depositada en cada pocillo fue muy similar para los dos modelos, las líneas superiores se obtiene una intensidad de tinción mayor que la obtenida en los inferiores. En ambos casos monocapa y esferoides se aprecia mayor intensidad de tinción al aumentar la dosis administrada.

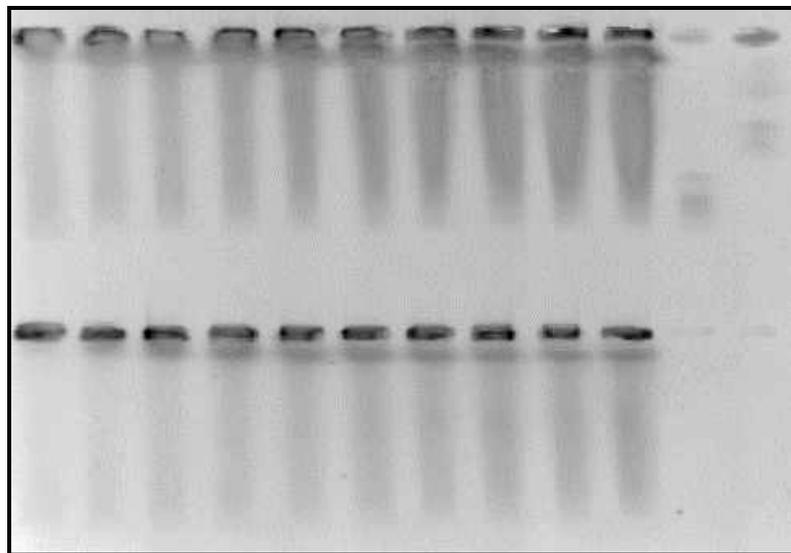


Figura 13. Gel de agarosa sometido a PFGE y teñido con bromuro de etidio. Las líneas superiores corresponden a células MCF7 irradiadas como cultivo en monocapa y las líneas inferiores a estas mismas células irradiadas como esferoides multicelulares. En ambos casos el protocolo de irradiación ha sido la administración de dosis únicas comprendidas en un rango de 0 a 45 Gy.

4.3.3.2 *Cinética de reagrupamiento*

En orden a valorar el segundo de los factores determinantes de la radiosensibilidad celular a nivel molecular, se ha procedido a la determinación de la cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA fragmentadas por la radiación ionizante en el modelo tridimensional sometido a PFGE tras una dosis de 45 Gy.

El análisis de la fracción de DNA extraída del pocillo respecto al total de DNA se realiza transcurrido un tiempo variable de reparación tras irradiación comprendido entre 0 y 24 horas. La Tabla 11 y la Figura 14 muestran los resultados obtenidos para los esferoides multicelulares y para las mismas células cultivadas en monocapa sometidas a un régimen de radiación de 45 Gy administrados como dosis única. Los datos muestran los valores de intensidad de tinción en el pocillo respecto a la intensidad total para cada tiempo de reparación. Una vez determinada la fracción de ADN retenida en el pocillo para cada tiempo, se expresa respecto a la fracción de ADN retenida en el tiempo 0.

Tabla 11

Fracción de actividad extraída en el tiempo t dividida por la fracción de actividad extraída en el tiempo 0 ($FAE t / FAE 0$) en 2 experimentos de irradiación aguda con 45 Gy en esferoides MCF 7. Se muestra también los valores medios y el error estándar de la media de al menos 2 experimentos realizados sobre cultivo en monocapa.

Tiempo tras irradiación (horas)	Monocapa	Esferoides experimento 1	Esferoides experimento 2
0	1.00	1.00	1.00
0.08	-	-	0.84
0.25	0.70	0.83	1.00
0.50	0.66	0.64	0.93
0.75	0.57	0.64	0.93
1.00	0.50	0.55	0.89
1.30	-	-	0.88
2.00	0.35	0.51	0.73
3.00	-	0.40	0.69
4.00	0.28	-	0.68
6.00	0.23	0.41	0.52
7.00	-	-	0.50
8.00	0.20	-	-
24.00	0.17	0.43	0.47

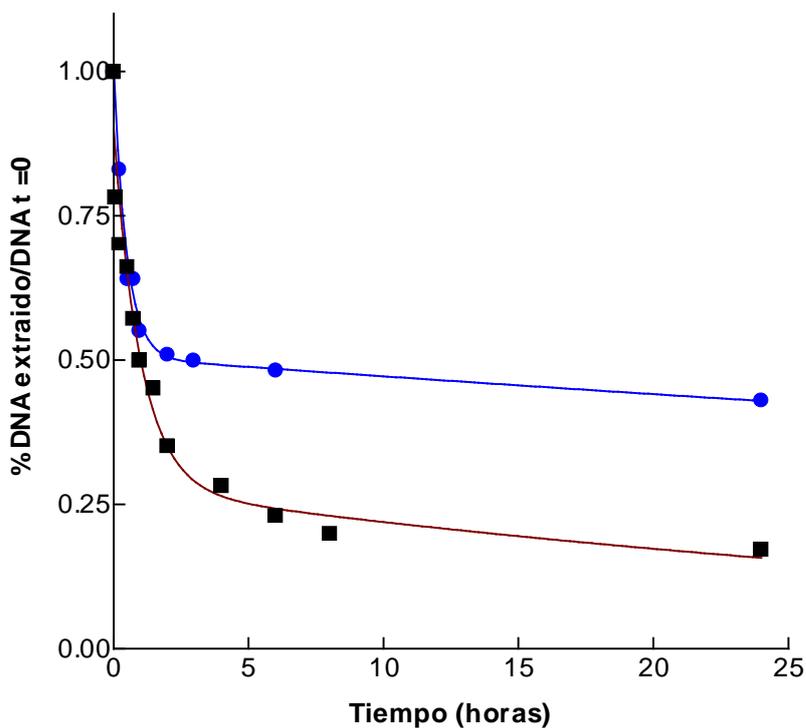


Figura 14. Cinética de reagrupamiento del DNA fragmentado con dosis de radiación de 45 Gy en MCF7 cultivada como esferoides multicelulares (◻) y como cultivo en monocapa (◉). Se expresa la fracción de DNA extraído del pocillo respecto al DNA extraído a tiempo 0 durante 24 horas postirradiación.

4.3.4 Ciclo celular

La cinética de proliferación de los esferoides MCF7 de pequeño tamaño, estimada como distribución de la población en fases proliferativas del ciclo celular, puede sufrir modificaciones tras irradiación. Por esta razón hemos realizado una serie de experimentos para evaluar el efecto de dosis única de radiación sobre el porcentaje de

células en cada fase del ciclo celular. Además, es interesante investigar si las diferencias de radiosensibilidad observadas entre esferoides y monocapa pueden ser debidas a la especial distribución de las células en alguna fase en particular del ciclo mitótico que las haga más o menos sensibles a la radiación ionizante. En este sentido se han diseñado los experimentos encaminados a determinar la distribución de las células de los esferoides en las distintas fases del ciclo celular. En la Tabla 12 se muestra el porcentaje de células en fases G_0/G_1 , S y G_2/M obtenido por citometría de flujo y se comparan con la distribución de estas mismas células en el ciclo celular creciendo como cultivo en monocapa.

Tabla 12

Distribución en el ciclo celular de células MCF7 creciendo en condiciones estándar de cultivo como esferoides multicelulares y como cultivo en monocapa.

MCF7	Fases del ciclo celular		
	G_0/G_1	S	G_2/M
Esferoides < 300 μm	47.4 \forall 2.1*	35.3 \forall 4.2	18.3 \forall 2.3
Esferoides > 300 μm	75.8 \forall 2.01*	13.5 \forall 1.1	10.6 \forall 0.3
Monocapa	59.2 \pm 3.4*	29.3 \forall 1.8	11.5 \forall 1.6

* Diferencia significativa $P < 0.05$.

4.3.4.1 *Distribución en el ciclo celular de las células de los esferoides MCF7 sometidos a dosis aguda de radiación.*

Las modificaciones de la cinética de proliferación de una población tumoral pueden ir precedidas de un cambio en la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular. En este trabajo, hemos tenido ocasión de estudiar estas modificaciones cuando se someten los esferoides a un tratamiento con dosis aguda de radiación. Así mismo, hemos estudiado las diferencias en la distribución celular ante un mismo protocolo de irradiación sobre el cultivo en monocapa y sobre esferoides multicelulares.

La Figura 15 muestra la distribución de la población celular de esferoides MCF7 sometida a 3 Gy de radiación única.

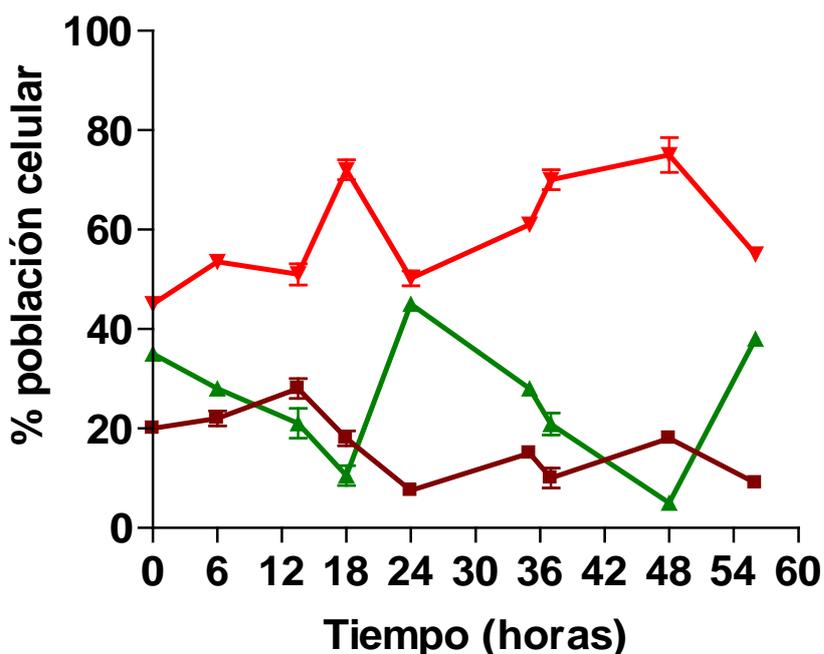


Figura 15. Distribución en el ciclo celular G_0/G_1 (▼); S (▲) y G_2/M (■) de esferoides multicelulares $\leq 300 \mu\text{m}$ de diámetro tratados con dosis aguda de 3 Gy y seguidos 60 h más.

Igualmente, las Figuras 16 y 17 muestran esta distribución en el ciclo celular de las células MCF7 creciendo en cultivo monocapa y como esferoides multicelulares respectivamente cuando se someten a irradiación única de 6 Gy

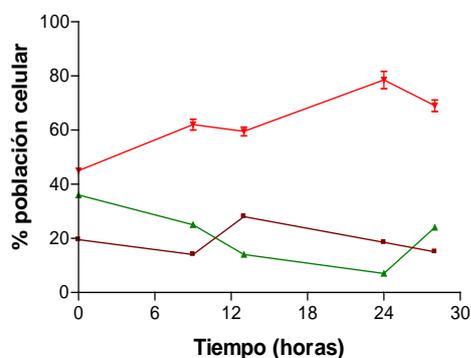


Figura 16. Distribución en el ciclo celular (\blacktriangledown) G_0/G_1 ; S (\blacktriangle) y (\blacksquare) G_2/M de células MCF 7 cultivadas en monocapa tras 6 Gy de dosis aguda y seguidas durante 48 horas.

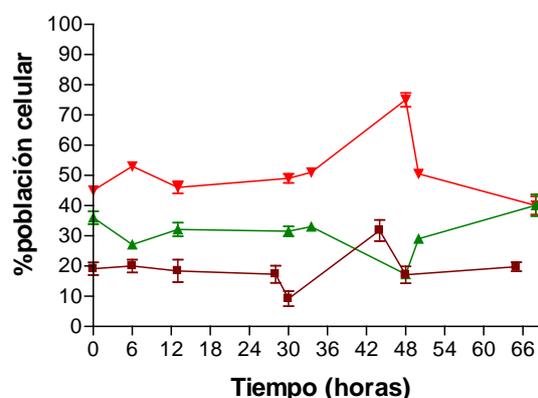


Figura 17. Distribución en el ciclo celular (\blacktriangledown) G_0/G_1 ; S (\blacktriangle) y (\blacksquare) G_2/M de esferoides multicelulares $\leq 300 \mu\text{m}$ de diámetro tratados con dosis aguda de 6 Gy y seguidos durante 48 horas.

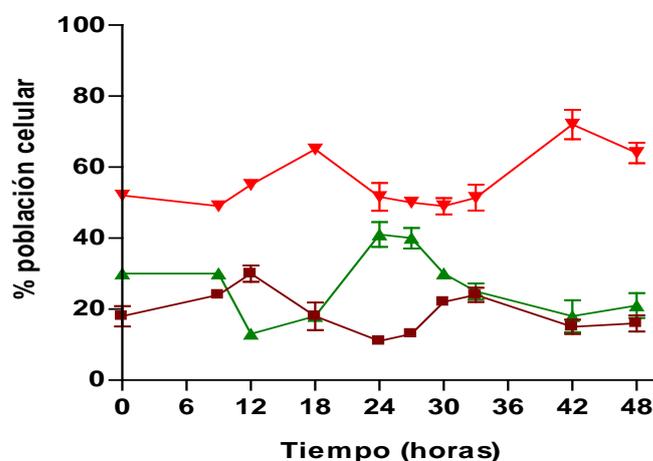


Figura 18. Distribución en el ciclo celular (\blacktriangledown) G_0/G_1 ; S (\blacktriangle) y (\blacksquare) G_2/M de esferoides multicelulares $\leq 300 \mu\text{m}$ de diámetro tratados con dosis aguda de 8 Gy y seguidos 60 horas más.

Resultados

- Llama la atención que en los experimentos en los que se trataron los esferoides con una dosis única de 6 y 8 Gy dan lugar a poblaciones celulares que seguidas durante 60 horas presentan las siguientes características:
- Existe un cierto grado de sincronismo/reclutamiento, más evidente a las 24-28 horas en las que un pico de fase S se sigue de un aumento significativo de las mitosis y un paso mayoritario de las células a la fase G_0/G_1 .
- El pico mitótico inicial, presente a las 12-14 horas en los esquemas de 3 Gy, es observado tan solo en el protocolo de los 6 Gy y con menor intensidad en el esquema de 8 Gy.
- Tras la administración de una dosis única de 3 Gy se observa una elevación muy importante del número de células en las fases G_0/G_1 a las 18 horas que se sigue a las 6 horas de una elevación significativa de las células en la fase de síntesis que alcanza un máximo a las 24 horas.

Esta sincronización de la población celular se mantiene, al menos durante dos ciclos, ya que los fenómenos de elevación de estas fases del ciclo celular se repiten a las 50 horas.

4.4 RESPUESTA DE LOS ESFEROIDES MULTICELULARES AL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN FRACCIONADA

4.4.1 Ensayo clonogénico

Los experimentos encaminados a valorar las posibles modificaciones de la radiosensibilidad celular que ocurren durante el tratamiento con radiación en los esferoides multicelulares se han dividido en tres grupos: que obedecen a tres objetivos diferentes:

a) Comparar los datos de supervivencia celular obtenidos mediante el ensayo clonogénico para 6 y 9 Gy, una vez aplicado el protocolo de irradiación de dosis aguda en un rango de 0-12 Gy y el protocolo que incluye la administración de 2 ó 3 fracciones de 3 Gy distanciadas 24 horas cada una. Tras la tercera fracción se dejaron transcurrir 24 horas de reposo antes de proceder a la disgregación del esferoide y realizar el ensayo clonogénico. Los resultados se extraen de la curva de supervivencia total y se expresan como fracción de supervivencia respecto al control antes de proceder a la comparación de los grupos (Tabla 13).

b) Comparar la supervivencia celular obtenida mediante ensayo clonogénico de esferoides multicelulares irradiados a dosis aguda, en un rango de dosis de 0-12 Gy, con la supervivencia celular obtenida para este mismo rango de dosis en esferoides previamente irradiados con 3 fracciones de 3 Gy distanciadas 24 horas cada una. (Figura 19).

c) Comparar la supervivencia celular obtenida con un esquema de fraccionamiento consistente en administrar 18 Gy de dosis total en fracciones de 1,5, 2, 3, 5 ó 6 Gy dejando transcurrir 4 horas entre fracciones y realizando el ensayo clonogénico inmediatamente después de la irradiación. Se estimó también el isoeffecto para un 1% de supervivencia (Tabla 14).

Resultados

Los resultados para cada uno de los procedimientos se han obtenido de al menos tres experimentos para cada uno de los esquemas de irradiación.

Tabla 13

Fracción de supervivencia obtenida tras irradiación de esferoides multicelulares en dos situaciones experimentales: dosis única de 0 a 12 Gy y dosis fraccionada en 2 ó 3 fracciones de 3 Gy cada uno. Se extraen de la curva de supervivencia los valores correspondientes a 6 y 9 Gy y se compara con los obtenidos para la misma dosis administrada de forma fraccionada.

Protocolo de irradiación	FS (%)
Dosis única 9 Gy	0.0016
Dosis fraccionada 9 Gy (3+3+3) separadas 24 horas	0.6
Dosis única 6 Gy	0.16
Dosis fraccionada 6 Gy (3+3) separadas 24 horas	2.6

Como puede observarse, la supervivencia celular estimada como capacidad para formar colonias de las células irradiadas es mayor cuando la dosis se administra de forma fraccionada tanto para el esquema de bifraccionamiento como cuando los esferoides reciben tres dosis separadas 24 horas.

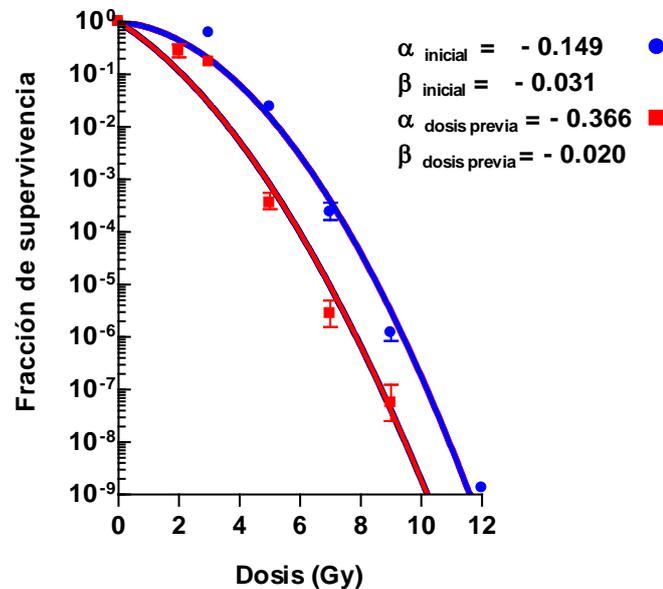


Figura 19. Supervivencia celular de esferoides multicelulares irradiados con un protocolo estándar (inicial)(●) y con otro que incluye irradiación previa de 3+3+3 Gy separadas 24 horas, y, transcurridas 24 horas de la última dosis, nuevo tratamiento completo de 0 a 12 Gy (dosis previa)(■). En la gráfica se incluyen los parámetros α y β derivados del ajuste de los datos al modelo lineal cuadrático

4.4.2 Distribución de las células en el ciclo celular

El estudio de la radiosensibilidad en las distintas fases del ciclo celular para un mismo modelo tumoral sugiere diferentes parámetros dependiente de la fase del ciclo en que se haya irradiado. Para valorar si las células una vez irradiadas, adoptan un patrón de distribución en el ciclo celular distinto al que presentaban antes de ser irradiadas hemos diseñado una serie de experimentos encaminados a analizar la distribución en las fases del ciclo celular siguiendo varios protocolos de irradiación.

Concretamente, en este trabajo, la distribución de los elementos formes que

Resultados

componen los esferoides multicelulares en las distintas fases del ciclo celular se ha estudiado mediante citometría de flujo en esferoides multicelulares irradiados con dosis únicas de 3 y 6 Gy, respectivamente (Figuras 20 y 21) y con dosis fraccionada de 6 Gy repartidas en 2 dosis de 3 Gy cada una (Figura 22) y tras irradiación con dosis fraccionada de 9 Gy repartidas en dosis de 3 Gy (Figura 23). El tiempo transcurrido entre cada fracción ha sido de 24 horas y el seguimiento de las células en cada una de las fases del ciclo celular ha sido de 72 horas. Así mismo, en las figuras 20 y 22 se muestra la distribución de las células en el ciclo celular de esferoides irradiados. En todos los casos los esferoides no sobrepasaron las 200 μ de diámetro.

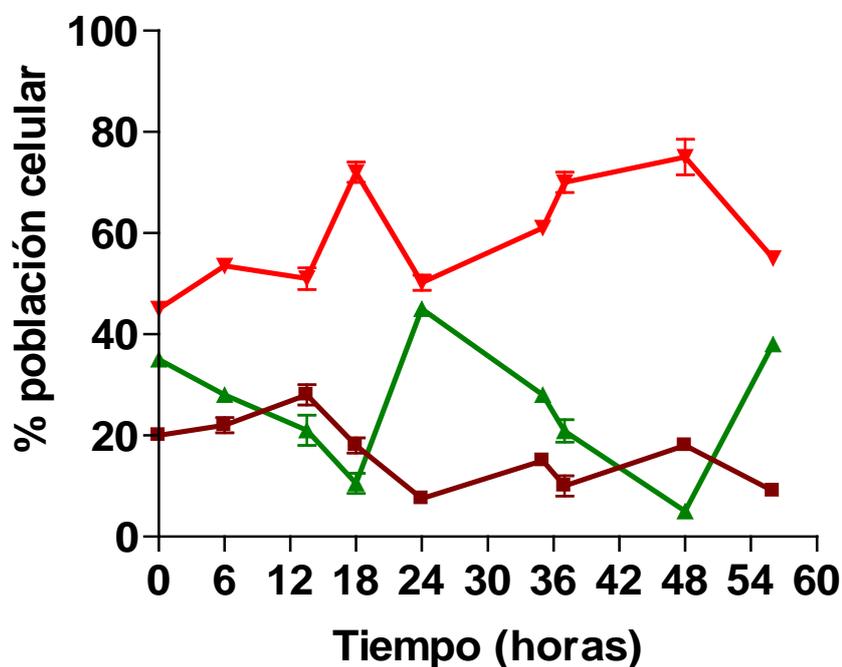


Figura 20 . Distribución de las células en fases G0/G1 (▼), S (▲) y G2/M (■) del ciclo celular de esferoides irradiados con dosis única de 3 Gy

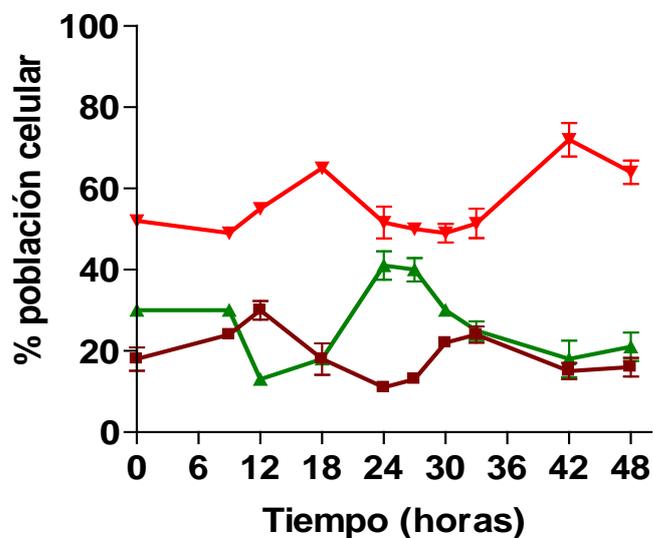


Figura 21. Distribución de las células en fases G₀/G₁ (▼), S (▲) y G₂/M (■) del ciclo celular de esferoides irradiados con dosis única de 6 Gy

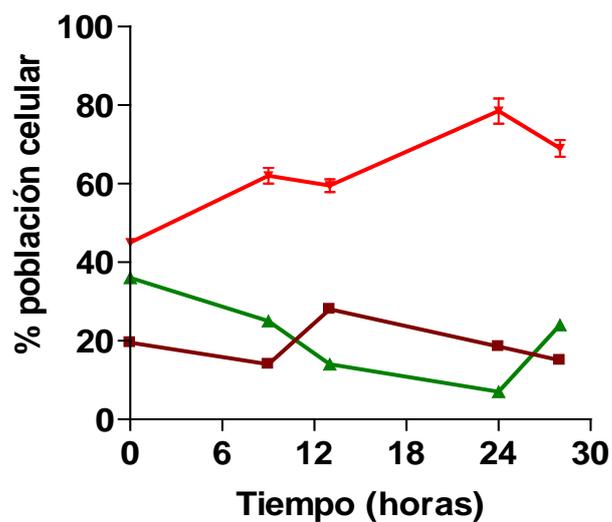


Figura 22. Distribución de las células en fases G₀/G₁ (▼), S (▲) y G₂/M (■) del ciclo celular de esferoides irradiados con dosis fraccionada de 3+3 Gy separadas 24 horas

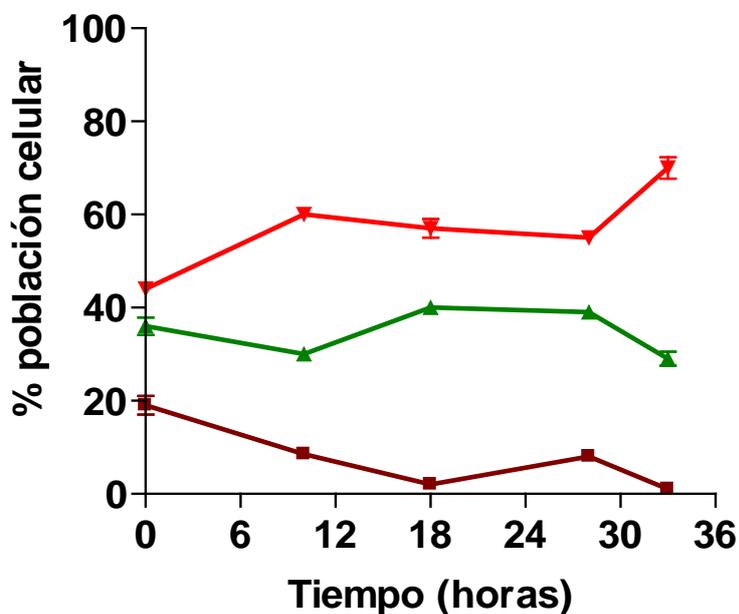


Figura 23. Distribución de las células en fases G0/G1 (▼), S (▲) y G2/M (■) del ciclo celular de esferoides irradiados con dosis fraccionada de 3+3+3 Gy separadas 24 horas

En todos los casos, una vez tratados los esferoides, se ha analizado la distribución en el ciclo celular durante períodos de 6-8 horas, manteniendo los esferoides en medio nutritivo adecuado y a temperatura constante. Uno de los objetivos del protocolo es estudiar de forma detallada el patrón de distribución de las células en el ciclo en el momento en que se administra la segunda dosis de radiación, esto es, a las 24 horas de haber administrado la primera. En esta situación, se observa que tras la primera dosis de 3 Gy existe un pico de células en fase S a las 24 horas. Este fenómeno se observa también a las 24 horas de administras la segunda dosis de 3 Gy.

4.4.3 Recrecimiento en monocapa tras irradiación o *cure*

La capacidad de los esferoides para recrecer en monocapa tras irradiación es una forma de poner de manifiesto la supervivencia celular sin necesidad de disgregar la estructura del modelo.

El esquema de fraccionamiento elegido en este caso ha sido la administración de dosis totales de 0, 2, 3, 4, 6, 8 y 12, 16 y 24 Gy repartidas en 2 fracciones separadas 6 horas entre sí. Una vez completado el protocolo se procede a valorar la supervivencia celular y la dosis necesaria para el *control* del 50% de los esferoides irradiados, mediante el cultivo de los esferoides en un soporte adecuado para su recrecimiento en monocapa. Al menos 6 esferoides de cada dosis se siguen durante 30 días y se valora el halo de recrecimiento establecido alrededor del esferoide. Durante este tiempo, se garantiza el aporte de nutrientes con los correspondientes cambios de medio cada 3 días.

La Figura 24, muestra los resultados de control tumoral para dosis únicas y para el protocolo de bifraccionamiento.

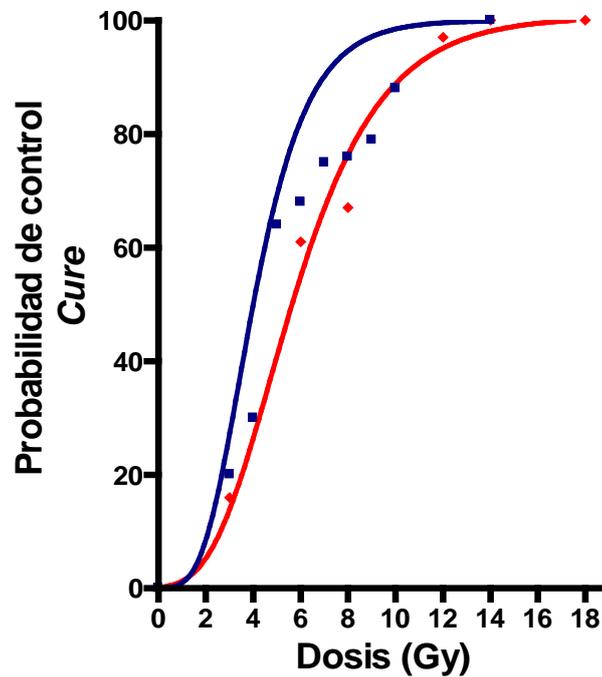


Figura 24. Esferoides menores de 200μ irradiados con un protocolo de irradiación de dosis única (■) y con dos dosis de radiación de 0, 2,3, 4, 6, 8 y 12, 16 y 24 Gy, separadas 24 horas (▼).

De este grupo de experimentos se obtiene la dosis que controla el 50% de los esferoides y se compara con la obtenida con la administración de dosis únicas de radiación. (Tabla 14).

Tabla 14

Dosis que controla el 50% (SCD₅₀) estimada para los datos extraídos del protocolo experimental de recrecimiento en monocapa de esferoides irradiados con dosis única y con 2 fracciones separadas 24 horas

Protocolo de irradiación	SCD ₅₀ (Gy)	Intervalo de confianza 95 %
Dosis única	5.51 ± 0.26	4.82 - 6.20
Tras dos fracciones	7.04 ± 0.38	6.94 – 7.14

El análisis de los datos obtenidos permite comprobar la necesidad de incrementar la dosis para obtener una PCS₅₀ % en los esferoides con dos fracciones. La curva obtenida con este protocolo de irradiación se desplazó hacia la derecha al compararlo con la obtenida al administrar dosis única.

Dada la dependencia hormonal demostrada por los esferoides MCF7 y el efecto que el antiestrógeno tiene sobre la cinética de proliferación hemos diseñado una serie de experimentos en los que, sin alterar la estructura tridimensional del modelo, se ha sometido a un protocolo terapéutico secuencial que combina hormonas/radiación. Concretamente utilizando la metodología del recrecimiento en monocapa ha sido posible combinar un protocolo de irradiación sobre esferoides multicelulares que incluya tratamiento previo durante 4 días con OH TAM 0.1 μM con dosis únicas y bifraccionada. En esta situación experimental se valoró tanto el recrecimiento en monocapa como el seguimiento durante 18 días tallando los esferoides diariamente. La Tabla 15 muestra los resultados para un grupo de esferoides irradiados de forma individual con dosis aguda en estas condiciones de cultivo y valorando su posterior capacidad para recrer en monocapa. En los experimentos en los que se siguió el

Resultados

crecimiento de los esferoides mediante la valoración de sus diámetros ortogonales se observó un cambio en su estructuración que impidió el cálculo de su volumen por el procedimiento clásico, a pesar de esta desestructuración, la viabilidad de los esferoides se mantuvo al menos durante 18 días para dosis únicas de 3 y 5 Gy (Tabla 16).

Tabla 15

Recrecimiento en monocapa de esferoides irradiados de forma individual en condiciones de cultivo estándar (Sin OH- TAM) y en un medio de cultivo conteniendo OH-TAM a concentración de 0.01 μ M (Con OH-TAM) mantenido durante 4 días. Una vez irradiados con dosis comprendidas entre 0 y 12 Gy se cambia el medio de cultivo por otro completo y se valora la capacidad de recrecer en monocapa durante 30 días. Se irradiaron un total de 24 esferoides por dosis y se estimó la fracción de supervivencia respecto al Control (0)

Dosis de radiación (Gy)	FS (%)	
	Sin OH-TAM	Con OH TAM
0	1.00	1.00
2	85	82
5	40	36
7	18	14
12	8	0.64

.Tabla 16

Recrecimiento de esferoides irradiados de forma individual en un medio de cultivo conteniendo OH-TAM a concentración de 0.01 μ M mantenido durante 4 días. Una vez irradiados con dosis comprendidas entre 0 y 12 Gy se cambia el medio de cultivo por otro completo. La valoración del recrecimiento tras irradiación se realizó por la medida de los diámetros de los esferoides durante 17 días..

Tiempo tras irradiación (días)	OH-TAM (0.1 μ M)		
	0Gy	3 Gy	5 Gy
0	18.8	28.71	20.56
3	24.41	36.06	22.43
6	28.71	41.60	26.50
11	36.06	47.68	26.5
14	50.93	50.93	-
17	65.41	57.87	-

4.4.4 Lesión molecular radioinducida

El daño inicial radioinducido se ha estimado como rdc de DNA mediante electroforesis de campo pulsante con dos protocolos de irradiación fraccionada:

a) Protocolo estándar de radiación en un rango de dosis de 0 a 45 Gy aplicadas sobre esferoides que 6 horas antes habían sido sometidos a una dosis de radiación de 6 Gy.

b) Protocolo estándar de radiación en un rango de dosis de 0 a 45 Gy aplicadas sobre esferoides que 24 horas antes habían sido sometidos a una dosis de radiación de 6 + 6 + 6 Gy separadas 24 horas entre sí

Resultados

Esta serie de experimentos está basada en la hipótesis de que la RS celular intrínseca se ve modificada en el curso de la radiación y que el intervalo entre dosis es determinante en la respuesta final de la célula.

La Tabla 17 muestran los resultados expresados como roturas dobles de cadena de DNA por Gy de radiación y por unidad de DNA (200 Mpb) obtenidos para las dos situaciones anteriores en al menos 2 experimentos. Así mismo, en la Tabla 18 se expresan los resultados obtenidos de la pendiente, intersección en el origen y coeficiente de correlación para las cuatro situaciones

En la figura 25 se representan los valores de rdc en un protocolo de 6+6+6 + dosis aguda de 0 a 45 Gy de al menos 2 experimentos. Así mismo, en la figura 26 se representan las pendientes de las rectas obtenidas en los dos protocolos de fraccionamiento así como la obtenida para células MCF 7 cultivadas en monocapa y sometidas a un protocolo de irradiación único en un rango de dosis comprendido entre 0 y 45 Gy.

Tabla 17

Estimación cuantitativa de la lesión molecular inicial radioinducida sobre el DNA de esferoides tratados con un protocolo estándar de radiación a dosis aguda de 0 a 45 Gy, protocolo estándar con tratamiento fraccionado 24 horas antes de 6 + 6 + 6 y protocolo estándar con tratamiento de 6 Gy, 6 horas antes.

Protocolos de irradiación

Dosis	Roturas dobles de cadena (rdc)		
	6 Gy + (0 a 45 Gy) con intervalo 6 h	Dosis única (0 a 45 Gy)	6+6+6+ (0 a 45 Gy) con intervalo 24 h
5	62±5,3	42±1.3	23±1.0
10	-	-	31±3.2
15	69± 7	29±2.6	38±5.0
20	87±12,7	41±3.1	59.2±20.1
25	86±4,3	53±4.3	62 ± 2
30	104±2,9	56±4.8	-
35	97± 2,4	57±3.6	84 ± 43
40	108± 0,0	89±7.3	-
45	-	-	108 ± 3.0

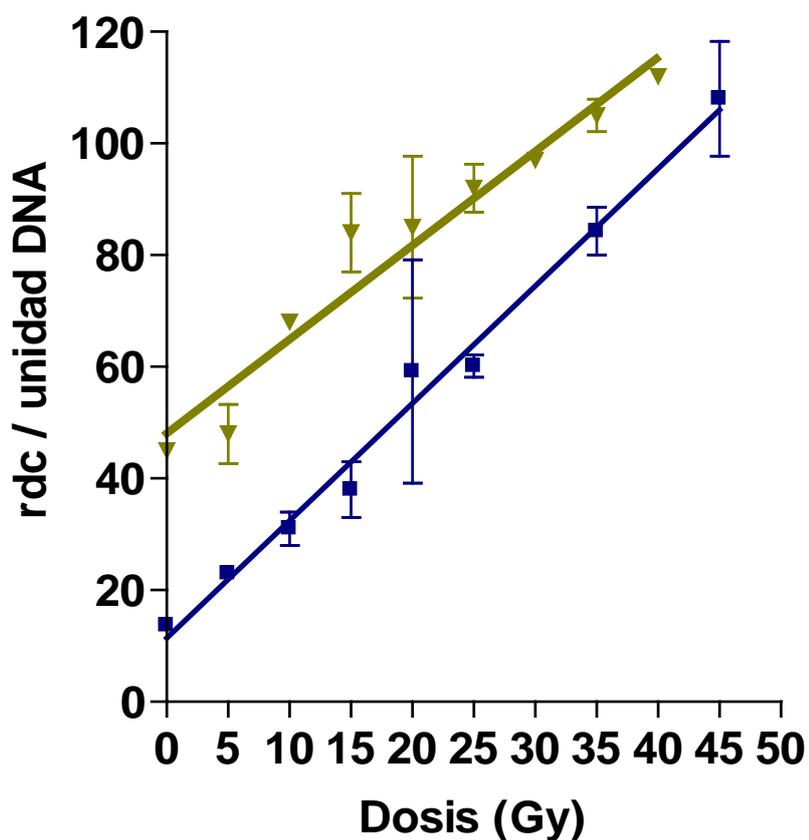


Figura 25. Estimación cuantitativa de la lesión molecular inicial radioinducida sobre el DNA de esferoides tratados con un protocolo de radiación de: dosis aguda de 0 a 45 Gy, a los que 24 horas antes se someten a una dosis de 18 Gy fraccionada en 6 + 6 + 6, separadas 24 horas entre sí (■) y dosis aguda de 0 a 45 Gy a los que 6 horas antes se someten a una dosis de 6 Gy (▼).

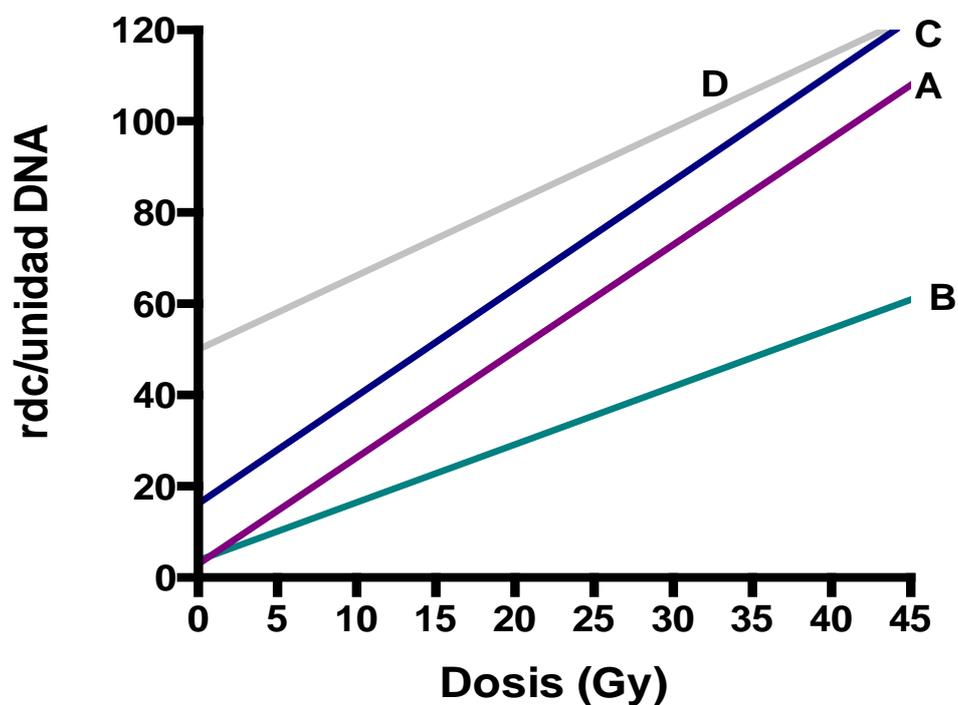


Figura 26. Células MCF7 BB:

A: cultivadas en monocapa e irradiadas con dosis aguda de 0 a 45 Gy: 2.15 rdc/unidad DNA / Gy.

B: esferoides ≤ 300 micras de diámetro irradiados con dosis aguda de 0-45 Gy: 1.36 rdc / unidad DNA / Gy.

C: esferoides tratados previamente con 18 Gy administrados en 3 fracciones de 6 Gy separadas 24 h: 2.09 rdc / unidad DNA / Gy.

D: esferoides irradiados con 6 Gy previos con intervalo de 6 h: 1.33 rdc/unidad DNA/Gy.

Resultados

Tabla 18

Estimación cuantitativa de la lesión molecular inicial radioinducida. Se expresan la pendiente (P), la ordenada en el origen (I) y el coeficiente de correlación para distintos protocolos de irradiación

Estimación cuantitativa de lesión molecular inicial radioinducida

	rdc/unidad DNA/Gy	rdc/unidad DNA/Gy D=0 Gy	Coefficiente de correlación
MCF7 BB monocapa	2.15±0.15	4.0±5.0	0.914
Esferoides dosis aguda	1.36±0.15	4.7±0.11	0.919
Esferoides con tratamiento fraccionado 6 + 6 + 6 Gy y dosis aguda de 0 a 45 Gy a las 24 horas	2.09±0.14	13.7±3.5	0.964
Esferoides con tratamiento fraccionado 6 Gy y dosis aguda de 0 a 45 Gy a las 6 horas	1.33±0.08	22.05 ± 5,63	0.9729

Estimados los valores medios ± desviación estándar de al menos tres experimentos

El análisis detallado de los resultados muestra que:

- La radiosensibilidad celular intrínseca valorada como rupturas dobles de

cadena de DNA en los esferoides multicelulares sometidos a dosis de irradiación aguda es, para el mismo rango de dosis, menor que la obtenida en las mismas células creciendo en monocapa.

b) La pendiente que define el número de rupturas dobles de cadena de DNA/Gy de irradiación no varía significativamente para esferoides que se irradian con dosis única y para aquellos que reciben 6 horas antes, una dosis de 6 Gy. (1.36 vs 1.33)

c) La radiosensibilidad intrínseca en esferoides, aumenta significativamente cuando el intervalo entre dosis es de 24 horas.

4.4.5 Estimación de la cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA en esferoides multicelulares MCF7.

La cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA fragmentadas por la radiación puede constituir una variable de consideración en la estimación de la radiosensibilidad intrínseca de los esferoides multicelulares sometidos a protocolos de irradiación diferentes. Además, el tiempo de recuperación entre fracciones puede hacer variar esta cinética de reagrupamiento y determinar finalmente la radiosensibilidad en las siguientes fracciones. Por esta razón se han diseñado una serie de experimentos en los que de una forma semicuantitativa se valora la cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación de esferoides multicelulares sometidos a dos esquemas de irradiación fraccionada (Tabla 19) (Figura 27):

a) Esferoides irradiados con dosis de 6 Gy a los que, transcurridos 6 horas de esta primera dosis se someten a una nueva dosis de 45 Gy.

b) Esferoides irradiados con dosis de 6 Gy a los que, transcurridos 24 horas de esta primera dosis se someten a una nueva dosis de 45 Gy.

En ambas situaciones, se les deja reparar durante un tiempo total de 24 horas valorando esta reparación cada 5 minutos durante la primera media hora, cada hora

Resultados

durante las primeras 8 horas y a las 24 horas, se hace una determinación final.

Tabla 19

Cinética de reagrupamiento de cadenas de DNA fragmentadas tras irradiación de esferoides MCF7 sometidos a una dosis de 45 Gy. Los resultados obtenidos se comparan con los esferoides irradiados con dosis previa 6 Gy a los que, transcurridos 6 y 24 horas respectivamente de esta primera dosis se someten a una nueva dosis de 45 Gy.

Tiempo tras irradiación	(%) de DNA extraído respecto a t=0		
	Esferoides dosis única 45 Gy	Esferoides dosis previa 6 Gy - 6 h- + 45 Gy	Esferoides dosis previa 6 Gy - 24 h- + 45 Gy
0 mn	1.00	1.00	1.00
10 mn	0.83	1.07	0.95
15 mn	0.64	1.07	0.94
20 mn	0.64	0.87	0.93
30 mn	0.55	0.87	0.91
45 mn	-	0.86	0.91
2.00 h	0.51	0.85	0.89
3.00	0.40	0.83	0.84
4.00	-	0.76	0.77
6.00	0.41	0.75	-
7.00	-	0.73	0.74
8.00	-	-	-
18.00	-	0.74	0.66
24.00	0.43	0.72	0.61

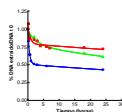


Figura 27. Cinética de reagrupamiento de esferoides multicelulares sometidos a dosis única de 45 Gy (●), y a un protocolo de radiación que incluye la administración de dosis previa de 6 Gy y tras 6 horas (■) ó 24 horas (□) una nueva dosis de 45 Gy. Los resultados se expresan como % de DNA extraído del pocillo respecto al DNA total y referidos a este mismo valor cuando los esferoides no disponen de tiempo de reparación ($t=0$)

Los resultados obtenidos presentan un buen ajuste a un modelo de reparación doble exponencial, con un componente rápido (hasta 5 horas después de la irradiación) y un componente lento. Resulta interesante detenerse en los primeros puntos de la curva dónde, aparentemente, los procesos de reparación ocurren con más rapidez en los esferoides irradiados con dosis única. Igualmente, al comparar la cinética de reagrupamiento de cadenas de DNA de los esferoides sometidos a dosis previa de irradiación se observa que: i) cuando se dejan 6 horas entre dosis, reparan más y más rápido que cuando se dejan transcurrir 24 horas antes de la segunda dosis ii) aunque en

Resultados

ambos casos el DNA final extraído del pocillo es menor que el de los esferoides sometidos a dosis única de irradiación, parece observarse una mayor capacidad de los esferoides que disponen de 6 horas antes de recibir una nueva dosis de radiación para reagrupar cadenas sobre aquellos otros cuya separación entre dosis es de 24 horas.

Discusión

5 DISCUSIÓN

El crecimiento tumoral maligno se caracteriza por el desequilibrio entre la generación y pérdida de células constituyentes de los tumores. Esto trae consigo la desorganización de la estructura de los tejidos neoformados y el desarrollo anormal, y muy frecuentemente insuficiente, de los vasos sanguíneos. Como consecuencia de estos hechos las células crecen en un microambiente especialmente precario en cuanto al aporte de nutrientes y a la eliminación de residuos de desecho, lo cual conduce a situaciones muy peculiares. Por ejemplo, es bien conocido, el hecho de que cuando el volumen tumoral alcanza un tamaño próximo al umbral de detección clínica y se dan los fenómenos descritos, existe dentro de la masa tumoral una marcada heterogeneidad, con poblaciones celulares con diferentes propiedades funcionales y patrones proliferativos, así como con una desigual respuesta a medidas terapéuticas.

La detección de tumores en etapas subclínicas, y la predicción de su comportamiento biológico son de capital importancia para alcanzar la curación. Las diferentes modalidades terapéuticas del cáncer se han beneficiado del conocimiento de la cinética de crecimiento tumoral y de la distribución intratumoral de las poblaciones. Así, por ejemplo, conocer el comportamiento de una población tumoral tras las primeras

dosis de radiación constituye un dato de considerable importancia para el control tumoral que podría contribuir a un diseño más racional de los protocolos utilizados en radioterapia clínica. En este sentido, el modelo de los esferoides multicelulares que hemos utilizado en este trabajo constituye un instrumento útil ya que posibilita el estudio tumoral en fases iniciales de crecimiento, y proporciona información de interés en protocolos de fraccionamiento en radioterapia.

Los esferoides multicelulares de la línea celular MCF7 proceden del clon BB, el cual presenta características de estrógeno-dependencia ampliamente descritas (Olea *et al.*, 1987; Villalobos *et al.*, 1987; Katzenellenbogen y Norman, 1990; Foster *et al.*, 2001; Del Moral *et al.*, 2002) y cualidades excepcionales para el cultivo en suspensión (Olea *et al.*, 1992; Villalobos *et al.*, 1995).

La elección de la composición del medio de cultivo requerido para la formación y crecimiento de los esferoides multicelulares MCF7 debe realizarse de forma adecuada. Así, se ha puesto de manifiesto la necesidad de que la mezcla nutritiva contenga, entre otros componentes, una concentración adecuada de estrógenos. Tanto es así, que no es posible la iniciación y seguimiento de esferoides que no contengan estrógenos en el medio de cultivo (Olea *et al.*, 1992). Se ha podido confirmar que la ausencia de estrógenos tiene dramáticos efectos sobre la eficiencia de formación de los esferoides por las células MCF7; además, la presencia de estradiol no sólo es fundamental para que las células MCF7 se estructuren e inicien como esferoides multicelulares, sino que la adición del estrógeno a cultivos que se encuentran en una fase estacionaria de desorganización, provocada por su mantenimiento durante más de quince días en medio libre de estrógenos, da lugar a la reestructuración de estos agregados y determina que su crecimiento se ajuste a las coordenadas que rigen los modelos matemáticos explicativos del crecimiento esferoidal. (Olea *et al.* 1992, 1994). Por tanto, la experimentación con este modelo y los resultados derivados de ella requieren siempre la consideración de las hormonas estrogénicas necesarias para su formación y mantenimiento.

Valorar el efecto de cualquier tratamiento en este modelo tumoral, exige un conocimiento preciso del crecimiento esferoidal en condiciones de cultivo estándar. Una

vez conocido éste, el modelo matemático de ajuste de los datos experimentales deberá permitir extraer parámetros sencillos y de fácil aplicación. En efecto, el procedimiento experimental ensayado por nosotros permite que, a partir de un número determinado de células, se inicie un solo esferoide en cada uno de los pocillos de la placa de cultivo y de esta forma se puede, por un lado, obtener esferoides de volúmenes homogéneos y, por otro, observar desde su iniciación, el mismo esferoide durante un tiempo determinado. Esta metodología, facilita la valoración de la cinética de crecimiento de cada uno de los esferoides desde su inicio. Por el contrario, la técnica de formación de esferoides multicelulares empleados por otros autores (Stuschke *et al.*, 1995; Durand y Olive, 2001; Oloumi *et al.*, 2002) requiere la formación en un sistema de rotación continuada de un conjunto de esferoides, los cuales, una vez formados, se transfieren a placas individuales para su tallado y seguimiento. Esta modalidad de experimentación hace que los esferoides que posteriormente se siguen en su crecimiento de forma individual tengan un volumen inicial desigual lo que añade dificultad tanto a la experimentación como al posterior ajuste con mayor o menor exactitud a distintos modelos matemáticos. En consecuencia, la extracción de parámetros comunes útiles que nos indiquen cuál sería el *patrón* de crecimiento del modelo biológico y en qué medida éste se ve alterado ya sea por modificación de las condiciones de cultivo ya sea tras el sometimiento a distintos protocolos de tratamiento requiere procedimientos experimentales y ajustes matemáticos precisos para su correcto procesamiento.

De los modelos matemáticos encontrados en la literatura, (Gompertz 1825, Olea *et al.*, 1994; Rigaard *et al.*, 1997 Chignola *et al.*, 2000) los datos experimentales de crecimiento de los esferoides MCF7 BB presentan un ajuste óptimo al modelo Gompertziano, cuya ecuación matemática se ha utilizado también para describir la cinética de crecimiento de microtumores o micrometástasis proporcionando información sobre el crecimiento de la etapa subclínica de un tumor (Oloumi *et al.*, 2000).

El tiempo de duplicación (TD) es un parámetro utilizado clásicamente para determinar el crecimiento de una población tumoral. Una vez calculado con los datos de crecimiento de los esferoides MCF7 comprobamos que el TD aumenta conforme

aumenta el tiempo de observación, lo que se traduce en que cuando el volumen esferoidal es pequeño, el TD es muy semejante al establecido para la misma estirpe celular cultivada en monocapa (Olea *et al.*, 1992). En ambas situaciones (monocapa y esferoides de pequeño tamaño), el aporte de nutrientes y de oxígeno es homogéneo para todas las células. Cuando el volumen del esferoide aumenta, la conformación espacial del esferoide hace que haya células con déficit de nutrientes, o con déficit de oxígeno, cuyo crecimiento es menor que las células proliferativas bien oxigenadas y por tanto, aunque contribuyen al volumen del esferoide determinan que el TD se vaya incrementando conforme aumenta el volumen.

Es evidente, por tanto, que la consideración de forma aislada de uno o unos pocos esferoides, en diferentes momentos de su crecimiento tiene un interés limitado ya que va a depender del momento de observación y de la consideración del volumen inicial de referencia. Por esta razón, se han construido curvas estándar de crecimiento que permiten establecer la cinética de proliferación para un conjunto de esferoides procedentes de una misma estirpe celular de modo que sea posible la comparación de los parámetros extraídos en los distintos tratamientos. Esto ha llevado a algunos autores a utilizar distintos procedimientos que lo permitan (Wheldon *et al.*, 1985; Hil y Denekamp, 1989; Olive *et al.*, 1999; Chignola *et al.*, 2000; Guirado *et al.*, 2003). Ello exige, en principio, considerar que el volumen de partida de todos los esferoides sea idéntico. Como experimentalmente no se da esta circunstancia, se procede a equiparar los volúmenes iniciales dividiendo cada uno de los volúmenes observados en un tiempo dado (V_t), por el volumen inicial de cada esferoide considerado éste como la primera medida observada experimentalmente (V_0); esto es: $V_0' = V_t / V_0$. Los nuevos datos así obtenidos se ajustan, para cada esferoide de forma individual, al modelo elegido. La media aritmética de los parámetros de la ecuación así obtenida es el valor que se utiliza para construir la *curva estándar de crecimiento*.

Este procedimiento entraña algunos errores desde nuestro punto de vista. La razón que nos lleva a tal afirmación es la hipótesis de que esferoides de la misma naturaleza cultivados en idénticas condiciones experimentales deben seguir una curva de crecimiento idéntica pero partiendo de puntos distintos, por lo que en realidad la vida

biológica de los distintos esferoides considerados recorren tramos diferentes de una misma curva de crecimiento; por ejemplo, el esferoide de tamaño inicial menor atraviesa etapas que no cubre aquel con un tamaño inicial mayor. La normalización clásica no considera la variabilidad del crecimiento de cada uno de los esferoides. Además, estima un volumen inicial igual a la media de los volúmenes iniciales observados experimentalmente, cuando lo cierto es que son esferoides de distinto tamaño que, considerados en una curva de crecimiento teórica, corresponderían a etapas diferentes.

Los resultados obtenidos en este trabajo al aplicar uno y otro procedimiento indican que no es suficiente con dividir el volumen a cualquier tiempo de observación por el volumen inicial, sino que es necesario considerar nuestra propuesta hipótesis de crecimiento y adaptarla al modelo indicado en este trabajo. De hecho, el efecto de la normalización es evidente y como se esperaba, el valor del parámetro A de la ecuación de Gompertz difiere notablemente para los dos ajustes, y el valor del parámetro \forall de la misma ecuación, es independiente del origen de tiempos y del volumen inicial considerado. En definitiva, el procedimiento de normalización descrito permite generar la curva estándar de crecimiento de los esferoides MCF7. Una vez obtenida dicha curva y cuantificados los parámetros de crecimiento de la ecuación de Gompertz (A y \forall) es posible determinar si los distintos tratamientos efectuados sobre el modelo, modifican o no su cinética de proliferación.

TRATAMIENTO HORMONAL DE LOS ESFEROIDES MCF7

Son numerosos los estudios que se han realizado sobre la eficacia del tamoxifeno en la terapia coadyuvante de cáncer de mama. Así, en la 6ª Conferencia de Consenso sobre tratamiento adyuvante de St Gallen (1998), se recomendó el tratamiento hormonal en todas las pacientes con riesgo mínimo, infiltración ganglionar ausente y fenotipo RE positivo, tanto para pacientes premenopáusicas como en postmenopáusicas. Igualmente, los resultados del metanálisis del Early Breast Cancer Trialists

Collaborative Group (1992) han demostrado una efectividad estadísticamente significativa del tratamiento con el antiestrógeno, tanto en pacientes con receptores de estrógenos positivos como negativos.

En los esferoides MCF7, ha quedado demostrado que la presencia de estrógenos es una condición indispensable para su formación y crecimiento. A este respecto, la cinética de crecimiento de la población celular estructurada en el esferoide y sometida al estímulo proliferativo del estradiol ha sido bien documentada (Olea *et al.*, 1992; 1994; Muller-Holzner *et al.*, 1996), pero no así el efecto que pudiese tener sobre el crecimiento de los esferoides el tratamiento con antiestrógenos. Por esta razón y dada la dependencia hormonal demostrada, se ha prestado especial atención en este trabajo al efecto inhibitorio del antiestrógeno hidroxitamoxifeno sobre el crecimiento de los esferoides MCF7.

Del análisis de nuestros resultados podemos afirmar que concentraciones de OH-TAM en el rango 0.1-1 :M tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de los esferoides, pero permiten aun ajustar los parámetros de crecimiento de los esferoides tratados a la ecuación de Gompertz, aunque el parámetro A de la ecuación varía considerablemente respecto al Control. Por el contrario, concentraciones de hidroxitamoxifeno >10 :M, afectan de tal manera al crecimiento de los esferoides que no es posible el tratamiento matemático de los datos. Es oportuno señalar la capacidad del estradiol para revertir el efecto inhibitorio que tiene el antiestrógeno hidroxitamoxifeno sobre el crecimiento de los esferoides MCF7. A partir de concentraciones nanomolares, el estradiol-17 \exists es capaz de revertir el efecto inhibitorio de 0,1 :M de hidroxitamoxifeno, aunque concentraciones inferiores de estradiol no son efectivas.

El efecto antiproliferativo del antiestrógeno tiene su expresión particular en el estudio pormenorizado de la distribución en el ciclo celular de los elementos formes de los esferoides MCF7 durante el tratamiento con OH-TAM, hecho que precede a la observación de un crecimiento más lento del cultivo y que, finalmente se traduce en un aumento del TD. La capacidad del estradiol para revertir la acción del OH-TAM se pone igualmente de manifiesto por la peculiar distribución en el ciclo celular de los

elementos formes que conforman el esferoide tras la administración del estrógeno. Los hechos más sobresalientes se resumen de la siguiente forma:

1.- El tratamiento con OH-TAM conduce a una caída del ritmo de crecimiento de los esferoides MCF7 que se demuestra en el análisis citométrico por la acumulación de las células en las fases no proliferativas del ciclo mitótico (G_0/G_1) y en menor grado en la fase G_2/M . La cuantía de esta *parada* proliferativa ha sido variable entre experimentos situándose entre un 55 y un 85% de los elementos formes.

2.- Se ha observado que el cambio de medio a otro conteniendo estradiol, trae consigo el rescate de forma sincronizada de la población celular, de tal manera que a las 28 horas de cultivo con estradiol se produce un acúmulo de células en la fase S del ciclo celular (50% frente al 15% a las 6 horas del rescate) que unas horas más tarde se traduce por un aumento significativo de las mitosis que pasan del 6% al 25%.

Estos resultados confirman nuestra experiencia previa con las células MCF7 creciendo en monocapa en un medio de cultivo suplementado con OH-TAM (0.1 :M), el cual, transcurridos 72 días se cambió por un medio nuevo conteniendo estradiol (Villalobos *et al.*, 1987; Olea *et al.*, 1990). En tales experimentos se comprobó el sincronismo celular mediante la demostración de ondas de máximos y mínimos en la incorporación de timidina tritiada. Resultados más recientes, obtenidos por citometría de flujo para esta misma línea celular confirman que, efectivamente, el hidroxitamoxifeno acumula las células en fases no proliferativas del ciclo celular, efecto que es revertido cuando se añade al medio de cultivo concentraciones adecuadas de estradiol. (Villalobos *et al.*, 1995; Becerra, 2002).

El conocimiento que se tiene sobre el crecimiento y parámetros de cinética proliferativa de los esferoides MCF7 supone una gran ventaja a la hora de estudiar el efecto de los agentes físicos -radiación ionizante- o químicos -drogas antineoplásicas- en este modelo *in vitro* de cáncer mamario (Olea *et al.*, 1992; Santini *et al.*, 1999). Pero es que además, la posibilidad de detener o inducir la proliferación co manipulación del microambiente hormonal, abre una buena vía para el estudio de genes y proteínas implicados en la regulación del ciclo celular, tanto en lo que se refiere a aquellos cuya acción podría estar mediada por el receptor de estrógenos, como para el estudio de

mecanismos de acción que expliquen el paso de células proliferativas a estados no proliferativos, o viceversa.

A este respecto, la capacidad del antiestrógeno para sincronizar las células MCF7 observada en los experimentos de laboratorio, hace posible el estudio combinado de distintos protocolos terapéuticos utilizados de forma habitual en la clínica. Sirva de ejemplo el desarrollo de protocolos experimentales que imitan los procedimientos clínicos en aquellas pacientes sometidas a tratamiento hormonal con tamoxifeno que requieren tratamiento radioterápico. Al trasponer el protocolo clínico al modelo experimental que utiliza células MCF7 creciendo en monocapa se ha podido determinar que las células irradiadas en estadios no proliferativos por privación de estrógenos, presenta una menor sensibilidad a la radiación que aquellas otras que se encuentran en fases proliferativas del ciclo celular, conteniendo estrógenos en el medio de cultivo (Villalobos *et al.*, 1995). Esta diferencia en la respuesta a la radiación es de más difícil evaluación si se utiliza como inhibidor del crecimiento en cultivo en monocapa el OH-TAM (Sarkaria *et al.*, 1994; Becerra, 2002), o el antiestrógeno EA800 en modelos experimentales animales (Gutman *et al.*, 2003). Desafortunadamente, el modelo de esferoides MCF7 no ha proporcionado la información requerida a este respecto, ya que el tratamiento secuencial OH-TAM/RT provoca una desestructuración del esferoide que impide el seguimiento del mismo durante un tiempo suficiente como para valorar los parámetros de crecimiento.

RESPUESTA A LA RADIACIÓN DE LOS ESFEROIDES MULTICELULARES MCF7

Una de las grandes cualidades del modelo tumoral *in vitro* proporcionado por los esferoides multicelulares es su semejanza con la forma preclínica de crecimiento tumoral y la facilidad con la que es posible modificar las condiciones medioambientales del esferoide que repercuten tanto sobre la compartimentalización como sobre la cinética de crecimiento del microtumor (Villalobos *et al.*, 1990; Oloumi *et al.*, 2002)

Por esta razón, la respuesta a la radiación ionizante de los esferoides multicelulares ha sido abordada desde diferentes aspectos ya sea con estudios moleculares que incluyen el análisis de la lesión letal y/o potencialmente letal y la capacidad de las células para reparar el daño (Ozawa *et al.*, 1999; Durand y Olive, 2001), y el estudio de los genes implicados en la radiosensibilidad, o la influencia de la estructura de la cromatina en la respuesta a la radiación (Olive y Durand, 1994; Santini *et al.*, 1999; Durand y Olive, 2001; Oloumi *et al.*, 2002). De igual manera se pueden realizar estudios de cinética de proliferación de los esferoides tras irradiación y de respuesta a distintos protocolos de tratamiento.

Este trabajo dedica gran parte de su esfuerzo a la puesta a punto de algunos de los métodos descritos, cada uno de los cuales aporta distintas posibilidades de interpretación. Así, podemos obtener parámetros que nos indiquen la radiosensibilidad de los esferoides sin necesidad de realizar la disgregación de los mismos, como en el caso del seguimiento del crecimiento mediante observación y tallado diario tras irradiación, o utilizar el ensayo clonogénico de referencia, o aplicar la metodología de análisis molecular para responder a preguntas formuladas en este nivel de complejidad.

Es sin duda en los experimentos de observación diaria de los esferoides tras irradiación donde se percibe de forma mas intuitiva el efecto de la radiación ionizante sobre el ritmo de crecimiento del microtumor. Pero, a pesar de la simplicidad de la

datación numérica, lo cierto es que la interpretación no es sencilla. Esto se debe a un fenómeno bien documentado, el esferoide tratado es posible que alcance en tamaño a los esferoides control no sometidos a radiación con algunas horas/días de retraso, pero no es fácil saber si este retraso en el crecimiento es la expresión de una recuperación total de la capacidad proliferativa de las células supervivientes o es el resultado de fenómenos más complejos. Lo cierto es que tras irradiación, es posible observar que la cinética de proliferación de los esferoides MCF7 se ve modificada. Así, utilizando el retraso en el crecimiento (GD) para estimar esta variación, hemos observado que existe una relación lineal entre el tiempo empleado por los esferoides tratados y los esferoides no tratados para alcanzar un volumen 5 veces superior al inicial, frente a la dosis de radiación. Esto permite obtener un valor para la constante de retraso g , que es particular para cada condición en que experimentalmente se lleva a cabo la irradiación. El valor de g para esferoides MCF7 mantenidos en medio de cultivo estándar es de $0.17 \pm 0.01 \text{ Gy}^{-1}$, valor que sitúa a esta línea celular en un rango de sensibilidad intermedia en comparación con otras líneas celulares (Schwachofer *et al.*, 1989).

Experimentalmente, parece no existir un criterio objetivo que justifique la elección del punto de referencia en el cual se va a estimar el GD para esferoides tratados con diferentes dosis de radiación; de hecho, se ha definido un incremento del volumen inicial de 2, 5, 8 ó 50 veces dependiendo de las características de crecimiento de cada estirpe de esferoides y del tamaño inicial considerado (Kuwashima *et al.*, 1988; Sham y Durand, 1999). La elección del factor de multiplicación sería irrelevante si el resultado de la estimación de los parámetros derivados fuera la misma. No obstante, se observa una variación significativa para el GD, y consecuentemente para el factor g derivado, según se considere un factor de multiplicación u otro.

En la estimación del GD se asume que tras irradiación se recupera, con mayor o menor celeridad, la cinética de crecimiento de los esferoides no tratados existiendo una dosis dependencia en el tiempo de recuperación, sin que tenga efectos más profundos sobre la estructura y comportamiento del esferoide. Esta es una aproximación excesivamente simple y no soportada por algunas observaciones

experimentales por lo que se han buscado otras formas de evolución del efecto de la radiación.

Así, algunos autores han estimado el parámetro SRU, o número mínimo de clonógenos tumorales capaces de hacer recrecer un esferoide tratado, derivado del GD para una dosis que da lugar a un 10% de control, (Stuschke *et al.*,1992; Sakata *et al.*, 1992; Buffa *et al.*, 2001). Si bien en el caso de esferoides MCF7 de pequeño tamaño, en donde hay células estancadas en compartimentos no proliferativos, pero con una posibilidad potencial de ser reclutadas, es posible asumir que los responsables del aumento de volumen tras irradiación son los clonógenos supervivientes, para esferoides de tamaño igual o superior a 300 μ m de diámetro es posible que se de la situación en que los incrementos en el volumen del esferoides tras irradiación se acompañen de la disminución de la fracción de células clonogénicas, al pasar muchas de ellas a una situación de compromiso proliferativo, reversible en unos casos e irreversible en otros. De hecho, los fenómenos de recrecimiento acelerado que pueden ponerse de manifiesto en ciertas circunstancias serían reflejo de cambios en la cinética normal de crecimiento de la población del esferoide una vez tratado con radiación: i) acortamiento en las fases del ciclo mitótico, ii) aumento del número de células que entran en el ciclo divisorio, iii) pérdida del factor de pérdida celular (Durand, 1993). En estas circunstancias sería difícil predecir, a través de los datos de recrecimiento, la cantidad de elementos residuales con capacidad proliferativa que han quedado tras el tratamiento radioterápico inicial.

La estimación del GD presenta, bajo nuestro punto de vista, numerosas ambigüedades por lo que se hacia necesario realizar un análisis más preciso basado en el modelo establecido para el crecimiento de los esferoides no tratados y los sometidos a radiación. A este respecto, el presente trabajo ayuda a desentrañar información que puede ser relevante.

Es un hecho que los esferoides MCF7 irradiados con dosis única de hasta 6 Gy presentan un buen ajuste de los datos de crecimiento a la ecuación de Gompertz pero con unos parámetros de A y \forall distintos. Tras irradiación, es posible observar una fase más o menos prolongada, dependiente de la dosis administrada, en la cual el crecimiento del esferoide es estacionario. Esta fase se sigue del recrecimiento de la

agrupación celular. Pero no todos los esferoides son capaces de recuperar su ritmo proliferativo tras la fase de estancamiento y presentar un buen ajuste a la ecuación de Gompertz. Aparentemente los esferoides no tratados y los tratados hasta dosis de 6 Gy presentan el mismo ritmo de crecimiento cuando los datos se normalizan correctamente a un volumen inicial común. Sin embargo, hemos podido comprobar que el parámetro A de la ecuación de Gompertz decrece linealmente con la dosis lo que indica que la cinética de proliferación de los esferoides expuestos a la radiación ionizante se ve perturbada hasta el punto de no recuperar completamente el ritmo normal de crecimiento (Guirado *et al.*, 2003). Esta observación experimental contrasta con lo referido por otros autores (Tarnawski *et al.*, 1998; Malinem *et al.*, 2000), si bien es cierto que, como hemos apuntado previamente, estos pueden haber utilizado métodos de valoración del crecimiento imprecisos o incorrectos desde nuestro punto de vista.

Teniendo en cuenta los resultados, se hacía necesario un estudio pormenorizado en orden a obtener una información más precisa capaz de aportar una explicación satisfactoria a las diferencias de cinética encontradas y, lo que es más importante, si esas diferencias modifican la radiosensibilidad de los esferoides, influyendo en el control tumoral. Además, estas observaciones experimentales pueden servir de ayuda para interpretar algunos datos de la clínica no bien entendidos. Por esta razón se planteó en este trabajo profundizar en las técnicas necesarias para evaluar la curación *-cure-* o control del esferoide.

Experimentalmente, los tests de control o *cure* se basan en la valoración de la capacidad de los esferoides para recrecer en monocapa tras irradiación. Nuestros resultados describen con exactitud la relación entre dosis y probabilidad de control tumoral tras radiación. Nuestro grupo de trabajo (Villalobos *et al.*, 1995) estimó un valor para la dosis necesaria para controlar el 50 % de los esferoides (SCD50) de 5.51 ± 0.26 Gy (IC95%: 4.82-6.20), valor que era sensiblemente diferente del atribuido para el mismo parámetro por Stuschke y colaboradores que la cifraban en 11.7 Gy (Stuschke *et al.*, 1992). Las diferencias entre ambas estimaciones de dosis que controla el 50% de los esferoides podrían explicarse teniendo en cuenta el comportamiento distinto de los diferentes clones de la misma línea celular que pueden ser utilizados en cada laboratorio

(Osborne *et al.*, 1987; Villalobos *et al.*, 1995; Burow *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2000). Mientras que determinados clones celulares de la línea MCF7, como el BB usado en el primero de los trabajos reseñados, presentan una dependencia hormonal a estrógenos y antiestrógenos bien conocida, el clon proveniente de la ATCC, usado por Stuschke y colaboradores, tiene un comportamiento distinto, no respondiendo a las hormonas y antihormonas. Tales características de dependencia hormonal pueden ser reflejo de las peculiaridades específicas de cada estirpe celular y condicionar su respuesta a la radiación ionizante. De hecho, los datos de radiosensibilidad aportados por Núñez (Núñez *et al.*, 1994) para los distintos clones MCF7 confirman esta sospecha. Igualmente, células cultivadas en condiciones de ausencia/presencia de hormonas estrogénicas de una misma estirpe celular pero de clones distintos (MCF7 BUS y BB) difieren también en su radiosensibilidad (Villalobos *et al.*, 1995).

Tres factores parecen determinar la radiocuración o control de los esferoides multicelulares: i) la sensibilidad celular a la radiación, ii) el número de células clonogénicas en el esferoide y iii) el número crítico de células, entendido como el número mínimo de células clonogénicas capaz de regenerar un esferoide tratado.

Mientras que los dos primeros factores pueden ser analizados de forma más o menos correcta por otros métodos, la significación del último factor radica en la observación de que el control del esferoide por radiación puede ocurrir aun antes de la muerte de todos los elementos celulares o incluso la destrucción de todos los clonógenos tumorales. El número crítico de células expresa la cuantía de este fenómeno y parece ser constante para cualquier nivel de dosis (Sakata *et al.*, 1995), si bien podría variar a lo largo del tratamiento (Maliném *et al.*, 2000). Experimentalmente se puede demostrar que el crecimiento y expansión celular de un esferoide tratado tiene que superar el ambiente adverso proporcionado por las células en proceso de destrucción. Se trata, por tanto, de un factor que considera la muerte celular no asociada a la radiación. Este término tiene cierta similitud con: i) el mismo concepto empleado por Cohen en experimentación animal (Cohen y Cohen, 1960), ii) la “probabilidad de una célula única para repoblar un tumor” de Gilbert (Gilbert, 1974); iii) las células capaces de rescatar el

tumor de Moore y Hendry (Moore y Hendry, 1984) y iv) el número de unidades de regeneración (SRU) de Wheldon (Wheldon *et al.*, 1985).

El número crítico de células es una característica propia del modelo esferoideal y junto a la radiosensibilidad intrínseca de la estirpe celular determinarán la radiocurabilidad del esferoide. La relación entre la probabilidad de control del esferoide y el número de clonógenos tumorales ha sido utilizada por varios autores (Schwachofer *et al.*, 1990; Malinem *et al.*, 2000; Buffa *et al.*, 2001) para estimar el valor del número crítico de células.

Para el análisis cuantitativo de la radiocurabilidad de los esferoide tumorales, al igual que de los tumores sólidos, se ha utilizado el modelo de múltiples blancos para la muerte celular y las curvas de control tumoral suponiendo un modelo de distribución de Poisson para la muerte celular por radiación (Sakata *et al.*, 1992; Malinem *et al.*, 2000; Buffa *et al.*, 2001). Actualmente el modelo lineal cuadrático (LQ) es el más empleado para describir la supervivencia de las unidades de regeneración tumoral, unidades clonogénicas o células blanco en protocolos de radiación de dosis única y fraccionada. A partir de las curvas de dosis-respuesta es posible derivar los parámetros de radioinsensibilidad del modelo. Con la utilización del modelo LQ es usual utilizar los parámetros \forall y \exists , como medida cuantitativa de sensibilidad celular, y la determinación del cociente \forall/\exists como una medida cuantitativa de sensibilidad celular a la radioterapia fraccionada (Malinem *et al.*, 2000).

Thames y colaboradores (Thames *et al.*, 1986) propusieron la utilización de un análisis directo de los datos experimentales cuando la respuesta a la radiación tiene un carácter estocástico (todo/nada), como ocurre en la estimación de la supervivencia en los ensayos clonogénicos. Tal aproximación matemática ha sido bien recibida en el campo de la experimentación con los esferoides multicelulares, de tal manera que hoy el método empleado más frecuentemente para la derivación de los parámetros de radiosensibilidad, una vez aceptado el modelo LQ, pasa por el análisis directo de los datos de los experimentos de control.

Los parámetros de radiosensibilidad obtenidos por nosotros para los esferoides multicelulares MCF7 sometidos a dosis únicas de radiación utilizando este modelo de ajuste son: $\forall = 0.210 \text{ Gy}^{-1}$ (IC95%: 0.698-0.278), $\exists = 0.014 \text{ Gy}^{-2}$ (IC95%: 0.049 - 0.021) y $k = 2.36$ (IC95%: 0.520 – 10.665).

Por sorprendente que parezca, la correspondencia existente en el tratamiento del cáncer con radiación entre fenómenos básicos y observaciones clínicas es muy estrecha, así, de acuerdo con las ideas actuales, el control clínico de un determinado tumor se produce cuando la supervivencia de las células clonogénicas del mismo se reduce a cero (Kummermehr, 2001). Conocido por tanto el número de células clonogénicas supervivientes tras radiación, la probabilidad de control tumoral por radiación es una función de probabilidad del número medio de clonógenos tumorales supervivientes, de tal forma que si éste es mínimo la probabilidad de control tumoral tiende a ser máxima.

Sin embargo, la heterogeneidad de los tumores humanos, en lo que respecta a su comportamiento biológico y su respuesta a la radioterapia podría hacer más complejo el problema. Los tipos de heterogeneidad más relevantes son dos: la heterogeneidad clonal y la heterogeneidad ambiental. En la primera se incluyen las variaciones de radiosensibilidad intrínseca y la capacidad de las células tumorales para reparar el daño radioinducido. La segunda se refiere a aquellos elementos del microambiente tumoral que afectan de modo indirecto a la radiosensibilidad, sobre todo el estado de oxigenación tisular.

Si bien admitimos la homogeneidad de las células que componen el esferoide multicelular ya que proceden todas ellas de una misma estirpe celular obtenida del cultivo en monocapa así como la buena oxigenación de las mismas en esferoides MCF7 de hasta 270 μm (Olea *et al.*, 1992), es necesario considerar que no todas las células con capacidad clonogénica están situadas dentro del esferoide en una posición óptima para expresar dicha capacidad clonogénica. La estructura tridimensional, o la disposición de la cromatina podrían suponer así mismo un obstáculo o una ventaja para una correcta reparación celular tras irradiación. Por todo ello, hemos creído necesario considerar, por un lado, la respuesta global del esferoide a la administración de distintas dosis de

radiación y compararla con la obtenida por los procedimientos anteriores en los que igualmente se valora el crecimiento global del esferoide. Por otro, estimar la fracción de supervivencia tras irradiación obtenida mediante el ensayo clásico de clonogenicidad en el que es necesario disgregar previamente los esferoides y por tanto facilitar la expresión de la capacidad clonogénica celular.

Recientemente, autores como Björk-Eriksson y Buffa y colaboradores (Björk-Eriksson *et al.*, 2000; Buffa *et al.*, 2001) han propuesto que tanto la fracción de supervivencia obtenida por el ensayo clonogénico como la eficiencia en la formación de colonias son factores pronósticos de capital importancia para el control local tumoral de diversos tipos de tumores. En este trabajo, los experimentos de irradiación aguda en los que se ha estimado la supervivencia celular clonogénica de los esferoides MCF7 se han realizado, en principio, para volúmenes de agrupaciones celulares que no sobrepasen las 200 μm de diámetro. No es necesario recordar que, en torno a este volumen, la estructura interna del esferoide asegura la ausencia de hipoxia y, por tanto, hace innecesaria la necesidad de consideración de un compartimento celular de estas características en la estimación de la respuesta de los esferoides a la radiación.

En tales condiciones experimentales, los valores de los parámetros de radiosensibilidad celular estimados administrando un rango de dosis aguda de 0-12 Gy, según lo descrito en Material y Métodos, a esferoides intactos y una vez disgregados para determinar su capacidad clonogénica, son: $\forall = 0.149 \text{ Gy}^{-1}$. $\exists = 0.031 \text{ Gy}^{-2}$, el cociente \forall/\exists entre ambas constantes es igual a 4.8 y la fracción de supervivencia a 2 Gy se sitúa en torno al 70%.

A este respecto es interesante hacer notar que si se estima la fracción de supervivencia por derivación de la ecuación descrita para el recrecimiento tras irradiación obtenemos una fracción de supervivencia a 2 Gy = 74 ± 3 , datos perfectamente compatibles con los encontrados utilizando el ensayo clonogénico. Recuérdese que ese método no requiere la disgregación tras irradiación de los esferoides y considera su crecimiento global, y no únicamente referido a las células clonogénicas que los componen. El ensayo clonogénico parece confirmar la hipótesis de partida para cuantificar el recrecimiento tras irradiación, esto es, que son las células clonogénicas las

responsables del crecimiento tumoral y además el número de éstas es proporcional al volumen total del esferoide.

Por último, es llamativa la diferencia existente entre los parámetros de radiosensibilidad de los esferoides y los obtenidos en los ensayos de clonogenicidad sobre células MCF7 mantenidas en monocapa, en donde los valores correspondientes de los parámetros de radiosensibilidad fueron $\nabla = 0.316 \text{ Gy}^{-1}$, $\exists = 0.023 \text{ Gy}^{-2}$, el cociente entre ambas constantes igual a 13.7 y la fracción de supervivencia a 2 Gy en torno al 50%, por lo que podrían ser calificadas estas células en el grupo de radiosensibilidad intermedia, e incluidas dentro del grupo C de Deacon (Deacon *et al.*, 1984), clasificación basada en la fracción de supervivencia a 2 Gy y en el parámetro del modelo lineal cuadrático.

La disminución de la sensibilidad a la radiación ionizante -menor valor del coeficiente ∇ y una mayor fracción de supervivencia a dosis baja- que presentan las células MCF7 irradiadas en suspensión formando esferoides multicelulares, con respecto a la sensibilidad aumentada de las células en monocapa se podría justificar con diferentes argumentaciones. Por ejemplo, en el cultivo tridimensional la probabilidad de lesión y/o reparación son menores. Es cierto que la organización tridimensional del esferoide afecta a la estructuración de la cromatina intranuclear la cual se encuentra en una posición menos artificial con respecto a la situación *in vivo*, que cuando se compara con lo que ocurre en la célula anclada en monocapa a la superficie plástica de la caja de cultivo.

En esta explicación hay dos posibilidades que justificarían la menor sensibilidad del esferoide: i) el menor grado de lesión, soportado por los resultados experimentales que parecen confirmar que la radiación produce menos rupturas dobles de cadena por unidad de dosis y por unidad de DNA, y ii) una cinética de reparación distinta. En cuanto a la reparación, hemos tenido ocasión de comprobar experimentalmente, y así lo expondremos a continuación, que al menos en lo que se refiere a la velocidad de reagrupamiento de las lesiones, ésta es más rápida cuando las células se encuentran formando esferoides que cuando ocupan la superficie plana de la caja de cultivo formando una monocapa.

RADIOSENSIBILIDAD MOLECULAR DE ESFEROIDES MCF7

Se acepta de manera general que la radiación afecta letalmente a las células eucariotas a través del daño producido en la estructura y/o la función de su DNA (Sutherland 2000; 2002, Smith *et al.*, 2003). Por esta razón, se han desarrollado tests biológicos que estiman la supervivencia celular a través de la cuantificación de las lesiones en el DNA. Afortunadamente la estimación de la cantidad de lesiones producidas por la radiación ionizante sobre la estructura doble helicoidal del DNA correlaciona de forma muy precisa con los resultados de bioensayos más laboriosos y complejos como es el ensayo clonogénico (McMillan *et al.*, 2001), por lo que los tests desarrollados a este respecto podrían ser una buena alternativa para la estimación de la radiosensibilidad de los esferoides.

En orden a comprobar si en nuestro modelo es posible utilizar un test de estimación de la radiosensibilidad molecular rápido, sencillo y que no requiera de condiciones estrictas de esterilidad para su realización, se investigó la cuantificación del número de rupturas dobles de cadena de DNA mediante electroforesis de campo pulsado con un protocolo adaptado a los esferoides multicelulares. (Núñez *et al.*, 1998; Woudstra *et al.*, 1998; Eastham *et al.*, 2001; Ruiz de Almodóvar *et al.*, 2002). En dicho protocolo, el DNA extraído de las células irradiadas es forzado a moverse a través de un polímero de agarosa bajo el efecto de una fuerza eléctrica unidireccional. El procedimiento permite el estudio del DNA fragmentado de las células que componen el esferoide una vez irradiado que migra por el polímero de agarosa permitiendo así la valoración y cuantificación de las mismas.

La irradiación de los esferoides se lleva a cabo sobre un conjunto de esferoides creciendo en condiciones óptimas en una misma caja de cultivo. Aunque la población no es perfectamente homogénea en su tamaño, en todos los casos la suspensión se sometió a tratamiento 48 horas de su formación, con lo que se garantiza que el número de esferoides que sobrepasa las 250 μm de diámetro sea prácticamente despreciable.

Para evitar que durante la irradiación se pudieran producir fenómenos de reagrupamiento entre cadenas de DNA fragmentadas, el proceso se llevó a cabo sobre una base de hielo. El rango de dosis estuvo comprendido entre 0 y 45 Gy. Una vez procesadas las muestras como se describe en Material y Métodos, hemos podido observar que, la magnitud de la lesión molecular inicialmente radioinducida, es función de la dosis de radiación administrada. Los resultados obtenidos sugieren que entre dosis de radiación y número de rupturas dobles de cadena de DNA existe una relación lineal, lo cual concuerda con los datos obtenidos para esta misma línea celular en monocapa (Núñez *et al.*, 1998) discrepando con algunos autores que afirman que la asociación entre ambas magnitudes no es constante (Radford, 1986).

La representación gráfica de la relación entre la dosis de radiación y el número de rupturas dobles de cadena de DNA originadas por la radiación ionizante, por unidad de Dosis (Gy) y por unidad de DNA (200Mpb), se traduce en una recta cuya pendiente, en el caso de los esferoides, es de 1.36, manteniéndose la dosis-dependencia observada para la monocapa. Aunque interesante, este valor es significativamente inferior al obtenido en los experimentos de irradiación aplicados a misma línea celular cultivada en monocapa ya que el valor correspondiente a las células MCF7 BB se sitúa en torno a los 2.2 rdc/Gy/Mpb (Núñez *et al.*, 1998). Pero el resultado concuerda, de nuevo, con el encontrado en el test de clonogenicidad y sugiere que las condiciones de cultivo tridimensional hacen más radiorresistentes a las células con respecto a las cultivadas formando una sola capa celular. Esta asociación de resultados no es sorprendente si, como se ha sugerido por otros autores, el coeficiente ∇ del modelo lineal cuadrático obtenido mediante ensayo clonogénico, es un reflejo de las lesiones inducidas sobre el DNA de carácter irreparable. La proporcionalidad entre fracción de supervivencia, valor del coeficiente ∇ y lesión inducida es de una especial significación (Ruíz de Almodóvar *et al.*, 1995; Price *et al.*, 2000).

Por último, el test molecular aplicado a los esferoides ha sido útil, además, para validar el propio método de PFGE, comprobando que, en el caso particular de pequeños agregados celulares, los fragmentos de DNA migran con idéntico comportamiento en un gel de agarosa sometido a la electroforesis a como lo hacen los

tejidos o cultivos disgregados. Esta observación se considera un paso previo para su aplicación a pequeños fragmentos tisulares de tejido sano o biopsias tumorales procedentes de pacientes de cáncer de mama sin necesidad de disgregación. Este tipo de ensayos, desarrollados en nuestro laboratorio a partir de los experimentos mostrados aquí, tienen entre sus objetivos, disminuir la morbilidad de las pacientes sometidas a Radioterapia y en consecuencia mejorar su calidad de vida. Además, el disponer de un test predictivo de radiosensibilidad sobre tejido sano y/o sobre tumor podría contribuir, junto con los factores pronósticos clásicos, a mejorar el tratamiento de estas pacientes.

Las diferencias en radiosensibilidad obtenidas entre esferoides y monocapa procedentes de una misma estirpe celular, podrían ser debidas, además de a un número de lesiones radioinducidas mayor para la segunda modalidad como ya hemos establecido, a la mayor capacidad de la estructura celular–nuclear tridimensional para reparar el daño. Con objeto de investigar la influencia de este segundo factor, hemos diseñado una serie de experimentos de irradiación en los que hemos comparado la cinética de reparación de las lesiones en cultivo en monocapa y, en la misma línea celular, cultivada como esferoides multicelulares.

Los experimentos llevados a cabo en uno y otro modelo sugieren una menor eficacia en el reagrupamiento para el caso de los esferoides multicelulares. El fenómeno de reagrupamiento de la doble cadena de DNA en esferoides multicelulares MCF7 se ajusta, como ocurre en monocapa, a un modelo cinético bifásico con un componente rápido y un componente lento lo que pone de manifiesto que la mayor parte de las lesiones producidas se reparan en el curso de las primeras horas que siguen a la irradiación. Estos datos apoyan la hipótesis de que la rotura doble de cadena de DNA es una lesión subletal (Dale *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2002) y que la eficacia de los procesos de reparación a nivel molecular es elevada.

Dado que los esferoides multicelulares de MCF7 presentan menos roturas dobles de cadena de DNA que las que se producen en monocapa, es lógico pensar que también presenten una cinética de reagrupamiento de cadenas más rápida. Es cierto que en nuestro modelo esto ocurre en los primeros minutos no reagrupándose más del 35% a las 24 horas, mientras que en monocapa el reagrupamiento de las cadenas rotas es

prácticamente completa, si bien la cinética del proceso en los primeros minutos parece ser más lenta. Estos resultados requieren una interpretación cautelosa pues una primera impresión hace pensar en una mayor radiosensibilidad de los esferoides MCF7 por su menor capacidad para reagrupar las cadenas de DNA respecto a la monocapa si bien otros factores de carácter molecular implicados en el fenómeno de reparación que no se han podido estudiar en este trabajo, podrían estar influyendo en la radiosensibilidad final de los esferoides. En este sentido, parece jugar un importante papel enzimas de importancia relevante en la reparación del DNA como la DNA polimerasa cuya función está muy relacionada con la compactación del DNA de forma tal que actuaría de modo diferente según se esté realizando una función replicativa en el DNA o éste se encuentre en fases no proliferativas (Woudstra *et al.*, 1996; Ljungman, 1999; Sak *et al.*, 2000; Pospiech *et al.*, 2001). De igual forma, ha sido ampliamente descrita la implicación de genes y proteínas como la PARP y la p53 en el proceso de reparación del DNA en proceso de síntesis (Bache *et al.*, 2001; Herceg *et al.*, 2001). Estos autores, han puesto de manifiesto utilizando líneas celulares procedentes de ratones deficientes en PARP que estas presentan una mayor radiosensibilidad celular por la incapacidad para reparar el daño. (Oliver *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 2002). La posibilidad de estudiar el estado y funcionalidad de este proceso en los esferoides MCF7 podría ayudar a dilucidar en parte los resultados obtenidos.

Se conoce igualmente la función de los puntos de control del ciclo celular tratando de evitar la fijación del daño producido sobre el DNA y la transmisión del mismo a las células hijas. Este conocimiento puede ser de gran utilidad para una correcta explicación de los datos experimentales. En este sentido, Durand y Olive (Durand y Olive, 2001) atribuyen la mayor radiorresistencia de los esferoides respecto a la monocapa a que el bloqueo en G₂ que se produce en los esferoides tras irradiación es de menor duración y por tanto el tiempo para reparar el daño antes de entrar en mitosis es menor. En definitiva, los fenómenos que pueden influir durante la reparación son múltiples y complejos. La compactación celular de los esferoides multicelulares así como la metodología utilizada para la determinación del fenómeno de reagrupamiento de cadenas de DNA, si bien son útiles en sí mismos, podrían estar dificultando la extracción de resultados concluyentes al comparar ambos modelos.

COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA RADIOSENSIBILIDAD EN ESFEROIDES MULTICELULARES MCF7.

Los procedimientos utilizados en esta Memoria para estimar la radiosensibilidad de los esferoides pueden reflejar con mayor o menor precisión los protocolos de tratamiento con radioterapia en la práctica clínica. Así, el control tumoral tras irradiación y la estimación del retraso en el crecimiento (GD) son considerados los métodos *in situ* más adecuados para la determinación de la radiosensibilidad, ya que en ambos casos la interacción célula-célula se mantiene durante y tras el tratamiento, y no es necesario la disgregación del esferoide en sus elementos constituyentes, como ocurre en el ensayo clonogénico. La disociación enzimática o mecánica de esferoides y de las muestras obtenidas de los tumores podría ser una perturbación experimental importante que pudiera afectar a la supervivencia celular por sí misma y, por tanto, afectar a la estimación de los parámetros de radiosensibilidad (Rofstad, 1986; Guirado *et al.*, 2003). Cada uno de los procedimientos de estimación cuantitativa del efecto de la radiación exige, además, una aproximación matemática particular y adecuada a cada caso para la obtención de los parámetros de radiosensibilidad (Moore *et al.*, 1987; Hawkins, 2000; Buffa *et al.*, 2001; Guirado *et al.*, 2003). En consecuencia, cabe esperar que no en todos los procedimientos experimentales aquí aplicados se obtengan los mismos parámetros de radiosensibilidad, y por tanto la comparación entre ellos mismos y con los obtenidos por otros autores puede entrañar alguna dificultad.

En nuestro caso, la comparación de los resultados obtenidos por los diferentes procedimientos indican que: i) los valores de los parámetros de radiosensibilidad son semejantes aunque difieren ligeramente en el caso del ensayo clonogénico y *cure*; este resultado no es sorprendente dada la similitud de tamaño entre los esferoides utilizados en ambos métodos; ii) la mayor sensibilidad obtenida para el ensayo clonogénico puede justificarse teniendo en cuenta que el proceso de disgregación enzimática puede aumentar la muerte celular y contribuir a la sobre-estimación del daño; iii) la ventaja del ensayo de *cure* reside en que proporciona el valor del parámetro k , esto es, una

estimación del número de unidades de regeneración del esferoide; iv) la mayor radiosensibilidad que se observa en los experimentos de recrecimiento no puede equipararse de forma sencilla con los resultados de los otros tests, dada la diferencia de tamaño entre los esferoides utilizados en este ensayo y los usados en los métodos anteriores; sin embargo, puesto que la integridad y estructura de los esferoides se mantiene durante todo el ensayo, son de esperar resultados diferentes al de los dos métodos anteriores para esferoides del mismo tamaño, y si el ensayo es lo suficientemente preciso, más fiables.

En cualquier caso, cada protocolo parece responder a los requerimientos de cada experimento y, a su vez, puede responder a preguntas formuladas con diferente intención. Por ejemplo la disminución de la sensibilidad a la radiación ionizante -- menor valor del coeficiente \forall , mayor fracción de supervivencia a dosis bajas y menor número de rupturas dobles de las cadenas de DNA-- que presentan las células MCF7 irradiadas en suspensión formando esferoides multicelulares, con respecto a las sensibilidad aumentada en la monocapa celular podría estar justificada por:

1. Las diferencias en la geometría de disposición de las células en monocapa frente a los esferoides multicelulares, que afecta a la célula en su totalidad, incluidos citoesqueleto y estructuración de la cromatina nuclear (Olive y Durand, 1994; Durand y Olive, 2001); el diferente grado de daño sobre el DNA, o la distinta capacidad de reparación de este daño, podría ser uno de los motivos de la disparidad en la supervivencia clonogénica observada.

2. La proporción en que las células de ambas poblaciones, esferoides y monocapa, se distribuyen en las fases del ciclo divisorio, las cuales se caracterizan por una sensibilidad diferente a la radiación; la fracción misma de células con capacidad proliferativa podría explicar las diferencias.

3. La compartimentalización celular en cuanto a oxigenación y aporte de nutrientes que se establece en los esferoides multicelulares y que no es un elemento de consideración en el cultivo en monocapa.

Se han desarrollado experimentos de muy diversa índole para poner de manifiesto cual o cuales pueden ser las causas de las discrepancias en la radiosensibilidad observada entre ambas formas de cultivo celular, pero en su planteamiento los diseños experimentales han tratado de identificar las propiedades de los modelos de tal manera que se hicieran prominentes y pudieran justificar la respuesta observada de unas mismas células a la radiación en ambas condiciones experimentales. De esta forma, consideradas cada una de las posibilidades presentadas hemos de descartar la propuesta en la última alternativa, ya que se ha sido muy riguroso en la elección de esferoides multicelulares de tamaño en torno a las 200 μm en los que, por definición, no existe una compartimentalización celular dependiente del aporte de oxígeno y nutrientes. El tamaño de sus diámetros, asegura una perfecta oxigenación, aún en las zonas más internas del esferoide, ya que estos no sobrepasan las 100 μm y la difusión está asegurada hasta las 160 μm de profundidad en la corteza del esferoide. No obstante es inquietante la idea de que una hipoxia débil, latente y no manifestada en los estudios histológicos o sugerida por los estudios de cinética, pudiera ser causa de esa radiorresistencia observada en los esferoides multicelulares.

Para valorar la influencia ejercida por el contacto intercelular sobre la radiosensibilidad, se han sugerido varias posibilidades que justifiquen los resultados: i) la comunicación intercelular que aumenta la recuperación celular tras irradiación, ii) los cambios en la forma nuclear y empaquetamiento del DNA que conduce a una mayor eficacia para reparar el DNA, iii) los cambios en la forma celular y expresión de genes resultando en cambios en el reconocimiento del daño, señales o, de nuevo, reparación (Durand y Olive 2001, Bache *et al.*, 2001).

Otro factor definido como posible influyente en las diferencias de radiosensibilidad ha sido la distribución de las células en fases mas o menos sensibles del ciclo celular. Nuestras observaciones ponen de manifiesto que aunque la distribución de las células en el ciclo celular es distinta en ambos modelos cuando el tamaño de los esferoides es mayor de 300 μm de diámetro, no difiere de la distribución encontrada para el cultivo en monocapa cuando los esferoides son de un tamaño inferior ($< 300 \mu\text{m}$). El análisis de los resultados obtenidos en los experimentos de cinética de

crecimiento y distribución de los elementos formes de ambas poblaciones en el ciclo divisorio celular ha requerido un gran esfuerzo y se ha analizado en profundidad. En primer lugar es necesario conocer cuál es la proporción de células en el ciclo divisorio, para después observar la distribución de las mismas en las diferentes fases del ciclo mitótico. La imposibilidad de distinguir las células sin actividad proliferativa -fase de reposo G_0 del ciclo divisorio-- de aquellas células en fases iniciales --fase G_1 -- del ciclo mitótico mediante el análisis por citometría de flujo, nos obliga a derivar la fracción de crecimiento celular a partir de otros protocolos experimentales como son la capacidad clonogénica y la estimación de los tiempos de duplicación de ambas poblaciones.

La primera de las aproximaciones experimentales propuesta pudiera ser engañosa, ya que la estimación de la capacidad clonogénica de ambas poblaciones celulares puede verse afectada por la distinta metodología que es necesario poner en marcha para proceder a la disgregación en elementos celulares aislados, condición experimental indispensable para testar la capacidad de los clonógenos tumorales para originar una población celular. Mientras que la monocapa celular MCF7 se disgrega fácilmente con tripsina- EDTA, los esferoides de la misma estirpe se disgregan con una mezcla enzimática e incluso con la ayuda de disgregación mecánica con jeringa. En este último caso es indudable que se puede producir cierto grado de lesión y muerte celular.

En el ensayo clonogénico a partir de la monocapa celular, la eficiencia de clonaje, es decir, el número de células que dan lugar a una colonia se sitúa en torno a 20-30 de cada 100, mientras que este valor cae a un 7-10% en el caso de los esferoides de 200 μm micras de diámetro. Considerado de esta manera, se podría decir que la población celular con mayor fracción de crecimiento, mayor número de células clonogénicas, sería más sensible a la radiación que aquella en que la participación de los elementos celulares en la fracción de células que hace crecer el tumor es menor, caso de los esferoides multicelulares. El resultado final de este proceso proliferativo es el crecimiento más o menos rápido del conjunto de la población celular, parámetro que puede ser estimado a través del cálculo del tiempo de duplicación de la población en monocapa o del volumen del esferoide. El tiempo de duplicación de las células MCF7 es de aproximadamente 34 horas y de los esferoides de 200 μm de diámetro es de 40

horas. La cinética de proliferación por tanto no difiere significativamente en ambos modelos por lo que no explicaría las diferencias de radiosensibilidad entre ellos modelos. Por esta razón, hemos considerado la posibilidad de que sea la especial distribución de las células en alguna fase en particular del ciclo mitótico que las haga más o menos sensibles a la radiación ionizante otro factor a considerar para explicar las diferencias en radiosensibilidad de los dos modelos -esferoides y monocapa-.

En este sentido, ya hemos comentado cómo afecta el tratamiento con OH-TAM a la distribución del ciclo celular y cómo, en monocapa, se ha observado mayor sensibilidad a la radiación en aquellas células que se encontraban en fases proliferativas del ciclo celular mientras que células hormonodependientes privadas de estradiol o sometidas a la acción de un antiestrógeno se encontraban en fases no proliferativas del ciclo celular y presentaban menor sensibilidad a la radiación. Por otra parte, son conocidos de antiguo los experimentos de Sinclair y colaboradores que asocian los binomios fase S/radiorresistencia celular y fase G₂/M/radiosensibilidad (Sinclair y Morton 1968).

En nuestro caso, es interesante considerar la similitud de distribución de los elementos formes en las poblaciones celulares MCF7 en monocapa y esferoides de pequeño tamaño. Tan solo se observa un ligero incremento en células en fase S en los esferoides con respecto a la monocapa, sin que se alcance la significación estadística. En principio, podría aceptarse que la mayor proporción de células en la fase S del ciclo celular observada en los esferoides de pequeño tamaño permite a éstos reparar con mayor facilidad las lesiones producidas por la radiación justificando así la mayor supervivencia observada en este modelo. Sin embargo, esta justificación parece demasiado simple. Por este motivo, hemos valorado también la posibilidad apuntada por otros autores (Siles *et al.*, 1998; Geldof *et al.*., 2003) que atribuyen las diferencias de radiosensibilidad encontradas en uno y otro modelo a la posibilidad de que las células se acumulen tras irradiación en los llamados puntos de restricción del ciclo celular (G₀/G₁ y G₂) para tratar de evitar, mediante los procesos de reparación, la transmisión a las células hijas del daño producido por la radiación en el DNA. De esta forma, si no es posible reparar el daño, las células no progresarían en el ciclo celular y la fracción de

supervivencia final se vería disminuida. De hecho, se ha descrito una asociación entre la fracción de supervivencia a 2Gy y grado de parada en G_0/G_1 (Siles *et al.*, 1998) y entre parada en fase G_2 y radiosensibilidad en células cultivadas en monocapa (Geldof *et al.*, 2003). Los hallazgos obtenidos en nuestro modelo, si bien revelan un porcentaje de células 6 horas después de la irradiación en fase G_0/G_1 del ciclo celular mayor que el encontrado en monocapa (25% vs 10-15%) no justifica suficientemente las diferencias de radiosensibilidad encontradas en ambos modelos. Por esta razón es difícil definir cual es el peso de esta distribución diferencial en las fases del ciclo celular en la estimación de la radiosensibilidad pero no parece probable, en consecuencia, que las diferencias de radiosensibilidad observadas en las células MCF7 cultivadas como esferoides multicelulares y formando una monocapa se deban a la especial distribución de su población en el ciclo celular. Quizás este análisis es demasiado sencillo y tenga que ser reconsiderado con posterioridad cuando se disponga de mayor información.

Con todo esto creemos cumplido el primer objetivo propuesto en el momento de plantear este trabajo: desarrollar un test de radiosensibilidad *in vitro* que usando el modelo de los esferoides multicelulares MCF 7 permita estimar los parámetros de radiosensibilidad celular tumoral y estudiar la relación existente entre dosis de radiación y efecto a nivel de la lesión molecular -cuantificación del número de rupturas del DNA-, la supervivencia celular --capacidad clonogénica tras irradiación y redistribución en el ciclo celular- y el crecimiento de la población celular en conjunto --retraso impuesto en el crecimiento y probabilidad de control tumoral, de los esferoides multicelulares.

En definitiva, hemos dado respuesta al requerimiento, establecer los factores que condicionan la respuesta a la radiación en el sistema de cultivo tridimensional frente al cultivo celular en monocapa, analizando las comparaciones oportunas entre ambos tipos de cultivo celular. Una vez conocidos y validados los parámetros de radiosensibilidad, es necesario comprobar si dichos parámetros varían a lo largo del tratamiento cuando la radiación se administra de forma fraccionada.

RESPUESTA DE LOS ESFEROIDES MULTICELULARES AL TRATAMIENTO CON RADIACIÓN FRACCIONADA.

No cabe duda de que una de las ventajas del modelo representado por los esferoides multicelulares, es la posibilidad que brinda para estudiar el efecto de la administración de las dosis de radiación en forma fraccionada. La cinética de crecimiento, la compartimentalización, las diferencias en la eficacia de la radiación para lesionar el DNA y/o de las células para repararlo, entre otros factores, los hacen útiles para estudios de fraccionamiento.

Cuatro fenómenos, además de la radiosensibilidad, han sido descritos como condicionantes en la radiorrespuesta tumoral y que igualmente deben ser considerados en los esferoides tratados: i) reparación de la lesión, ii) redistribución en el ciclo celular, iii) regeneración celular a partir de clonógenos, y iv) reoxigenación. De nuevo este último fenómeno podría descartarse ya que los ensayos se han realizado sobre esferoides de pequeño tamaño en los que el aporte de oxígeno y de nutrientes está garantizado en la misma medida en todas las células. Otro factor considerado en los últimos años como condicionante en la posible modificación de la radiosensibilidad durante el fraccionamiento ha sido la modificación en la expresión de genes implicados en la regeneración como el NF κ B (Li *et al.*, 2001) o la pérdida de funcionalidad de genes supresores de tumores como el gen p53. Así, la funcionalidad o no de este gen ha sido asociado tanto con un incremento de la radiorresistencia (Cerrato *et al.*, 2001), como de la radiosensibilidad (Iwadata *et al.*, 2001) sugiriendo que la respuesta clínica a la radiación podría depender también de factores genéticos aún no bien conocidos.

La elección de un buen protocolo que permita explotar la virtualidad del modelo en el que poder poner de manifiesto el peso de un fenómeno de forma predominante sobre el resto permite satisfacer dos de los objetivos propuestos: i) explicar las razones de las diferencias de sensibilidad para unas mismas células cultivadas en monocapa y en esferoides multicelulares y ii) establecer un protocolo único de irradiación fraccionada útil tanto para primocultivos como para tejido sano.

En este trabajo se han desarrollado varios protocolos de fraccionamiento en los que se incluyen variaciones en el número de dosis -una, dos y tres-- en el tiempo entre las dosis -6 y 24 horas-- y la asimetría, o dosis por fracción no constante, en el caso del bifraccionamiento.

Como era de esperar, la partición de dosis trae consigo un aumento muy significativo de la supervivencia. Así, frente a una fracción de supervivencia a 9 Gy del $0.0016 \% \pm 0.0002$ para una dosis única aguda se obtiene una supervivencia de $0.6 \% \pm 0.01$ tras fraccionamiento 3+3+3 Gy, es decir, para una misma dosis, se obtiene una supervivencia mayor si ésta se administra de forma fraccionada. Estos resultados son coincidentes con los descritos años atrás por Fowler (Fowler *et al.*, 1986) que sugería la necesidad de administrar mayor dosis para un mismo efecto biológico cuando se utilizan protocolos de irradiación fraccionada, y que venía justificada por la capacidad del tumor para recrecer tras la administración de una dosis de radiación, aunque esta capacidad de regeneración parece disminuir a lo largo del tiempo de tratamiento (Budach *et al.*, 1997; Wein *et al.*, 2000).

Más interesante, sin embargo, resulta la consideración de qué ocurre con los parámetros de radiosensibilidad de la población celular MCF7 en esferoides que han sido irradiados con un protocolo de fraccionamiento elegido y posteriormente son sometidos a irradiación aguda en un nuevo ensayo clonogénico completo. En definitiva, se trata de establecer si esferoides previamente sometidos a irradiación, modifican sus características de tal manera que una nueva dosis actúa sobre una población *distinta*.

Efectivamente, el análisis de los datos del ensayo clonogénico utilizando el modelo lineal cuadrático nos permite afirmar que la supervivencia celular disminuye conforme aumenta el número de fracciones, esto es, ante una misma dosis de radiación, las células previamente irradiadas presentan mayor radiosensibilidad, estimada ésta mediante ensayo clonogénico.

Evidentemente, desde la primera dosis hasta que se realiza el ensayo clonogénico tras la tercera dosis, ha transcurrido tiempo suficiente para que ocurra el fenómeno de regeneración. Hay que recordar, que el TD estimado para los esferoides MCF7 de tamaño inferior a 300 μm de diámetro es de aproximadamente 40 horas con lo cual, y considerando igualmente que la población clonogénica superviviente es la responsable de la repoblación con una cinética de proliferación semejante a la no irradiada, podríamos atribuir tanto a la reparación como a la regeneración los datos obtenidos.

Para disminuir en lo posible la influencia de este último fenómeno sobre la supervivencia celular, se realizaron algunos experimentos en los que los esferoides se sometieron a un esquema clásico de fraccionamiento durante un máximo de 24 horas: Dosis totales de 18 Gy se reparten cada 4 horas en fracciones comprendidas en un rango de 1,5 a 6 Gy por fracción. En esta situación, la dosis necesaria para obtener el isoeffecto estimado como supervivencia 1% en los esferoides multicelulares MCF7 se estima calcula en 5,58 Gy para 1,5 Gy por fracción, siendo necesario aumentar aproximadamente 1 Gy en la dosis Total para conseguir el isoeffecto del 1% de supervivencia conforme aumenta la dosis por fracción.

Nuestros resultados experimentales por tanto, sugieren que, al menos *in vitro*, tras el tratamiento con radiación con una dosis puntual ocurren en la población irradiada cambios que condicionan la respuesta a una nueva dosis de radiación.

Dichas modificaciones se ponen de manifiesto también en los ensayos en los que se determina el daño inicial radioinducido, esto es, comprobando si el número de rupturas dobles de cadena de DNA que se producen en los esferoides previamente irradiados con 18 Gy, en dosis de 6Gy/fracción separadas 24 horas, difiere de la radiosensibilidad de aquellos otros no sometidos a tratamiento previo; sin embargo, al aproximar las fracciones en el tiempo, se aproximan también las pendientes de radiosensibilidad de los esferoides previamente irradiados y la de los que no han recibido ninguna dosis previa de radiación si bien, partiendo de una lesión residual representada por la intersección de la recta en el eje de ordenadas mayor en el primer caso. Los resultados de nuevo concuerdan con los del ensayo clonogénico, esto es, la irradiación aumenta la radiosensibilidad de las células sometidas a una nueva dosis. La explicación a este fenómeno puede estar de nuevo en el fenómeno de regeneración celular entre fracción y fracción si bien es necesario dar una respuesta al mismo nivel molecular en el que se ha realizado el experimento, esto es, la radiosensibilidad podría verse aumentada por una lesión subletal previa que hace más probable la ruptura doble de cadena ante una nueva dosis de radiación, o bien que la reparación celular se vea dificultada cuando la cantidad de lesiones sobre el DNA es muy elevada. La primera de las explicaciones es la que sugieren Djordjevic y colaboradores (Djordjevic *et al.*, 1998)

para los resultados que obtiene utilizando el modelo del cultivo en monocapa y formando esferoides multicelulares con un protocolo de fraccionamiento en el que trata de evitar la proliferación celular entre dosis. Estos autores, junto con Alsbeih y colaboradores (Alsbeih *et al.*, 1995) atribuyen a la variabilidad del componente β del modelo lineal cuadrático durante el tratamiento con dosis fraccionada un papel relevante en la fracción de supervivencia, dada la relación atribuida a este parámetro con la lesión subletal. La diferencia en la capacidad de reparación de las células antes y después de ser sometidas a irradiación y su contribución en la radiosensibilidad final es aportada por otros autores como argumento para explicar las diferencias de radiosensibilidad durante el fraccionamiento (Chen *et al.*, 1991; Stewart, 2001), en otros casos, sustentando la hipótesis de que la reparación es un fenómeno saturable en el que las enzimas implicadas no pueden responder con la misma eficacia cuando las lesiones sobre el ADN se acumulan (Sánchez-Reyes, 1992). De igual forma Dasu (Dasu y Denekamp, 2000) diferencia la capacidad de las células para reparar el daño antes de iniciar el tratamiento de la reparación inducible tras tratamiento, pudiendo hacer más radiosensibles a las células una vez tratadas con dosis clínicas de radiación (2 Gy).

En los esferoides multicelulares utilizados en este trabajo se ha investigado también la cinética de reagrupamiento de los fragmentos de DNA en los esferoides sometidos a distintos protocolos de irradiación para evaluar si dicho fenómeno podría también explicar las diferencias de radiosensibilidad encontradas entre la población celular previamente irradiada y aquella que no ha recibido ninguna dosis de radiación con anterioridad. Los resultados obtenidos muestran que el número de cadenas de DNA fragmentadas que no se reagrupan es menor en aquellos esferoides que solo han recibido una dosis de radiación de 45 Gy con respecto a aquellos otros a los que se les administró una dosis previa de 6 Gy. Estas diferencias se mantienen cuando se acorta el tiempo entre la dosis previa y la irradiación posterior con 45 Gy. Estos resultados parecen indicar que los mecanismos de reparación son menos eficaces a lo largo del tratamiento y podrían ser consecuencia de cualquiera de las explicaciones atribuidas para este mismo fenómeno por otros autores (Ozawa *et al.*, 1999; Dasu y Denekamp, 2000) si bien la fidelidad en la reparación y por tanto la influencia en la viabilidad celular final debe ser evaluada.

En definitiva, los resultados experimentales sugieren que la radiosensibilidad de las células constituyentes de los esferoides multicelulares MCF7 aumenta cuando se someten éstos a dosis previas de radiación, y este proceso se evidencia tanto cuando se valora la radiosensibilidad como el daño radioinducido, cuantificado como número de cadenas dobles de DNA fragmentadas por la radiación, como cuando se estima la capacidad de reagrupamiento del DNA.

La comprobación experimental de que estos mismos fenómenos ocurren en los tejidos normales y tumorales *in vivo* está aun pendiente, tanto en el orden de su presentación como en la intensidad de cada uno de ellos, pero de ser demostrados, parece necesaria su consideración en los tests predictivos de respuesta a la radiación que traten de ayudar en el planteamiento de protocolos individualizados de radioterapia fraccionada.

Al establecer el protocolo de fraccionamiento de dosis es obligado considerar también la redistribución celular que se ocasiona como consecuencia de la muerte de las células en fases sensibles y el funcionamiento de los puntos de control del ciclo, paradas en G₁/S y G₂/M (Siles *et al.*, 1998). De hecho, el denominado retraso mitótico tras irradiación es un fenómeno conocido desde los trabajos iniciales de Gray en 1940 (Gray, 1940). La parada de los elementos celulares dañados en los puntos de control: i) promueve la reparación de las lesiones (Núñez *et al.*, 1995), o ii) provoca la derivación de las células hacia el programa irreversible de apoptosis (Siles *et al.*, 1998; Sheridan y West., 2001).

En este trabajo se ha procedido a establecer la distribución de los elementos formes de los esferoides MCF 7 en las distintas fases del ciclo celular para determinar si existen diferencias significativas que pudieran explicar la mayor radiosensibilidad encontrada para los esferoides previamente irradiados. La irradiación a dosis únicas de esferoides MCF7 da como resultado una acumulación de las células en fase S del ciclo celular 24 horas después del tratamiento, momento en el cual se administra la siguiente dosis según nuestro protocolo. No parece probable, no obstante, que sea la irradiación en esta fase concreta del ciclo celular la responsable de la mayor radiosensibilidad observada aunque no se puede descartar que de las células que sobreviven a una primera

dosis hay una proporción de células significativamente mayor en fases proliferativas y *a priori* más sensibles a la radiación que las que había antes de comenzar el tratamiento. Parece por tanto absolutamente necesario considerar también el proceso de regeneración celular tumoral que se produce inevitablemente a partir de los clonógenos celulares, que resultan indemnes o que recuperan su viabilidad gracias a la reparación que acontece durante el tiempo que separa a cada una de las fracciones de las dosis administradas. Numerosos resultados experimentales han coincidido en sugerir que el parámetro de radiosensibilidad de las células tumorales puede verse afectado por los factores antes mencionados y estas conclusiones han sido confirmadas en experimentos de partición de la dosis a lo largo del tiempo (Sham y Durand, 1998; 1999, Barendsen *et al.*, 2001).

En la literatura científica reciente se encuentran numerosos artículos que abordan desde un punto de vista experimental la investigación de las modificaciones en la cinética de proliferación celular que se producen tras irradiación. Parámetros como el tiempo potencial de duplicación (Tpot) (Murata *et al.*, 1996; Sham y Durand, 1999), el retraso en el crecimiento o los valores de las constantes que definen la ecuación de Gompertz son demostrativos de la influencia que cada fracción de dosis de radiación ejerce sobre las constantes que definen la dinámica del volumen de los tumores experimentales respecto del tiempo (Durand y Shem, 2000). Los fenómenos que rigen el proceso del incremento en el índice proliferativo durante el curso del tratamiento fraccionado con radiación pueden ser de origen diverso, pero no cabe duda que muchos de ellos son comunes a los mecanismos que controlan la proliferación celular en las estirpes tumorales en que los tumores se han desarrollado. Así, no es de extrañar que factores de crecimiento, expresión del producto proteico de genes supresores y hormonas tengan un papel crucial en la respuesta de adaptación del tumor a la muerte celular provocada por el tratamiento radioterápico.

En definitiva, nuestros resultados experimentales de protocolos de irradiación fraccionada sugieren que la estimación de la radiosensibilidad tumoral a dosis únicas de radiación puede, a pesar de su interés, ser insuficiente para la calificación de los tumores. Como se ha enunciado, la heterogeneidad tumoral, con poblaciones tumorales de diferente estirpe y grado de diferenciación puede ser un gran inconveniente a la hora

de estimar una respuesta de forma puntual. Por otra parte, la dinámica de la población celular tumoral y su adaptación en cuanto a términos de cinética proliferativa no puede ser considerada en el tipo de ensayo puntual. Tanto la heterogeneidad tumoral, que implica poblaciones con diferente sensibilidad a la radiación, como la dinámica de la respuesta celular al fraccionamiento de la dosis de radiación deberían ser investigados a la par que la radiosensibilidad intrínseca del tumor para incluirlo en los parámetros de decisión terapéutica tumoral. El modelo de esferoides multicelulares puede servir de ayuda a este propósito.

Conclusiones

6 CONCLUSIONES

El análisis de los resultados presentados en este trabajo junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes a la utilidad de los modelos tumorales para el estudio de la radiosensibilidad tumoral nos permiten concluir que:

1. El modelo representado por el cultivo de las células MCF-7 en suspensión formando agrupaciones celulares conocidas como esferoides multicelulares tiene unas cualidades en lo que respecta a: i) conformación globular de las células y sus núcleos, ii) contacto intercelular, iii) distribución en el ciclo mitótico celular, y iv) aporte de oxígeno y nutrientes, que lo hace similar a los primeros estadios del desarrollo tumoral *in vivo*.
2. Al igual que ocurre para las células MCF7 en cultivo en monocapa, el antiestrógeno tamoxifeno tiene un efecto inhibitorio, dependiente de la dosis, sobre el crecimiento de los esferoides MCF7. El tratamiento concomitante o secuencial estradiol/tamoxifeno revierte el efecto antiproliferativo del antiestrógeno.
3. La expresión del daño provocado por la radiación ionizante sobre los esferoides MCF7 puede evaluarse de formas muy distintas, similares a las

utilizadas en la investigación clínica en los estudios de radiosensibilidad, si bien es necesario elegir la metodología más apropiada, así como un correcto ajuste de los resultados para cada uno de los fenómenos investigados. En este sentido, se aportan dos procedimientos originales: i) La formación individual de los esferoides que permite una menor manipulación de los mismos y consigue una población de esferoides homogénea en su tamaño desde su inicio, con grupos experimentales similares para cada dosis y protocolo de irradiación elegido; ii) la aproximación teórica para la normalización a un volumen inicial común (VIC) que hace posible derivar los parámetros de crecimiento de los esferoides.

4. La derivación de los parámetros de radiosensibilidad tumoral a partir de los datos obtenidos mediante la simple observación del crecimiento de los esferoides MCF7 (retraso en el crecimiento, recrecimiento en monocapa y control tumoral) constituyen un método *limpio* desde un punto de vista experimental. Otra peculiaridad del sistema es que, si bien el número de esferoides necesarios no es muy grande, el tiempo de observación viene determinado por el rango de dosis de radiación. A mayor rango, y mayor dosis total administrada, mayor es el tiempo de observación requerido para disponer de datos de recrecimiento adecuados. Aplicando el procedimiento de ajuste aportado en esta Memoria se puede concluir que, los esferoides multicelulares una vez irradiados con un rango de dosis comprendida entre 0 y 6 Gy no recobran la cinética de crecimiento correspondiente a los esferoides Control al menos durante el tiempo de observación, esto se concreta en una disminución del parámetro A de la ecuación de Gompertz dependiente de la dosis.

5. Los procedimientos experimentales que requieren la manipulación del agregado celular (capacidad clonogénica, distribución celular en el ciclo mitótico) si bien suponen una alteración que puede afectar a la propia viabilidad celular y una gran laboriosidad técnica, constituyen un referente para cualquier otra aproximación a la sensibilidad a la radiación ionizante.

6. Las células MCF7 irradiadas formando esferoides multicelulares de tamaño comprendido entre 150-200 μm de diámetro son menos sensibles a la radiación que

las tratadas formando una monocapa. Los parámetros de radiosensibilidad estimados –valor de las constantes α , β del modelo lineal cuadrático y fracción de supervivencia a 2 Gy- a partir de los ensayos clonogénicos para monocapa y esferoides multicelulares, y de los ensayos de *cure* para esos últimos, así lo demuestra. Una tendencia idéntica ha podido ser demostrada tras la cuantificación del daño producido por la radiación a nivel del DNA en ambos modelos, el número de lesiones es menor en las células irradiadas como esferoides multicelulares respecto al que se produce cuando se tratan formando una monocapa. La explicación a estas diferencias en radiosensibilidad acepta varias alternativas: el menor grado de lesión molecular producido para igual dosis de radiación, las diferencias en eficiencia en la reparación de las lesiones, o la peculiar distribución celular en estadios proliferativos o no del ciclo celular.

7. Característica única del modelo de esferoides, distintiva y diferente de los cultivos en monocapa celular, es la utilidad para el estudio del fraccionamiento de dosis en radioterapia experimental. A este respecto, la información obtenida en los protocolos de fraccionamiento confirma la necesidad de un incremento de dosis total para conseguir un mismo efecto, pero a su vez sugiere un aumento de la radiosensibilidad tras dosis sucesivas que tiene una interesante interpretación en radiobiología clínica. La explicación a este fenómeno podría descansar tanto sobre el acúmulo de lesiones potencialmente letales, no reparadas entre fracciones como estar relacionada con los fenómenos de reclutamiento y sincronismo celular radioinducidos puesto de manifiesto en los esferoides.

8. El protocolo experimental más adecuado para determinar la radiosensibilidad de los esferoides o de muestras tumorales *in vivo* requiere las siguientes consideraciones: i) irradiación a dosis con significación clínica: 1-5 Gy, ii) tiempo entre dosis que permitan la reparación completa y se minimice el reclutamiento y la regeneración acelerada. iii) empleo de esferoides de pequeño tamaño (<200 μm) en los que no se evidencien fenómenos de hipoxia celular.

Bibliografía

7 BIBLIOGRAFÍA

Ahn SY, Nevaldine B, Hahn PJ. Direct measurement by pulse-field gel electrophoresis of induction and rejoining of X-ray induced double-strand breaks in cultured mouse cells. *Int J Radiat Biol.* 59 (3): 661-675 (1991).

Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland RM. Spheroids in cancer research. Methods and perspectives. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 116-133 (1984).

Alsbeih MG, Fertil B, Badie C, Malaise EP. The beta component of human cell survival curves and its relationship with split-dose recovery. *Int. J. Radiat Biol* 67 (4): 453-60 (1995).

Bache M, Pigorsch S, Dunst J, Wurl P, Meye A, Bartel F, Schmidt H, Rath FW, Taubert H. Loss of G2/M arrest correlates with radiosensitization in two human sarcoma cell lines with mutant p53. *Int J Cancer.* 20; 96(2): 110-7 (2001).

Barendsen GW, Van Bree C, Franken NA. Importance of cell proliferative state and potentially lethal damage repair on radiation effectiveness: implications for combined tumor treatments (review). *Int. J. Oncol.* 19 (2): 247-56 (2001).

Beaupin R, Provost G, Mainguené C, Lainé-Bidron C, Tamboise A, Tamboise E. Continuous Three-dimensional cultures of MCF7 cells in serum free medium. *In vitro*. 29: 983-898 (1993).

Becerra D. Efecto modulador de estrógenos y antiestrógenos sobre la radiosensibilidad de líneas celulares de cáncer de mama. Tesis Doctoral (2002).

Biade S, Stobbe CC, Boyd JT, Chapman JD. Chemical agents that promote chromatin compaction radiosensitize tumour cells. *Int J Radiat Biol*. 77(10):1033-42 (2001).

Bjork-Eriksson T, West C, Karlsson E, Mercke C. Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1;46(1):13-9 (2000).

Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer*. 33: 1075-1107 (1997).

Brahme A. Optimized radiation therapy based on radiobiological objectives. *Semin Radiat Oncol*. 9 (1): 35-47 (1999).

Brahme A. Individualizing cancer treatment: biological optimization models in treatment planning and delivery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 49(2): 327-37 (2001).

Bristow RG, Hill RP. Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse in murine tumor cell lines. II: In vivo radioresponse following fractionated treatment and in vitro/in vivo correlations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 18(2): 331-45 (1990).

Brock WA, Baker FL, Peters LJ. Radiosensitivity of human head and neck squamous cell carcinomas in primary culture and its potential as a predictive assay of tumor radiocurability. *Int J Radiat Biol*. 56(5): 751-60 (1989).

Buffa FM, Davidson SE, Hunter RD, Nahum AE, West CM Incorporating biologic measurements (SF(2), CFE) into a tumor control probability model increases their

prognostic significance: a study in cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Int J. Radiat. Oncol Biol Phys.* 50(5): 1113-1122 (2001).

Burow ME, Weldon CB, Chiang TC, Tang Y, Collins-Burow BM, Rolfe K, Li S, McLachlan JA, Beckman BS. Differences in protein kinase C and estrogen receptor alpha, beta expression and signaling correlate with apoptotic sensitivity of MCF-7 breast cancer cell variants. *Int J Oncol.* 16(6): 1179-87 (2000).

Carlsson J, Nilsson K, Westermark B, Ponten J, Sundstrom C, Larsson E, Bergh J, Pahlman S, Busch C, Collins VP. Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *Int J Cancer.* 15; 31(5): 523-33 (1983).

Carlsson J, Stalnacke CG, Acker H, Haji-Karim M, Nilsson S, Larsson B. The influence of oxygen on viability and proliferation in cellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 5(11-12): 2011-20 (1979).

Carmichael J, Degraff WG, Gamson J, Russo D, Gazdar AF, Levitt ML, Minna JD, Mitchell JB. Radiation sensitivity of human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 25(3): 527-34 (1989).

Casciari JJ, Sotirchos SV, Sutherland RM. Glucose diffusivity in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 15; 48(14):3905-9 (1988).

Cassinelli G, Supino R, Perego P, Polizzi D, Lanzi C, Pratesi G, Zunino F. A role for loss of p53 function in sensitivity of ovarian carcinoma cells to taxanes. *Int J Cancer.* 1; 92(5): 738-47 (2001).

Cerrato JA, Yung WK, Liu TJ. Introduction of mutant p53 into a wild-type p53-expressing glioma cell line confers sensitivity to Ad-p53-induced apoptosis. *Neuro-oncol*3(2): 113-22 (2001).

Chignola R, Foroni R, Candiani C, Franceschi A, Pasti M, Stevanoni G, Anselmi C, Tridente G, Colombatti M. Cytoreductive effects of anti-transferrin receptor immunotoxin in a multicellular tumor spheroid model. *Int J Cancer.* 15; 57(2): 268-74 (1994).

Chignola R, Schenetti A, Andrighetto G, Chiesa E, Foroni R, Sartoris S, Tridente G, Liberati D. Forecasting the growth of multicell tumour spheroids: implications for the dynamic growth of solid tumours. *Cell Prolif.* 33(4): 219-29 (2000).

Cohen A y Cohen L. Estimation of the cellular lethal dose and the critical cell number for the C3H mouse mamary carcinoma from radiosnsitivity studies in vivo. *Nature* 185: 262-263 (1960).

Cook VE y Mortimer RK. A quantitative model of DNA fragments generated by ionizing radiation, and possible experimental applications. *Radiat Res.* 125(1):102-6 (1991).

Curtis SB. Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation –a unified repair model. *Radiat Res.* 106: 252-270 (1986).

Dahlberg WK, Azzam EI, Yu Y, Little JB. Response of human tumor cells of varying radiosensitivity and radiocurability to fractionated irradiation. *Cancer Res.* 15; 59(20): 5365-9 (1999).

Dale RG, Fowler JF, Jones B. A new incomplete-repair model based on a 'reciprocal-time' pattern of sublethal damage repair. *Acta Oncol.* 38(7): 919-29 (1999).

Dasu A, Denekamp J. Inducible repair and radiosensitivity a complex but predictable relationship?. *Radiat Res.* 153(3): 279-88 (2000).

Deacon J, Peckham MJ, Steel GG. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiotherapy and Oncology.* 2: 317-323 (1984).

Del Moral R, Fernandez JC, Lopez-Gonzalez JD, Gomez M, Ruiz de Almodovar JM, Olea N, Pedraza V. Kinetics of cellular proliferation and hormonal receptors in EVSA-T breast cancer cell line. *Rev Esp Fisiol.* 47(1): 25-30 (1991).

Del Moral R, López ME, Núñez MI, Oliver FJ, Valenzuela MT, Villalobos M y Ruiz de Almodóvar JM. Interactions between radiotherapy and endocrine therapy in breast cancer. *Endocrine-related Cancer.* 9 197-205 (2002).

- Dertinger H y Hulser D.** Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction. *Radiat Environ Biophys.*19(2): 101-7 (1981).
- Dewey WC y Humphrey RM.** Increase in radiosensitivity to ionizing radiation related to replacement of thymidine in mammalian cells with 5-bromodeoxyuridine. *Radiat Res.* 26(4): 538-53 (1965).
- Djordjevic, B, Lange CS, Rotman M, torres C Zihwa Z.** Increasing radiosensitivity in the course of fractionated X irradiation: the effect of contact with dead and dying cells. *Radiation Research.* 150(3): 275-282 (1998).
- Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL.** Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 10(2): 179-86 (2003).
- Durand RE.** Multicell spheroids as a model for cell kinetic studies. *Cell Tissue Kinet.* 23(3): 141-59 Review (1990).
- Durand RE.** Cell Kinetics and Repopulation During Multifraction Irradiation of Spheroids: Implications for Clinical Radiotherapy. *Semin Radiat Oncol.* 3(2): 105-114 (1993).
- Durand RE y Olive PL.** Radiation-induced DNA damage in V79 spheroids and monolayers. *Radiat Res.* 78(1): 50-60 (1979).
- Durand RE y Olive PL.** Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three-dimensional architecture of solid tumors and spheroids. *Methods in cell biology.* 64: 211-229 (2001).
- Durand RE y Sutherland RM.** "Radiation studies with spheroids. En: Recent results in cancer research. Spheroids in cancer research. Editado por: Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland RM. Berlín: Springer-Verlag, (1984).
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG).** Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, systemic or immune therapy: 133

randomized trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet*. 339: 1 (1992).

Eastham AM, Atkinson J, West CM. Relationships between clonogenic cell survival, DNA damage and chromosomal radiosensitivity in nine human cervix carcinoma cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 77 (3): 295-302 (2001).

Eschwege F, Bourhis J, Girinski T, Lartigau E, Guichard M, Deble D, Kepta L, Wilson GD, Luboinski B. Predictive assays of radiation response in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a review of the Institute Gustave Roussy experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1; 39(4): 849-53 (1997).

Fertil B y Malaise EP. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 7(5): 621-9 (1981).

Fertil B y Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 11(9): 1699-707 (1985).

Foster JS, Henley DC, Ahamed S, Wimalasena J. Estrogens and cell-cycle regulation in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 12(7): 320-7. Review (2001).

Fowler JF. The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy. *Br J Radiol.* 62(740): 679-94. Review. (1989).

Fowler JF. Repair between dose fractions: a simpler method of analyzing and reporting apparently biexponential repair. *Radiat Res.* 158(2):141-51 (2002).

Frank C, Weber KJ, Fritz P, Flentje M. Increased dose-rate effect in V79-multicellular aggregates (spheroids). Relation to initial DNA lesions and repair. *Radiother Oncol.* Mar. 26(3): 264-70 (1993).

Geldof AA, Plaizier MA, Duivenvoorden I, Ringelberg M, Versteegh RT, Newling DW, Teule GJ. Cell cycle perturbations and radiosensitization effects in a human prostate cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol.* 129(3):175-82. (2003).

- Gilbert CW.** A double minus log transformation of mortality probabilities. *Int. J. Radiat. Biol.* 25: 633-634 (1974).
- Girinsky T, Cosset JM.** Tumor radiosensitivity tests: state of assays in 1998 *Cancer Radiother.* 2(5): 530-3 (1998).
- Gompertz B.** On the nature of the function expressive of the law of human mortality and on a new model of determining life contingencies. *Philos Trans R Soc.* 115: 513-85 (1825).
- Gordon DJ, Milner AE, Beaney RP, Grdina DJ, Vaughan AT.** Cellular radiosensitivity in V79 cells is linked to alterations in chromatin structure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19(5): 1199-201 (1990).
- Gorlach A y Acker H.** pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. *Biochim Biophys Acta.* 1227(3): 105-12 (1994).
- Guirado D, Aranda M, Vilches M, Villalobos M, Lallena AM.** Dose dependence of the growth rate of multicellular tumour spheroids after irradiation. *Br J Radiol.* 76(902):109-16 (2003).
- Gura T.** Systems for identifying new drugs are often faulty. *Science.* 1997; 278 (53409): 1041-2 (1997).
- Gutman M, Couillard S, Labrie F, Candas B, Labrie C.** Effect of treatment sequence with radiotherapy and the antiestrogen EM 800 on the growth of ZR 75 1 human mammary carcinoma in nude mice. *Int J Cancer.* 10; 103(2): 268-76 (2003).
- Haimovitz-Friedman A, Vlodavsky I, Chaudhuri A, Witte L, Fuks Z.** Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. *Cancer Res.* 15; 51(10): 2552-8. (1991).
- Hamilton G.** Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett.* 11;131(1): 29-34. Review (1998).
- Hankey B, Brinton L, Kessler L, et al,** En: Miller B, Ries L, Hankey B, et al. Eds. *SEER Cancer Statistics. Review 1973-1990.* National Instituts (1990).

Hawkins RB. Survival of a mixture of cells of variable linear-quadratic sensitivity to radiation. *Radiat Res.* 153(6): 840-3 (2000).

Herceg Z, Wang Z. Functions of poly(ADP-ribose)polymnerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res.* 477 (1-2): 97-110 (2001).

Hill SA y Denekamp J. An experimental study of tumour size and radiosensitivity: analysis by regrowth delay. *Radiother Oncol* May.15(1): 39-48 (1989).

Hoffman RM. In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. *J Clin Lab Anal.* 5(2):133-43, Review (1991).

Hsu TC. The future of animals, cells, models and systems in research development, education and testing. *Natl. Acad. Sci. Washington, D.C.* (1977).

Illiakis GE, Metzger L, Denko N, Stamoto TD. Detectopm pf DNA double-strand bresks in synchronous cultures of CHO cells by means of asymmetric field inversion gel electroforesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 59: 321-341 (1991).

Iwadate Y, Mizoe J, Osaka Y, Yamaura A, Tsujii H. High linear energy transfer carbon radiation effectively kills cultured glioma cells with either mutant or wild-type p53. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 50(3): 803-8 (2001).

Jones C, Payne J, Wells D, Delhanty JD, Lakhani SR, Kortenkamp A. Comparative genomic hybridization reveals extensive variation among different MCF-7 cell stocks. *Cancer Genet Cytogenet.* 117(2): 153-8 (2000).

Katzenellenbogen B.S. y Norman M.J. Multihormonal regulation of the progesterone receptor in MCF-7 human breast cancer cells: interrelationships among insulin/insulin-like growth factor-I, serum, and estrogen. *Endocrinology* 126(2):891-8 1990. Erratum in: *Endocrinology.* 1990; 126(6): 3217 (1990).

Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 20; 83(2): 173-80 (2003).

Kemp LM, Sedgwick SG, Jeggo PA. X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells defective in double-strand break rejoining. *Mutat Res.* 132(5-6): 189-96 (1984).

Koester SK, Maenpaa JU, Wiebe VJ, Baker WJ, Wurz GT, Seymour RC, Koehler RE, DeGregorio MW. Flow cytometry: potential utility in monitoring drug effects in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 32(1): 57-65. Review (1994).

Kummermehr JC. Tumour stem cells--the evidence and the ambiguity. *Acta Oncol.* 40(8): 981-8. Review (2001).

Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int.* 23(3):157-61 (1999).

Kuwashima Y, Majima H, Okada S. Cure, cell killing, growth delay and fragmentation of X-irradiated human melanoma HMV-I multicellular spheroids. *Int. J. Radiat. Biol.* 54(1) 91-104: 82-87 (1988).

Kwok TT y Sutherland RM. The influence of cell-cell contact on radiosensitivity of human squamous carcinoma cells. *Radiat Res.* 126(1): 52-7 (1991).

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J. Clin.* 49: 831 (1999).

Li CK. The role of glucose in the growth of 9L multicell tumor spheroids. *Cancer.* 15; 50(10): 2074-8 (1982).

Li Z, Xia L, Lee LM, Khaletskiy A, Wang J, Wong JY, Li JJ. Effector genes altered in MCF-7 human breast cancer cells after exposure to fractionated ionizing radiation. *Radiat Res.* 155(4): 543-53 (2001).

López E, Nuñez MI, Guerrero MR, del Moral R, de Dios Luna J, del Mar Rodríguez M, Valenzuela MT, Villalobos M, Ruiz de Almodovar JM. Breast cancer acute radiotherapy morbidity evaluated by different scoring systems. *Breast Cancer Res Treat.* 73(2): 127-34 (2002).

Lotem J, Gal H, Kama R, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Sachs L, Givol D. Inhibition of p53-induced apoptosis without affecting expression of p53-regulated genes

Proc Natl Acad Sci U S A (2003).

Malaise EP, Fertil B, Deschavanne PJ, Chavaudra N, Brock WA. Initial slope of radiation survival curves is characteristic of the origin of primary and established cultures of human tumor cells and fibroblasts.. *Radiat Res.* 111(2): 319-33 (1987).

Malinen E, Freykowski S, Kummermehr J. Regrowth delay analysis of irradiated tumors in the curative dose region.*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;46(1): 173-7 (2000).

McMillan TJ, Cassoni AM, Edwards S, Holmes A, Peacock JH. The relationship of DNA double-strand break induction to radiosensitivity in human tumour cell lines. *Int J Radiat Biol.* 58(3): 427-38 (1990).

McMillan TJ, Tobi S, Mateos S, Lemon C. The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;49(2): 373-7 (2001).

Matthews JH, Meeker BE, Chapman JD. Response of human tumor cell lines in vitro to fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 16(1): 133-8 (1989).

Moore JV y Hendry JH. Relationship of clonogenic cells and “tumor-rescuing cells” modelled in irradiated spheroid in vitro. *Br.J. Radiol.* 57:935-937 (1984).

Moore JV, West CM, Hendry JH. Deriving cell survival curves from the overall responses of irradiated tumours: analysis of published data for tumour spheroids *Br J Cancer.* 56(3): 309-148 (1987).

Moussa H, Mitchell SA, Grénman R, Joiner MC Cell-cell contact increases radioresistance in head and neck carcinoma cell lines. *Int J Radiat Biol* 76: 1245-1253 (2000).

Mueller-Kliesser WF Multicellular spherids, a review on cellular aggregates in cancer research. *J. Cancer. Res. Clin: Oncol.* 113: 101-122 (1987).

Mueller-Klieser WF, Sutherland RM. Oxygen tensions in multicell spheroids of two cell lines. *Br J Cancer.* 45(2):256-64 (1982).

Murata R, Nishimura Y, Shibamoto Y, Hiraoka M, Abe M.Changes in cell proliferative parameters of SCCVII and EMT6 murine tumors after single-dose

irradiation. *Jpn J Cancer Res.* 87(6):662-8 (1996).

Niederhuber JE. Colon and rectum cancer. Patterns of spread and implications for workup. *Cancer.* 15; 71(12 Suppl): 4187-92. Review (1993).

Norton L. A gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Research.* 48: 7067-7071(1988).

Nuñez MI, Villalobos M, Olea N, Valenzuela MT, Pedraza V, McMillan TJ, Ruiz de Almodovar JM. Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumour cells. *Br J Cancer.* 71(2): 311-6 (1995).

Nuñez MI, Guerrero MR, Lopez E, del Moral MR, Valenzuela MT, Siles E, Villalobos M, Pedraza V, Peacock JH, Ruiz de Almodovar JM. DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin human cells. *Int J Cancer.* 76(3): 354-61 (1998).

Olea N, Sakabe K, Soto AM, Sonnenschein C. The proliferative effect of "anti-androgens" on the androgen-sensitive human prostate tumor cell line LNCaP. *Endocrinology.* 126(3): 1457-63 (1990).

Olea N, Villalobos M, Nunez MI, Elvira J, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. Evaluation of the growth rate of MCF-7 breast cancer multicellular spheroids using three mathematical models. *Cell Prolif.* 27(4): 213-23 (1994).

Olea N, Villalobos M, Nuñez MI, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. MCF-7 Breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: Effect of 17 β -estradiol. *Int. J. Cancer.* 50: 112-117 (1992).

Olea N, Villalobos M, Thomas J, Lopez-Gonzalez JD, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. Proliferation kinetics of MCF-7 cell cultures. II. Synchronization and cell recruitment induced by hormones. *Rev Esp Fisiol.* 43(2): 215-21. (1987).

Olive PL. Radiation-induced reoxygenation in the SCCVII murine tumour: evidence for a decrease in oxygen consumption and an increase in tumour perfusion. *Radiother Oncol.* 32(1): 37-46 (1994).

Olive PL y Durand RE. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* 13(2): 121-38 (1994).

Olive PL, Vikse CM, Vanderbyl S. Increase in the fraction of necrotic, not apoptotic, cells in SiHa xenograft tumours shortly after irradiation. *Radiother Oncol.* 50(1): 113-9. (1999).

Oliver F.J. Menissier-de Murcia J, De Murcia G. Poly (ADP-ribose) polymerase in DNA damage response, apoptosis and diseases. *Am.J.Human Genetics* 64:1282-1288 (1999).

Oloumi A, Lam W, Banath JP, Olive PL. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int J Radiat Biol.* 78(6): 483-92 (2002).

Osborne CK, Boldt DH, Clark GM, Trent JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer Res.* 43(8): 3583-5 (1983).

Osborne CK, Boldt DH, Estrada P. Human breast cancer cell cycle synchronization by estrogens and antiestrogens in culture. *Cancer Res.* 44(4): 1433-9 (1984).

Ozawa T, Wang J, Lamborn KR, Deen DF. Radiation-induced DNA double-strand breaks and rejoining malignant glioma cells. *Int. J. Radiat Biol.* 75 (5): 563-570 (1999).

Peters LJ, Withers HR. Applying radiobiological principles to combined modality treatment of head and neck cancer--the time factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1; 39(4): 831-6. Review (1997).

Podczec F, Newton JM. A shape factor to characterize the quality of spheroids. *J Pharm Pharmacol.* 46(2): 82-5 (1994).

Popanda O, Ebbeler R, Twardella D, Helmbold I, Gotzes F, Schmezer P, Thielmann HW, von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Wenz F, Bartsch H, Chang-Claude J. Radiation-induced DNA damage and repair in lymphocytes from breast cancer patients and their correlation with acute skin reactions to radiotherapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1; 55(5): 1216-25 (2003).

Pospiech H, Rytönen AK, Syväoja JE The role of DNA polymerase activity in human non-homologous end joining *Nucl Acids Res.* 29:3277-88 (2001).

Pourreau-Schneider N, Berthois Y, Mittre H, Charpin C, Jacquier J y Martin PM. Estrogen response of MCF-7 cells grown on diverse substrates and in suspension culture : promotion of morphological heterogeneity, modulation of progesterone receptor induction : cell-substrate interactions on collagen gels. *J. Steroid. Biochem.* 21: 763-771 (1984).

Pourreau-Schneider N, Martin PM, Charpin C, Jacquier J, Saez S y Nandi S. How culture conditions modulate the morphofunctional differentiation of the estradiol-sensitive mammary cell line differentiation of the estradiol-sensitive mammary cell line (MCF-7). *J. steroid Biochem.* 20: 407-415 (1984).

Price ME, McKelvey-Martin VJ, Robson T, Hirst DG, McKeown SR. Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in bladder tumor cells. *Radiat Res.* 153(6): 788-94 (2000).

Radford IR. Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 49(4) :611-20 (1986).

Riccalton-Banks L, Liew C, Bhandari R, Fry J, Shakesheff K. Long-term culture of functional liver tissue: three-dimensional coculture of primary hepatocytes and stellate cells. *Tissue Eng. Jun.* 9(3) :401-10 (2003).

Rigaard K, Spang-Thomsen M. Quantitation and Gompertzian analysis of tumor growth. *Breast Cancer Res Treat.* 46: 303-312 (1997).

Rofstad EK. Growth and radiosensitivity of malignant melanoma multicellular spheroids initiated directly from surgical specimens of tumours in man *Br J Cancer.* 54(4): 569-78 (1986).

Rofstad EK, Eide K, Skoyum R, Hystad ME, Lyng H. Apoptosis, energy metabolism, and fraction of radiobiologically hypoxic cells: a study of human melanoma multicellular spheroids. *Int J Radiat Biol.* 70(3): 241-9 (1996).

Ruibal Morell A. Prostatic cancer: biological aspects of clinical interest] *Med Clin (Barc)*. 21; 99(17):664-7. Review (1992)

Ruiz de Almodovar JM, Guirado D, Núñez MI, López E, Guerrero R, Valenzuela MT, Villalobos M, del Moral R. Individualization of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity. *Radiother Oncol*. 62(3): 327-33 (2002).

Ruiz de Almodóvar JM, Steel GG, Whitaker SJ, McMillan TJ. A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol*. 65(6): 641-9 (1994).

Russo J, Bradley RH, McGrath C: Scanning and transmission electron microscopy study of a human breast carcinoma cell line (MCF 7) cultured in collagen-coated cellulose sponge. *Cancer Res*. 37: 2004-14 (1977).

Sak A, Stuschke M, Wurm R, Budach V. Protection of DNA from radiation-induced double-strand breaks: influence of replication and nuclear proteins *Int J. Radiat Biol* 76: 749-756 (2000).

Sakata K, Okada S, Majima h, Suzuki N. Linear quadratic model of radiocurability on multicellular spheroids of human lung adenocarcinoma LCTI and mouse fibrosarcoma FSA. *Int J Radiat Biol*. 61(2): 269-274 (1992).

Sakata K, Suzuki N, Majima H, Okada S. Further application and evaluation of critical cell number and modifying factors in radiocurability of multicellular spheroids. *J Radiat Res (Tokyo)*.36(1):17-30 (1995).

Santini MT, Rainaldi G. Indovinas PL Multicellular tumour spheroids in radiation biology. *Int J Radiat Biol* 75: 1787-799 (1999).

Sarkaria JN, Miller EM, Parker CJ, Jordan VC, Mulcahy RT. 4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, does not alter the radiation sensitivity of MCF-7 breast carcinoma cells irradiated in vitro. *Breast Cancer Res Treat*. 30(2): 159-65 (1994).

Schwachofer JH, Crooijmans RP, van Gasteren JJ, Hoogenhout J, Jerusalem CR, Kal HB, Theeuwes AG. Radiosensitivity of different human tumor cells lines grown as multicellular spheroids determined from growth curves and survival data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 17(5):1015-20 (1989).

Schwachofer JH, Crooijmans RP, Hoogenhout J, Jerusalem CR, Kal HB, Theeuwes AG. Radiosensitivity of human melanoma spheroids influenced by growth rate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19(5): 1191-7 (1990).

Schwartz JL, Mustafi R, Beckett MA, Weichselbaum RR. DNA double-strand break rejoining rates, inherent radiation sensitivity and human tumour response to radiotherapy. *Br J Cancer.* 74(1): 37-42 (1996).

Sham E y Durand R. Cell kinetics and repopulation mechanisms during multifraction irradiation of spheroids. *Radiotherapy and Oncology.* 46: 201-307 (1998).

Sham E y Durand R. Repopulation characteristics and cell kinetic parameters resulting from multifraction irradiation of xenograft tumors in SCID mice. *Int J Radiation Oncology Phys.* 43: 3617-622 (1999).

Sheridan MT, West CM. Ability to undergo apoptosis does not correlate with the intrinsic radiosensitivity (SF2) of human cervix tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1;50(2):503-9. (2001).

Siles E, Villalobos M, Jones L, Guerrero R, Eady JJ, Valenzuela MT, Nunez MI, McMillan TJ, Ruiz de Almodovar JM. Apoptosis after gamma irradiation. Is it an important cell death modality? *Br J Cancer.* 78(12):1594-9 (1998).

Siles E, Villalobos M, Valenzuela MT, Nunez MI, Gordon A, McMillan TJ, Pedraza V, Ruiz de Almodovar JM. Relationship between p53 status and radiosensitivity in human tumour cell lines. *Br J Cancer.* 73(5): 581-8 (1996).

Sinclair WK. Cell cycle dependence of the lethal radiation response in mamalian cells. *Curr Top Radiat Res.* 7: 264-285 (1972).

Sinclair WK, Morton RA. Survival and recovery in X-irradiated synchronized Chinese hamster cells. *Cellular Radiation Biology*, Baltimore MD, Williams and Wilkins Co. 418 (1965).

Sminia P, Acker H, Eikesdal HP, Kaaijk P, Enger P, Slotman B, Bjerkvig R. Oxygenation and response to irradiation of organotypic multicellular spheroids of human glioma. *Anticancer Res.* 23(2B):1461-6 (2003).

Smith TR, Miller MS, Lohman KK, Case LD, Hu JJ. DNA damage and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 24(5): 883-9 (2003).

Sonnenschein C, Papendorp JT, Soto AM. Estrogenic effect of tamoxifen and its derivatives on the proliferation of MCF7 human breast tumor cells. *Life Sci.* 29; 37(4):387-94 (1985).

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51(5): 1409-16 (1973).

Spratt JS, Spratt JA. Cancer of the breast. Growth rates. *Major Probl Clin Surg.* 5: 197-220. Review. (1979).

Steeg PS, Alley MC, Grever MR. An added dimension: will three-dimensional cultures improve our understanding of drug resistance? *J Natl Cancer Inst.* 6;86(13):953-5 (1994).

Steel GG. Recovery kinetics deduced from continuous low dose-rate experiments. *Radiother Oncol.* 14(4): 337-43 (1989).

Steel G.G. Introduction: the significance of radiobiology for radiotherapy in: *Basic clinical radiobiology.* Second edition, Arnold, 1-7, (1997).

Stewart RD. Two-lesion kinetic model of double-strand break rejoining and cell killing *Radiat Res* 156 (4):365-78 (2001).

Stobbe CC, Park SJ, Chapman JD. The radiation hypersensitivity of cells at mitosis. *Int J Radiat Biol.* 78(12): 1149-57 (2002).

- Stuschke M, Budach V, Klaes W, Sack H.** Radiosensitivity, repair capacity, and stem cell fraction in human soft tissue tumors: an in vitro study using multicellular spheroids and the colony assay. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 23(1): 69-80 (1992).
- Stuschke M, Budach V, Stuben G, Streffer C, Sack H.** Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines: studies in a three-dimensional model system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15; 32(2): 395-408 (1995).
- Sutherland BM, Bennett PV, Cintron-Torres N, Hada M, Trunk J, Monteleone D, Sutherland JC, Laval J, Stanislaus M, Gewirtz A.** Clustered DNA damages induced in human hematopoietic cells by low doses of ionizing radiation. *J Radiat Res (Tokyo).* 43 Suppl: S149-52 (2002).
- Sutherland BM, Bennett PV, Sidorkina O, Laval J.** Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. *Biochemistry.* 11; 39(27): 8026-31 (2000).
- Suwinski R, Taylor J.M.G., Withers H.R.** The effect of heterogeneity in tumor cell kinetics on radiation dose response. An exploratory investigation of a plateau effect. *Radiotherapy and Oncology.* 50 57-66 (1999).
- Tarnawski R, Kummermehr J, Trott K-R.** The radiosensitivity of recurrent clones of an irradiated murine squamous cell carcinoma in the in vitro megacolony system. *Radiotherapy and Oncology.* 46: 209-214 (1998).
- Thames HD, Rozell ME, Tucker SL Fisher DR, Travis EL:** Direct analysis of quantal radiation response data. *Int J Radiat Biol.* 49: 999-1009 (1986).
- Tonn JC, Kerkau S, Hanke A, Bouterfa H, Mueller JG, Wagner S, Vince GH, Roosen K.** Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro. *Int J Cancer.* 1; 80(5): 764-72 (1999).
- Trott KR.** Cell repopulation and overall treatment time. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 19(4): 1071-5. Review. (1990).

Tsukikawa S, Matsuoka H, Kurahashi Y, Konno Y, Satoh K, Satoh R, Isogai A, Kimura K, Watanabe Y, Nakano S, Hayashi J, Kubota S. A new method to prepare multicellular spheroids in cancer cell lines using a thermo-reversible gelation polymer. *Artif Organs.* 27(7): 598-604 (2003).

Tubiana M. Cancers caused by therapeutic noxae: cancer and radiotherapy] *Bull Cancer.*70(1): 47-54 (1983).

Tubiana M. The role of local treatment in the cure of cancer. *Eur. J. Cancer.* 28^a: 2061-2069 (1992).

Valenzuela MT, Galisteo R, Zuluaga A, Villalobos M, Nunez MI, Oliver FJ, Ruiz de Almodovar JM. Assessing the use of p16(INK4a) promoter gene methylation in serum for detection of bladder cancer. *Eur Urol.* 42(6): 622-8; discussion 628-30 (2002).

Villalobos M. Modelos tumorales en oncología: Los esferoides multicelulares en el estudio del cáncer hormodependiente. Tesis doctoral (1990).

Villalobos M, Aranda M, Núñez, MI, Becerra D, Olea N, Ruiz de Almodóver JM y Pedraza V. Interaction between ionizing radiation and estrogens and antiestrogens as modifiers of tumor microenvironment in estrogen dependent multicellular spheroids. *Acta Oncol.* 34: 413-417 (1995).

Villalobos M, Becerra D, Núñez MI, Valenzuela T, Siles E, Olea n, Pedraza V, Ruiz de Almodóvar JM. Radiosensitivity of human breas cancer cell lines of different hormonal responsiveness. Modulatory effects of estradiol. *Int. J. Radiat. Biol.* 38: 2865-2873 (1996).

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Olea-Serrano MF, Ruíz de Almodóvar JM, Pedraza V. The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ Health Perspect.* 103 (9): 844-50 (1995).

Villalobos M, Olea N, Gorgojo L, Lopez-Gonzalez JD, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. Proliferation kinetics of MCF-7 cell cultures. I. Relative influence of estrogens and antiestrogens on the growth of the cell population. *Rev Esp Fisiol.* 43(2): 209-14 (1987).

Von Hoff DD. Phase I clinical trials with fludarabine phosphate. *Semin Oncol.* Oct;17 (5 Suppl 8):33-8. Review (1990).

Wada S, Kurahayashi H, Kobayashi Y, Funayama T, Yamamoto K, Natsuhori M, Ito N. The Relationship between Cellular Radiosensitivity and Radiation-Induced DNA Damage Measured by the Comet Assay. *J Vet Med Sci.* 65(4): 471-7 (2003).

Wazer DE, Tercilla OF, Lin PS, Schmidt-Ullrich R. Modulation in the radiosensitivity of MCF-7 human breast carcinoma cells by 17 β -estradiol and tamoxifen. *Br J Radiol.* 62(744): 1079-83 (1989).

Wazer DE, Joyce M, Jung L, Band V. Alterations in growth phenotype and radiosensitivity after fractionated irradiation of breast carcinoma cells from a single patient. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 30;26(1):81-8 (1993).

Wheldon TE, Livingstone A, Wilson L, O'Donoghue J, Gregor A. The radiosensitivity of human neuroblastoma cells estimated from regrowth curves of multicellular tumour spheroids. *Br J Radiol.* 58(691): 661-4 (1985).

West CM Invited review: intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy *Br J Radiol.* 68(812): 827-37 (1995).

West CM y Hendry JH. Intrinsic radiosensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy. *BJR Suppl.* 24: 146-52 (1992).

Whitaker SJ, McMillan TJ. Pulsed-field gel electrophoresis in the measurement of DNA double-strand break repair in xrs-6 and CHO cell lines: DNA degradation under some conditions interferes with the assessment of double-strand break rejoining. *Radiat Res.* 130(3): 389-92 (1992).

Whitaker SJ, Ung YC, McMillan TJ. DNA double-strand break induction and rejoining as determinants of human tumour cell radiosensitivity. A pulsed-field gel electrophoresis study. *Int J Radiat Biol.* 67(1): 7-18 (1995).

Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncol.*;27(2):131- 46 (1988).

Withers HR. Treatment-Induced Accelerated Human Tumor Growth. *Semin Radiat Oncol.* 3(2): 135-143 (1993).

Woudstra EC, Roesink JM, Rosemann M, Brunsting JF, Driessen Ort n T, Konings AW, Peacock JH, Kampinga HH. Chromatin structure and cellular radiosensitivity: a comparison of two human tumour cell lines. *Int. J. Radiat Biol.* 70: 693-703 (1996).

Woudstra EC, Driessen C, Konings AW, Kampinga HH. DNA damage induction and tumour cell radiosensitivity: PFGE and halo measurements. *Int J Radiat Biol.* 73(5): 495-502 (1998).

Yuh as JM, Tarlenton AE, Molzen KB. Multicellular tumor spheroids formation by breast cancer cells isolated from different sites. *Cancer Res.* 36:3639-3643 (1978).

Yuh as JM y Li AP. Growth fraction as the major determinante of multicellular tumor spheroids growth rates. *Cancer Res.* 38: 1528-1532 (1978).