

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1 MAR. 1994

COMISION DE EXAMEN ORAL

Prov. T/21-2

T
13
97

Departamento de Radiología y Medicina Física

Facultad de Medicina. Universidad de Granada

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 8-3-94
ENTRADA NUM. 370

TESIS DOCTORAL

**LA RUPTURA DOBLE DE CADENA DE DNA
COMO TEST PREDICTIVO DE RADIOSENSIBILIDAD**

María Isabel Núñez Torres

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>61965411X</u>
Nº Copia <u>121199383</u>

Granada, Abril 1994

María Isabel Núñez Torres

A J. Andrés y a mis padres

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (beca del Plan Nacional de Formación de Personal Investigador, PN90 26206833), por la CICYT a través del proyecto SAL89/1115, por la DGICT mediante el programa de acciones integradas hispano-británicas (HB-250) y por la Junta de Andalucía (grupo de investigación con nº 3157).

AGRADECIMIENTOS

Una vez concluido este trabajo de investigación quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas me han ayudado de alguna forma a la realización del mismo.

En primer lugar a mis directores de Tesis, D. Vicente Pedraza Muriel por haber supervisado mi trabajo de forma tan detallada permitiendo así la realización del mismo; y a D. J. Mariano Ruiz de Almodóvar por el tiempo dedicado a esta Tesis que me ha servido no sólo para la excelente planificación del trabajo, sino también para la interpretación de los resultados obtenidos del mismo, contar con su ayuda y su amistad me ha enriquecido tanto a nivel personal como intelectual.

A Dña Mercedes Villalobos Torres y D. Nicolás Olea Serrano por la ayuda desinteresada que me han ofrecido y el ánimo infundido en tantas horas de laboratorio que hemos compartido.

A Dña María del Valle Ostos Garrido y Dña María Asunción Abaurrea Equisoain, quienes me introdujeron en el "mundillo" de la investigación y me enseñaron a desenvolverme en el laboratorio. Sus consejos y su ayuda desinteresada han sido para mi de gran valor.

A María Teresa Valenzuela, Blanca Torres, Pilar Pérez y Eva Siles, becarias del Dpto de Radiología y Medicina Física que me han animado en todo momento. Gracias por vuestra colaboración.

A los profesores G.G. Steel y T.J. McMillan por darme la oportunidad de realizar parte de mi trabajo en el "Institute of Cancer Research" y hacer que mi estancia en su laboratorio fuera agradable.

A Francisca Gutierrez por tener tanta paciencia conmigo al mecanografiar este manuscrito y por revisarlo cientos de veces de forma tan desinteresada.

A Carmen Herrera, ya que gracias a su información conseguí la beca que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral.

Por último quiero expresar mi especial agradecimiento a mis padres, a mis hermanos y a J. Andrés, por haber sabido comprenderme en todo momento y motivarme para llevar a cabo este trabajo.

María Isabel Núñez Torres

CURRICULUM VITAE

Parte de los resultados de este trabajo de investigación han sido publicados en revistas internacionales:

- Br. J. Cancer, 1994, (en prensa)

"Initial radiation-induced DNA damage in human cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity".

- Cancer Res., 1994, (mandado para su publicación)

"Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumor cells".

También han sido presentados en Congresos Nacionales los siguientes trabajos:

- "El test MTT en los ensayos de radiosensibilidad celular tumoral". IV Congreso de Investigación sobre el Cáncer. Granada, 1991.

- "Evaluación in vitro de la respuesta tumoral a la radiación: uso de los esferoides multicelulares (MTS). IV Congreso de Investigación sobre el Cáncer". Granada, 1991.

- "Control androgénico de proliferación celular y síntesis proteica en células LNCaP". XXXV Congreso Nacional de Endocrinología. Santander, 1992.

- "Estudio experimental de radiosensibilidad intrínseca en cáncer de mama". II Congreso de FESEO. Barcelona, 1992.

- "Control hormonal de secreción de Catepsina, pS2, TPS y CA 15.3 en cáncer de mama. II Congreso de FESEO. Barcelona, 1992.

- *"Rupturas dobles de cadena de DNA: cinética de reagrupamiento y radiosensibilidad celular". V Congreso de Investigación sobre el Cáncer. Las Palmas, 1993.*

- *"Modulación de la radiosensibilidad en líneas celulares de cáncer de mama. Influencia hormonal". V Congreso de Investigación sobre el Cáncer. Las Palmas, 1993.*

- *"Daño inicial radioinducido sobre el DNA como principal determinante de radiosensibilidad celular". V Congreso de Investigación sobre el Cáncer. Las Palmas, 1993.*

En Congresos Internacionales se han presentado las siguientes comunicaciones:

- *"Hormone sensisitivity of human breast cancer multicellular spheroids". 5th International Congress on Cell Biology. Madrid (España), 1992.*

- *"Evaluation of the growth rate of MCF-7 breast cancer multicellular spheroids (MTS) after ionizing radiation using four mathematical models of biological growth". 11th Annual Meeting of Estro, Malmo (Suecia), 1992.*

- *"Initial DNA damage as a determinant of intrinsic cellular radiosensitivity in human breast cancer carcinoma cell lines". Annual Meeting of the Association for Radiation Research, Guildford (U.K.), 1993.*

- *"Modulating effect of estrogens on human breast cancer cells. Induction and repair of DNA damage". 19 th Meeting of the European Study Group for Cell Proliferation, Brujas (Bélgica), 1993.*

- *"Initial DNA damage: the major determinant of intrinsic cellular radiosensitivity". 7th European Conference on Clinnical Oncology, EECO7, Jerusalem, 1993.*

- *" Radiation-induced DNA double strand breaks rejoining in human tumor cells". 18 th L.H. Gray Conference, Bath, (U.K.), 1994.*

Otros trabajos publicados durante el periodo de formación de la doctoranda:

- *Cell Prolif.*, 1994, (en prensa)

"Evaluation of the growth rate of MCF-7 breast cancer multicellular spheroids using three mathematical models"

- *Aquaculture*, 110:161-171, 1993.

*"Lipid absorption by enterocytes of the Rainbow trout, *Oncorhynchus Mykiss*: Diet-induced changes in the endomembranous system"*

- *Aquaculture*, 115: 121-132, 1993.

*"Histological, histochemical and ultrastructural analysis of the gastric mucosa of *Oncorhynchus Mykiss*" "*

- *Micron*, 24 (5):445-450, 1993.

*" Ultrastructural study of the distal part in the intestine of *Oncorhynchus Mykiss*. Absorption of dietary protein".*

*JOSE MARIANO RUIZ DE ALMODOVAR RIVERA, CATEDRATICO DE RADIOLOGIA Y
MEDICINA FISICA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA*

CERTIFICA:

Que D^a María Isabel Núñez Torres, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral: "LA RUPTURA DOBLE DE CADENA DE DNA COMO TEST PREDICTIVO DE RADIOSENSIBILIDAD", que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada. Revisada la misma la encuentro conforme para ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste y surta efectos donde proceda, firmo el presente certificado en Granada a veintidós de Febrero de mil novecientos noventa y cuatro.

— Rosendo

INDICE

1.	INTRODUCCION	16
1.1	<i>CURVAS DE SUPERVIVENCIA</i>	19
1.2	<i>ESTUDIOS DE RADIOBIOLOGIA CELULAR</i>	20
1.3	<i>RESPUESTA DIFERENCIAL A LA RADIACION DE LOS TUMORES HUMANOS</i>	22
1.4	<i>ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD TUMORAL</i>	24
	1.4.1 <i>Predicción de respuesta tumoral</i>	25
	1.4.2 <i>Limitaciones del ensayo de formación de colonias</i>	27
1.5	<i>INTERPRETACION Y FORMA DE LAS CURVAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR A LA RADIACION</i>	29
	1.5.1 <i>Teoría del Blanco</i>	31
	1.5.2 <i>Modelo Lineal-Cuadrático</i>	33
	1.5.2.1 <i>Teoría de la acción dual de la radiación</i>	33
	1.5.2.2 <i>Teoría molecular de la inactivación celular</i>	34
	1.5.2.3 <i>Modelo del daño letal y/o potencialmente letal</i>	34
	1.5.2.4 <i>Modelo de reparación incompleta</i>	35
	1.5.2.5 <i>Modelo de reparación saturable</i>	36
	1.5.3 <i>Semejanza entre los distintos modelos de muerte celular radioinducida</i>	37
1.6	<i>METODOS DE ESTUDIO DE LA RADIOSENSIBILIDAD A NIVEL MOLECULAR</i>	39
	1.6.1 <i>Determinación de RDC de DNA utilizando la técnica de electroforesis de campo pulsado</i>	42
1.7	<i>OBJETIVOS</i>	43
2.	MATERIAL Y METODOS	46
2.1	<i>INSTRUMENTACION</i>	46
	2.1.1 <i>Estufa para cultivos celulares</i>	46

2.1.2	<i>Cámara de flujo laminar</i>	46
2.1.3	<i>Microscopio invertido</i>	46
2.1.4	<i>Microscopio óptico</i>	47
2.1.5	<i>Espectómetro de centelleo líquido</i>	47
2.1.6	<i>Centrífuga refrigerada</i>	48
2.1.7	<i>Cámara frigorífica</i>	48
2.1.8	<i>Congeladores</i>	48
2.1.9	<i>Contenedor de nitrógeno líquido</i>	48
2.1.10	<i>pH metro</i>	49
2.1.11	<i>Balanza de precisión</i>	49
2.1.12	<i>Unidad de filtración</i>	49
2.1.13	<i>Sistema de electroforesis de campo pulsado</i>	49
2.1.14	<i>Transiluminador</i>	50
2.1.15	<i>Cámara fotográfica</i>	50
2.1.16	<i>Citómetro de flujo</i>	50
2.1.17	<i>Unidades de irradiación</i>	50
2.1.18	<i>Lector de densidad óptica para placas de múltiples pocillos</i>	51
2.2	REACTIVOS	51
2.2.1	<i>Medios de cultivo</i>	51
2.2.2	<i>Suero de feto de vaca</i>	51
2.2.3	<i>Otros suplementos para cultivo celular</i>	52
2.2.4	<i>Tripsina-Verseno</i>	52
2.2.5	<i>Tampón estándar de fosfato (PBS)</i>	52
2.2.6	<i>Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE)</i>	52
2.2.7	<i>Sal disódica de etilén diamino tetra acético (EDTA)</i>	52
2.2.8	<i>Tampón de lisis</i>	53
2.2.9	<i>Agarosa</i>	53
2.2.10	<i>Bromuro de etidio</i>	53
2.2.11	<i>Ioduro de propidio</i>	53

2.2.12	<i>Tritón X-100</i>	53
2.2.13	<i>Tampón glicina</i>	53
2.2.14	<i>Líquido de centelleo</i>	54
2.2.15	<i>Otros reactivos químicos</i>	54
2.2.16	<i>Enzimas</i>	54
2.2.17	<i>Mezcla de gases</i>	54
2.2.18	<i>Violeta de genciana</i>	55
2.2.19	<i>Precursores radiactivos</i>	55
2.3	MATERIAL FUNGIBLE	55
2.3.1	<i>Material de plástico para cultivos celulares</i>	55
2.3.2	<i>Pipetas</i>	56
2.3.3	<i>Filtros</i>	56
2.3.4	<i>Viales de centelleo</i>	56
2.3.5	<i>Otro material</i>	56
2.3.6	<i>Películas fotográficas</i>	56
2.4	MODELOS TUMORALES	57
2.5	CINETICA DE CRECIMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES	60
2.6	EL ENSAYO DE SUPERVIVENCIA CELULAR	61
2.7	RADIOSENSIBILIDAD A NIVEL MOLECULAR	63
2.7.1	<i>Lesión molecular inicial radioinducida</i>	64
2.7.2	<i>Cinética de reagrupamiento de cadenas de DNA rotas por la radiación</i>	64
2.7.3	<i>Daño residual</i>	65
2.7.4	<i>Lisis de las células incluidas en "plugs"</i>	66
2.8.	ESTIMACION DE PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD MOLECULAR	67
2.8.1	<i>Lesión inicial.Método de análisis semicuantitativo</i>	68
2.8.2	<i>Lesión inicial.Método de análisis cuantitativo</i>	69
2.8.3	<i>Método para el estudio de la cinética de reagrupamiento</i>	

	<i>de rupturas dobles de cadena de DNA</i>	74
2.9	<i>EVALUACION DEL DAÑO RESIDUAL</i>	84
2.10	<i>CICLO CELULAR</i>	85
2.11	<i>ANALISIS DE IMAGEN</i>	86
3.	<i>RESULTADOS</i>	87
3.1	<i>CARACTERISTICAS DE LAS LINEAS CELULARES UTILIZADAS</i>	87
3.1.1	<i>Ensayos de linealidad</i>	88
3.1.2	<i>Ensayos de linealidad. Resultados medios</i>	94
3.1.3	<i>Características proliferativas de las líneas celulares ensayadas</i>	95
3.1.4	<i>Características de dependencia hormonal</i>	102
3.2	<i>ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD CELULAR</i>	105
3.3	<i>RELACION ENTRE PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD CELULAR</i> . .	123
3.4	<i>ESTIMACION DEL NUMERO DE LESIONES MOLECULARES INICIALES INDUCIDAS POR LA RADIACION</i>	129
3.4.1	<i>Parámetros derivados del estudio semicuantitativo de lesión molecular</i>	136
3.4.2	<i>Relación entre parámetros de supervivencia celular y parámetros de lesión molecular inicial</i>	144
3.4.3	<i>Parámetros de radiosensibilidad molecular derivados del estudio cuantitativo de lesión inicial radioinducida</i>	144
3.4.4	<i>Relaciones entre parámetros cuantitativos moleculares y celulares de radiosensibilidad</i>	160
3.5	<i>CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE LAS RUPTURAS DOBLES DE CADENA DE DNA</i>	166
3.5.1	<i>Relaciones entre parámetros celulares de radiosensibilidad y parámetros de cinética de reagrupamiento de rdc</i> .	195

3.5.2	<i>Relación entre distintos parámetros moleculares de radiosensibilidad</i>	203
3.6	DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO	206
3.6.1	<i>Relaciones entre parámetros celulares de radiosensibilidad y daño molecular residual</i>	213
3.7	DISTRIBUCION DE LOS ELEMENTOS CELULARES EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO MITOTICO	219
4.	DISCUSION	220
4.1	CARACTERIZACION DE LAS LINEAS CELULARES UTILIZADAS	220
4.2	CURVAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR	223
4.2.1	<i>Parámetros de radiosensibilidad</i>	223
4.2.2	<i>Relaciones entre los parámetros extraídos de la curva de supervivencia</i>	228
4.3	ESTIMACION DEL NUNERO INICIAL DE LESIONES RADIOINDUCIDAS .	231
4.3.1	<i>Particularidades de la técnica PFGE</i>	231
4.3.2	<i>Relación entre la cantidad de DNA extraída y dosis de radiación administrada</i>	233
4.3.3	<i>Método semicuantitativo para el cálculo de rdc de DNA</i>	234
4.3.4	<i>Método cuantitativo para el cálculo de rdc de DNA. Relación entre dosis de radiación y número de rdc de DNA</i>	236
4.3.5	<i>Relación entre el número de rdc de DNA y radiosensibilidad celular</i>	240
4.3.6	<i>Búsqueda de una relación general entre nivel de daño inicial radioinducido y radiosensibilidad celular</i>	246
4.3.7	<i>Confirmación experimental de la relación Supervivencia Celular/Daño Inicial Radioinducido</i>	247
4.4	EL REAGRUPAMIENTO DE RUPTURAS DE CADENA	

	<i>DE DNA COMO DETERMINANTE DE RADIOSENSIBILIDAD</i>	249
4.4.1	<i>Generalidades</i>	249
4.4.2	<i>Parámetros característicos del proceso de reagrupamiento</i>	252
4.4.3	<i>Probabilidad de que una rdc sea lesión letal</i>	253
4.4.4	<i>Relación entre parámetros de cinética de reagrupamiento de rdc de DNA y parámetros de radiosensibilidad celular</i>	255
4.4.5	<i>¿Hay una ley general?</i>	260
4.5	<i>EL DAÑO RESIDUAL COMO DETERMINANTE DE RADIOSENSIBILIDAD</i> .	261
4.6	<i>VIRTUALIDAD DE LOS PARAMETROS MOLECULARES DE RADIOSENSIBILIDAD</i>	263
4.7	<i>LOS ENSAYOS BIOLOGICOS COMO TESTS PREDICTIVOS DE RADIOCURABILIDAD</i>	266
4.8	<i>¿PUEDE UN TEST MOLECULAR DE RADIOSENSIBILIDAD SUSTITUIR AL ENSAYO CLONOGENICO?</i>	268
5.	<i>CONCLUSIONES</i>	272
6.	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	276

1.- INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

La experiencia clínica ha puesto de manifiesto que existen amplias variaciones en la probabilidad de control, tras tratamiento, de las enfermedades neoplásicas que afectan al ser humano. Esta probabilidad resulta dependiente, entre otros parámetros, de:

1) el tipo de tumor y, asociado al mismo, la capacidad metastásica de las células tumorales, la relación entre volumen tumoral y probabilidad de diseminación y el volumen tumoral mínimo (volumen umbral de detección) para que el diagnóstico clínico del proceso sea posible (Fidler, 1982).

2) el tamaño tumoral: para tumores de un tipo histológico determinado, el tamaño del primario es el factor predictivo de respuesta más importante de los hasta ahora conocidos hasta el punto de que la dosis requerida para conseguir una probabilidad de control tumoral determinada aumenta, en forma no lineal, con el tamaño del tumor. (Fletcher, 1980a);

3) la invasión locorregional de los linfáticos: los estudios de correlación entre el análisis histopatológico de las muestras quirúrgicas y el pronóstico a largo plazo de los pacientes sometidos a tratamiento, han permitido demostrar que la invasión tumoral de los linfáticos locorregionales constituye un elemento predictivo de gran valor en la presunción de existencia de metástasis distales. Por otra parte, determinadas características de los nódulos linfáticos como, por ejemplo, su tamaño, el número de ganglios afectos, su localización y la extensión de la enfermedad a nivel ganglionar, han demostrado poseer, igualmente, una importante significación pronóstica (Sugarbaker, 1982);

4) la presentación clínica de la enfermedad: la existencia o inexistencia de áreas tumorales necróticas influye de una manera clara sobre la probabilidad de control tumoral

cuando se utiliza un esquema de fraccionamiento de la dosis determinado (Gelinas 1973);

5) la capacidad proliferativa de las células tumorales: teniendo en cuenta que el valor medio del tiempo de duplicación potencial de los tumores humanos es del orden de 4.5 días y que los esquemas de irradiación estándar de los mismos suelen durar 6-8 semanas es claro que un proceso de proliferación tumoral acelerado durante el tratamiento puede convertirse en un factor limitante del control. Los regímenes de fraccionamiento acelerado que se utilizan, hoy, en muchos centros oncológicos tratan de oponerse, de alguna manera, al desarrollo de este efecto. (Begg, 1985; McNally, 1989; Denekamp, 1992);

6) el grado de diferenciación celular: utilizando como criterio morfológico la diferenciación de las células de los tumores humanos se ha desarrollado un sistema de clasificación de los tumores que resulta útil para la predicción del pronóstico de ciertas localizaciones tumorales (Gleason, 1977).

Cuando en el tratamiento del paciente oncológico se utiliza la irradiación, dentro de las variables de influencia en el control tumoral es necesario incluir, junto a las anteriores, a las siguientes:

7) la tolerancia de los tejidos normales: en la radioterapia clínica del cáncer el conocimiento o la estimación de i) la probabilidad de diseminación locorregional o distal de las células tumorales, ii) la probabilidad de control relativa al volumen del tumor y iii) la probabilidad de la incidencia y la severidad de las complicaciones radioinducidas sobre los tejidos normales, constituyen las líneas de pensamiento lógico sobre las que debe situarse la decisión terapéutica (Withers, 1980);

8) el grado de hipoxia tumoral: un factor que desde 1955 (Thomlinson, 1955) se ha

convertido en una barrera al control tumoral por radiación dadas las diferencias en radiosensibilidad existentes entre células tumorales hipóxicas y euóxicas. Recientemente, ensayos clínicos realizados en condiciones de hiperbarismo han demostrado cierta influencia en el control tumoral (Overgaard, 1989; Dische, 1991);

9) la radiosensibilidad celular intrínseca: es bien conocido que, distintos tipos de tumores humanos presentan diferentes respuestas a la radiación. Así, por ejemplo, seminomas y linfomas son tumores claramente radiosensibles mientras que la probabilidad de control tumoral por radiación para melanomas y osteosarcomas es sumamente reducida. Se conoce, en este sentido, que la dosis necesaria para conseguir el control tumoral en el 90% de los pacientes irradiados es del orden de 20-30 Gy para los tumores testiculares tipo seminoma, mientras que para conseguir idéntico porcentaje de control en pacientes afectados de Enfermedad de Hodgkin se requieren niveles de dosis comprendidos entre 40-50 Gy y ~~aaab~~ el tumor a tratar es un carcinoma de células escamosas (cuerda vocal, orofaringe y otros) la dosis de control 90% oscila entre 60 y 70 Gy según al tamaño del primario (Suit, 1987).

Algunos de los parámetros mencionados son de fácil evaluación, desde el punto de vista clínico, a través de métodos de diagnóstico convencional (exámenes clínicos, radiológicos e histológicos, por ejemplo). Otros exigen el recurso a técnicas más especializadas. Finalmente, aunque se han descrito técnicas adecuadas para el análisis cuantitativo del grado de oxigenación tumoral, la determinación de la capacidad proliferativa de las células tumorales y su radiosensibilidad intrínseca, la utilización clínica de estos parámetros no se encuentra, aún, generalizada.

La razón o razones por las que algunos tumores humanos pueden ser controlados localmente con mayor facilidad que otros, no se conocen con exactitud. Por esta razón, la investigación sobre los mecanismos subyacentes al control tumoral constituye uno de los campos de estudio más apasionantes, hoy, en la Radiobiología médica.

1.1. CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Un tumor es una estructura biológica compleja consistente no sólo en células que son claramente neoplásicas o malignas, sino también en una variedad de tipos de células no neoplásicas -normales- procedentes, en parte, de células malignas que han perdido su capacidad proliferativa como resultado de los procesos de diferenciación celular. Se supone que sólo una fracción de las células del tumor tienen capacidad para dar origen a una población celular definida. Esta fracción, denominada "fracción de crecimiento", es responsable del crecimiento del tumor, primero, y del recrecimiento posterior observable algún tiempo después de concluido el tratamiento en los casos en los que éste fracasa. Las células que la constituyen se denominan células "stem" o germinales del tumor. No disponemos de métodos fiables para la identificación precisa de estas células aunque, de manera indirecta, la capacidad clonogénica celular puede ser evaluada "in vitro".

Llamamos "célula clonogénica" a toda aquella que bajo circunstancias experimentales definidas tiene la capacidad de producir "in vitro" una colonia de descendientes. Esta definición, es claramente distinto del concepto "stem cell" puesto que bajo esta denominación se engloban sólo aquellas células que, dentro del tumor, es decir, "in vivo" poseen la capacidad proliferativa ilimitada característica de los tumores malignos.

El ensayo "in vitro" de la capacidad de formación de colonias exige la obtención por medios mecánicos o enzimáticos de una suspensión monocelular en la que: 1) las interacciones célula-célula desaparecen; 2) algunas "células stem" pueden ser lesionadas irreversiblemente perdiendo así su capacidad divisoria; 3) el medio nutritivo que permite el crecimiento celular "in vitro" puede alterar tanto los parámetros cinéticos del crecimiento como la propia capacidad divisoria de la célula. En resumen, a pesar de las diferencias antes citadas y de la distinción conceptual realizada, es opinión generalizada que la identificación

entre células clonogénicas y células "stem" es correcta desde el punto de vista experimental (Steel, 1989a)

En 1956 Puck y Marcus (Puck, 1956) utilizando técnicas de cultivo para células de mamífero demostraron, por vez primera, que la radiación reducía la viabilidad celular en términos de pérdida de capacidad de formación de colonias. El experimento consistió básicamente en el "sembrado" de células Hela en discos Petri, utilizando un medio nutriente adecuado y sometiendo los discos sembrados a dosis variables de radiación. Posteriormente se permitió el crecimiento celular durante 2 semanas. El experimento finalizó calculando la fracción de células que fueron capaces de formar colonias y relacionado los datos de supervivencia celular (sólo forma colonia la célula que mantiene intacta su capacidad proliferativa) con la dosis de radiación administrada. La curva de supervivencia describe la relación entre dosis de radiación y proporción de células que sobreviven a la misma. El trabajo de Puck y Marcus hizo posible la medida del efecto de la radiación ionizante sobre las células y marcó el comienzo de la Radiobiología celular cuantitativa.

1.2. ESTUDIOS DE RADIOBIOLOGIA CELULAR

Después de este trabajo inicial (Puck, 1956), se han obtenido curvas de supervivencia en distintos microorganismos y líneas celulares. Los parámetros extraídos de las mismas, se han caracterizado por una variabilidad, generalmente atribuida a la complejidad estructural del microorganismo o célula estudiados. Así, los virus han resultado ser estructuras biológicas muy radiorresistentes, las bacterias muestran una radiorresistencia intermedia y las células de mamífero son claramente más sensibles que otras estructuras biológicas a la radiación (Tubiana y col, 1990). Incluso, cuando se han comparado entre sí, las curvas derivadas de células de mamífero obtenidas a partir de animales y/o tejidos distintos, se han encontrado diferencias significativas que parecen ser más una función de la estirpe celular

que de la especie animal utilizada en el ensayo.

Hasta 1981, los experimentos realizados sobre células tumorales humanas han sido, por lo general, escasos en número y carentes de valor informativo. En dicho año Fertil y Malaise (Fertil y Malaise, 1981) consideraron la radiosensibilidad celular intrínseca como un parámetro de importancia relevante en la Radioterapia Oncológica. Su trabajo inicial, que fue esencialmente una revisión y un análisis estadístico de los datos de supervivencia celular de tumores humanos sometidos a irradiación, demostró que:

1) las células humanas manifiestan distinto grado de sensibilidad frente a la radiación siendo tan claras las diferencias observadas en la región de baja dosis (2 Gy) que les permitieron definir el parámetro de "Radiosensibilidad Celular Intrínseca" como un factor característico del tipo celular estudiado;

2) entre la fracción de supervivencia celular obtenida a 2 Gy (correspondiente a cada tipo celular ensayado) y la dosis de radiación estimada en clínica como necesaria para el control del 90% de los casos tratados (Rubin y col, 1974) existe una relación estadísticamente significativa. La existencia de esta relación sugiere que la mayor o menor probabilidad de curación que, tras radioterapia, se observa en los tumores humanos podría, al menos parcialmente, ser atribuida a la radiosensibilidad intrínseca inherente a cada tipo celular. Esto, según Fertil y Malaise, debe ser particularmente cierto cuando la fracción de supervivencia celular obtenida tras dosis de 2 Gy es elevada (tumores probablemente radiorresistentes).

1.3. RESPUESTA DIFERENCIAL A LA RADIACION DE LOS TUMORES HUMANOS

Hasta principios de la década de los 80, la respuesta diferencial de los tumores a la radiación se explicaba mediante el recurso a 4 mecanismos considerados, hoy día, como clásicos. Tres de ellos se refieren a: i) la reparación de las lesiones celulares radioinducidas, ii) la redistribución de las células, tras irradiación, en las diferentes fases del ciclo mitótico y iii) la repoblación de los tejidos irradiados a partir de células germinales o células stem supervivientes que inician, durante la irradiación, un proceso de regeneración acelerado. El cuarto, la reoxigenación tumoral, hace referencia al microambiente que rodea y, en alguna forma, preside el crecimiento del tumor. De tales mecanismos, el primero (Reparación) y tercero (Regeneración) protegen al tumor del efecto de la radiación, mientras que el segundo (Redistribución) y cuarto (Reoxigenación) lo radiosensibilizan (Withers, 1975).

El trabajo de Fertil y Malaise ha sido clave puesto que supone la introducción del parámetro "radiosensibilidad celular intrínseca", como quinto elemento de la respuesta tumoral a la irradiación. Desde nuestro punto de vista, la causa que facilitó la demostración de existencia de una relación de dependencia entre Radiosensibilidad y Radiorrespuesta fue el cambio que se produjo en la elección del parámetro de cuantificación de la radiosensibilidad. En efecto, Fertil y Malaise, primero, y Deacon y col (Deacon y col., 1984) después, pusieron en relación la Fracción de Supervivencia a 2 Gy con la probabilidad de control tumoral y dejaron de lado, el parámetro D_0 (Dosis Letal Media) utilizado hasta entonces, en el análisis de los datos experimentales de supervivencia celular, en función de la dosis (Tubiana, 1990).

El trabajo de Deacon y col ha conducido, por otra parte, a la estratificación de los distintos tumores estudiados en cinco grupos, caracterizados por diferentes probabilidades de respuesta al tratamiento con radiación.

TABLA 1.1

CLASIFICACION DE LOS TUMORES HUMANOS SEGUN LA RADIORRESPUESTA CLINICA

-
- A: Neuroblastoma, Linfoma, Mieloma*
- B: Meduloblastoma, Carcinoma de Pulmón
de células pequeñas*
- C: Carcinoma de mama, Carcinoma de vejiga,
Carcinoma de cervix*
- D: Carcinoma de páncreas, colo-rectal, Carcinoma
epidermoide bronco-pulmonar*
- E: Melanoma, Osteosarcoma, Glioblastoma y
Carcinoma renal*
-

(Deacon y col, 1984)

Si bien es general el acuerdo de considerar los tipos de tumor incluidos en los grupos A y E como radiosensibles los primeros y refractarios al tratamiento los segundos, la definición de las categorías B, C y D está sometida a cierto grado de discusión. Los criterios utilizados por Deacon y col., distinguen dos elementos útiles para la estratificación: a) la probabilidad de curación y b) la dosis necesaria para conseguirla. De cualquier forma, aceptando como válida la clasificación propuesta, los resultados obtenidos tras el ajuste de las curvas de supervivencia al modelo lineal cuadrático (Tubiana, 1990) muestran claras diferencias en los valores medios de FS2 encontrados para cada grupo. Así, la FS2 osciló entre 0.19 ± 0.04 (grupo A) y 0.52 ± 0.04 (grupo E) observándose un crecimiento progresivo de FS2 al desplazarse a lo largo de la escala no-paramétrica de graduación de respuesta tumoral (A---E). De igual manera, las diferencias encontradas para los valores de α correspondientes a los grupos de respuesta favorable (A) y desfavorable (E) a la irradiación ($\alpha_A = 0.779$, $\alpha_E = 0.250$) permitieron a Deacon y col, demostrar la existencia de una relación de asociación entre la pendiente inicial de la curva de supervivencia (coeficiente α , modelo lineal-cuadrático) y la radiorrespuesta clínica.

Por estas y otras razones, los trabajos del grupo del Institut Gustave Roussy y del grupo del Institute of Cancer Research han despertado el interés de la comunidad científica en el desarrollo de tests predictivos de la respuesta de los tumores humanos a la radiación.

1.4. ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD TUMORAL

Como hemos dicho antes, un tumor es una estructura celular compleja en la que coexisten células neoplásicas con células normales (estroma) de los tejidos conjuntivo y vascular. Además, las células tumorales se encuentran organizadas jerárquicamente de manera que se pueden distinguir, para las células stem, dos compartimentos celulares caracterizados por diferencias en su actividad proliferativa: el compartimento celular

quiescente y el compartimento celular proliferativo. Las células quiescentes (inactivas mitóticamente) pueden entrar, impulsadas por determinados estímulos, en el compartimento proliferativo. A la célula stem del tumor se le supone la potencialidad de auto-renovarse y de diferenciarse (MacKillop y col, 1983). En analogía a los tejidos o sistemas de renovación celular normales, se ha postulado que los tumores están formados por tres tipos de poblaciones celulares: células stem o germinales, células transicionales y células diferenciadas. De esta manera, la estructura tumoral puede decirse que responde a un modelo de organización jerárquica de diferenciación en el cuál la proporción de células en los diferentes compartimentos depende de las propiedades de renovación celular de las células stem y del número de divisiones celulares que ocurren en compartimento transicional celular (Buick, 1984).

1.4.1 Predicción de respuesta tumoral

La predicción de la eficacia de regímenes de irradiación o quimioterapia diversos, esto es, la determinación de la probabilidad de respuesta del tumor al tratamiento efectuado, constituye ,hoy, un procedimiento de estudio, si no rutinario, si de creciente desarrollo en numerosos Centros. El método experimental comienza con la obtención de células tumorales a partir de procesos ascíticos malignos, de efusiones pleurales tumorales, de aspirados de médula ósea o de muestras procedentes de biopsias de tumores primarios o metastásicos. La composición heterogénea de los tumores humanos descrita en párrafos anteriores ha obligado al desarrollo de una metodología de trabajo y de técnicas específicas que, evitando el crecimiento de células normales, permiten la proliferación de las células clonogénicas. Entre los métodos más frecuentemente utilizados merecen destacarse los descritos por Hamburger-Salmon (Hamburger, 1977) y por Courtenay-Mills (Courtenay, 1978).

El objetivo de ambos ensayos es común y consiste en el desarrollo de un procedimiento experimental, basado en la capacidad de formación de colonias "in vitro", que sea reproducible y que permita la realización de estudios sobre biología tumoral y sobre

predicción de la respuesta de pacientes oncológicos a la terapéutica instaurada. Los dos métodos se basan en una doble hipótesis:

1) la célula tumoral clonogénica cultivada "in vitro" corresponde a la célula "stem";

2) la actividad citotóxica de la radiación o de los fármacos sobre células obtenidas de procesos neoplásicos de pacientes, predice la respuesta del tumor al mismo régimen terapéutico cuando éste se administra "in vivo".

Por otra parte, tanto el método de Hamburger como el de Courtenay presentan ciertas similitudes, entre las cuáles cabe destacar:

1) el empleo de agar-semisólido en los medios de cultivo, con objeto de impedir la adhesión de las células tanto normales y malignas al fondo de las cajas de cultivo y hace posible que, aunque todas las células se mantengan en suspensión el crecimiento se limite sólo las células neoplásicas.

2) La necesidad de obtener, a partir del tumor, una suspensión monocelular. Para ello, se cortan finamente fragmentos de tejido tumoral que se someten, después, a disgregación mecánica (von Hoff, 1984) o enzimática (Pavelic, 1980, Hamburger, 1981). Una vez obtenida la suspensión monocelular, se siembran alícuotas de la misma sobre discos Petri en condiciones de crecimiento celular adecuado (medio nutriente suplementado con 10-15% de suero fetal, pH = 7.2, temperatura de incubación 37°C, atmósfera saturada de humedad enriquecida con 5% de dióxido de carbono) y el medio nutriente se suplementa con antibióticos para impedir la contaminación microbiana.

Consideraciones acerca de la estructura celular de los tumores y de su organización jerárquica permiten deducir fácilmente que del número de células plantadas en cada disco

sólo alguna de ellas será capaz de formar colonias. La relación entre el número de células sembradas y el número de colonias obtenido a partir de ellas se define como "Eficiencia de clonaje" y se expresa generalmente con porcentaje. Finalmente la actividad citorreductora de la radiación (o de los fármacos antineoplásicos) se refleja por la disminución del porcentaje de células que mantienen la capacidad clonogénica.

1.4.2 Limitaciones del ensayo de formación de colonias

De manera esquemática señalaremos a continuación las principales limitaciones y causas de error que afectan al ensayo clonogénico:

1) Un crecimiento positivo de células tumorales en forma de colonias se consigue sólo para el 35%-50% de los especímenes ensayados (von Hoff, 1984).

2) La eficiencia de clonaje de las células extraídas de tumores humanos es, generalmente, muy baja (Ozols, 1984). Valores típicos encontrados para este parámetro oscilan entre el 0 y 1%. Esto quiere decir que para obtener al menos 100 colonias en los discos control deben sembrarse del orden de 10^4 células por disco. Considerando, además, que la acción citorreductora de la radiación se evalúa mediante la pérdida de la capacidad clonogénica celular, en los discos que van a ser sometidos a tratamiento, el número inicial de células sembradas deberá ser considerablemente mayor. Este requisito se complica por el hecho de que la relación entre el número de células sembradas y el número de colonias que se encuentran no es siempre lineal (Eliason, 1985).

3) El punto de partida del test es la obtención de una suspensión monocelular homogénea a partir del tumor sólido. Sin embargo, cualquiera que sea el procedimiento utilizado para ello (mecánico o enzimático), la actuación sobre el tejido resulta limitada por la necesidad de preservar la viabilidad de las células stem. Por ello, las suspensiones celulares obtenidas ni son monocelulares ni tampoco homogéneas. En efecto, el análisis

microscópico de la muestra revela la presencia de "racimos" de células (Luedke, 1984, Ozols, 1984) y el test de viabilidad celular basado en la captación intracelular de azul Tripan (Freshney, 1983a) demuestra también que como consecuencia de la disgregación tisular se pierden numerosos elementos celulares.

4) El ensayo requiere el mantenimiento estricto de condiciones de esterilidad. Sin embargo, las contaminaciones microbianas son muchas veces, inevitables (Freshney, 1983b).

5) Cuando, mediante el crecimiento de células tumorales en el cultivo, se somete a estudio la reproductibilidad del test, es frecuente observar que inóculos celulares distintos obtenidos a partir de la misma suspensión celular ofrecen resultados también distintos. Esto es una clara evidencia de la heterogeneidad celular de los tumores humanos en lo que a respuesta al tratamiento se refiere (Luedke, 1984; Steel, 1993; Heppner, 1978; MacKillop, 1982).

6) No ha sido posible, hasta ahora, conseguir cierto grado de estandarización metodológica que permita comprobar la reproductibilidad de resultados tanto intra como interlaboratorio y razones tales como el retraso en la recepción del espécimen tumoral, la composición de los medios de cultivo, el lote de suero fetal y los suplementos adicionados, han sido utilizadas para explicar la variación de los resultados obtenidos tras ensayos clonogénicos. Incluso modificaciones de estos factores son capaces de seleccionar el crecimiento de distintas subpoblaciones caracterizadas por respuestas al tratamiento diferentes (Epstein, 1980; Schlag, 1984).

7) Finalmente, el ensayo es laborioso, difícil de interpretar y requiere como mínimo 3-4 semanas -a veces más- para conseguir que el número de células por colonia sea igual o superior a 50 elementos (Courtenay, 1984), tamaño mínimo necesario para distinguir una colonia real de una colonia abortiva (Nias, 1965).

De cualquier manera, la aplicabilidad del ensayo clonogénico al estudio de la biología de las células neoplásicas ha permitido el establecimiento de numerosas líneas celulares humanas, normales unas -fibroblastos, por ejemplo- tumorales otras. Gracias a ello se ha conseguido disponer de material biológico suficiente para hacer posible que los requisitos de homogeneidad celular y de respuesta biológica reproducible frente a sustancias estimuladoras o inhibidoras del crecimiento celular o frente a la acción de agentes citotóxicos queden suficientemente garantizados. Utilizando líneas celulares establecidas en la forma anteriormente descrita, el desarrollo de la Radiobiología tanto a nivel celular como a escala molecular ha sido enorme en la última década (Steel, 1989b; Peacock, 1992a, 1992b; Mort, 1993).

1.5. INTERPRETACION Y FORMA DE LAS CURVAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR A LA RADIACION

En la figura 1.1. hemos representado el resultado de un ensayo de respuesta de células humanas a la radiación. En ordenadas figura la fracción de supervivencia (escala logarítmica) y en abcisas la dosis de radiación administrada (Gy). El análisis cualitativo de esa gráfica nos permite describirla como una función exponencial decreciente compleja puesto que la pendiente medida en distintos puntos de la curva resulta dependiente de la dosis. Células de distintos orígenes muestran curvas de supervivencia diferentes. Una aproximación a la radiosensibilidad diferencial de distintas células podría hacerse calculando la dosis necesaria para conseguir una reducción constante de la capacidad clonogénica, por ejemplo, calculando la dosis necesaria para destruir el 50% de las células sembradas. Si bien este parámetro podría ser de alguna utilidad está claro que no aporta ningún tipo de interpretación acerca del mecanismo por el cual las células pierden su capacidad clonogénica. Para cubrir esta necesidad se han formulado, a lo largo del tiempo, diversas teorías que, sobre bases físico-químicas y biológicas, han tratado de explicar la forma de

la curva de supervivencia asignando una significación a cada uno de los parámetros que la definen. Ello exige, además, el recurso a una formulación matemática más o menos compleja y la comprobación del ajuste de los puntos experimentales obtenidos en el laboratorio con los predichos por la función matemática utilizada. Describiremos a continuación los modelos teóricos más ampliamente utilizados.

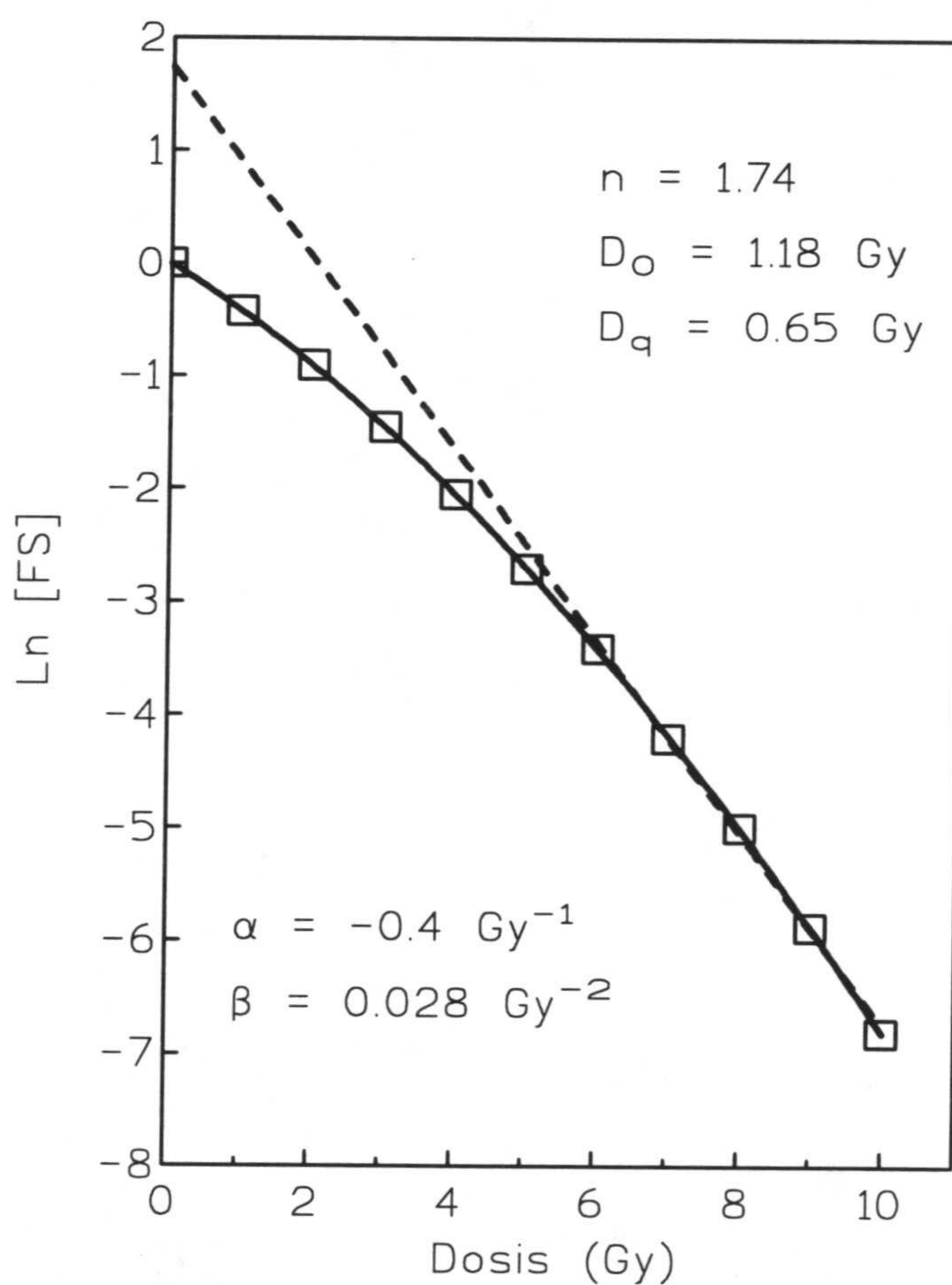


Figura 1.1 Curva de supervivencia celular frente a la dosis se radiación.
Ajuste a los modelos L-Q y MB

1.5.1 Teoría del Blanco

La versión más aceptada del modelo de interacción de la radiación sobre el blanco celular (Lea, 1955), asume que la supervivencia, S , tras la administración de una dosis, D , puede expresarse como el producto de dos funciones de supervivencia:

$$S_D = S_1 \times S_2 \quad (\text{Dewey, 1977; Whitters, 1980}).$$

El primer término toma en consideración la muerte celular debida a una interacción única. Puesto que la cesión de energía de la radiación a la célula es un proceso al azar, S_1 puede ser expresado como una función exponencial dependiente de la dosis:

$$S_1 = \exp(-D/D_0)$$

donde $1/D_0$ es una constante con unidades Gy^{-1} . La segunda función de supervivencia, S_2 , implica que las células tienen n blancos y que se requiere la interacción de la radiación con cada uno de ellos para producir la muerte de la célula. S_2 viene, entonces, expresada como

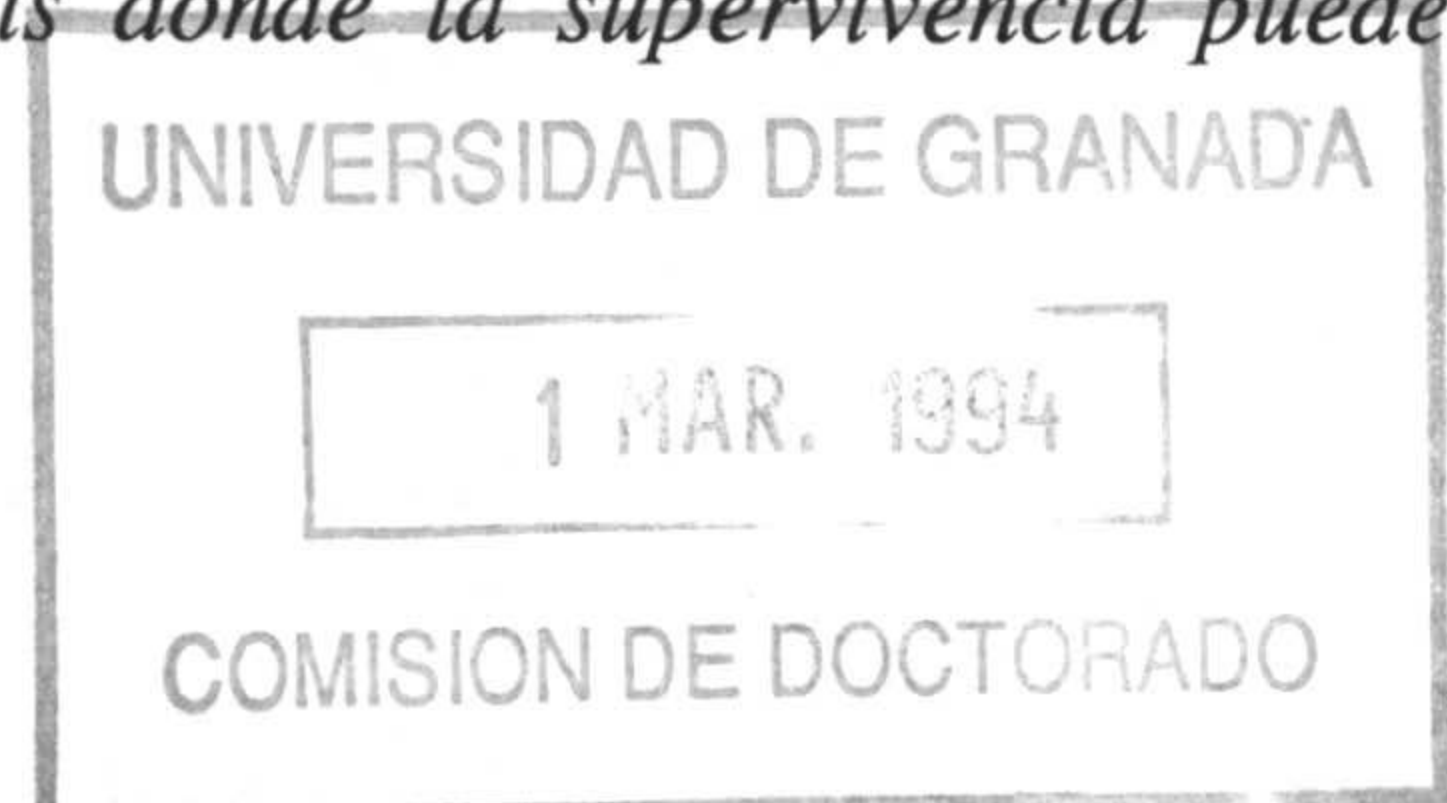
$$S_2 = [1 - (1 - \exp(-D/D'_0))^n]$$

donde D'_0 es una constante con unidades Gy^{-1} .

Por tanto S_D será:

$$S_D = S_1 \times S_2 = \exp(-D/D_0) \times [1 - (1 - \exp(-D/D'_0))^n]$$

El primer término hace referencia a la pendiente inicial, distinta de cero, de la curva de supervivencia y predomina en la región de baja dosis donde la supervivencia puede



considerarse aproximadamente igual a S_1 . Este modelo implica que, en respuesta a una determinada dosis de radiación las células irradiadas pueden considerarse subdividas en tres categorías:

1) células en las que todos los n -blancos han sido alcanzados al menos una vez (subpoblación de células letalmente lesionadas);

2) células en las que ninguno de sus n -blancos ha sido alcanzado (fracción de células supervivientes);

3) células en las cuales alguno, pero no todos, los n -blancos han sido lesionados por la radiación (fracción de células subletalmente dañadas).

Cuando la dosis de radiación aumenta el daño subletal se acumula y esta acumulación incrementa la probabilidad de muerte celular. La acumulación de daño subletal de acuerdo con este modelo explica el hombro inicial de la curva de supervivencia así como el aumento progresivo de su pendiente.

En resumen, según esta interpretación teórica se supone la existencia dentro de la célula de uno o más blancos. La interacción de la radiación con los blancos origina la lesión de los mismos y cuando todos ellos son lesionados se produce la muerte celular.

Los parámetros que definen la radiosensibilidad según este modelo son: D_0 y D'_0 que se definen como las dosis necesarias para conseguir una probabilidad de supervivencia del 37% para S_1 y S_2 , respectivamente. El parámetro n , al principio interpretado como el número de blancos existentes en la célula, se define hoy día como número de extrapolación sin atribuirle ningún significado biológico.

1.5.2 Modelo Lineal-Cuadrático

La aplicación del modelo del blanco al estudio de las curvas de supervivencia celular tras irradiación ha desvelado algunas inconsistencias y ha promovido el interés de los investigadores en busca de modelos alternativos de base mecanicista más sólida que mejoren, además, la aproximación entre datos experimentales y teóricos. Consecuencia de estos esfuerzos ha sido el desarrollo del modelo lineal-cuadrático (L-Q) cuya expresión matemática es:

$$S = \exp -(\alpha D + \beta D^2)$$

donde α y β son constantes cuyas unidades son Gy^{-1} y Gy^{-2} , respectivamente.

Esta función matemática ha sido interpretada de formas diferentes asignándose a los parámetros α y β significados distintos. Los supuestos teóricos más aceptados son los siguientes:

1.5.2.1 Teoría de la acción dual de la radiación

El modelo de Rossi y Kellerer (Kellerer, 1972) tiene el mérito de apoyarse sobre bases dosimétricas y físicas para la interpretación mecanicista de los estudios en radiobiología celular. Puede considerarse como una simple modificación de la teoría del blanco.

El modelo propone que el paso de una radiación a través del blanco puede originar determinadas sublesiones y que dos sublesiones próximas entre sí pueden combinarse originando una lesión letal. Esta es la interpretación para el término αD . El coeficiente cuadrático, βD^2 , resultaría, en esta hipótesis, de la suma de acontecimientos producidos a lo largo de las trazas de dos partículas que coinciden sobre el mismo blanco. Finalmente, la teoría del modelo establece (Kellerer, 1978) que dos sublesiones tienen la misma probabilidad de combinarse entre sí, cualquiera que sea la distancia entre ellas, siempre y

cuando ésta sea inferior a 1μ .

1.5.2.2 Teoría molecular de la inactivación celular

Chadwick y Leenhouts (Chadwick, 1981) supusieron, al formular esta hipótesis, que las rupturas dobles de cadena del DNA pueden originarse, bien tras la interacción con el genoma celular de una partícula o fotón de radiación que lesiona simultáneamente ambas cadenas y cuya probabilidad resulta ser función de la dosis (αD) o bien como consecuencia de ionizaciones al azar que producen lesiones en cadenas opuestas del DNA y que, casualmente, ocurren suficientemente cerca como para dar origen a una ruptura doble de cadena. Este acontecimiento resulta ser proporcional al cuadrado de la dosis (βD^2). Aunque interesante, la interpretación molecular del mecanismo de muerte celular es hoy día escasamente aceptada.

1.5.2.3 Modelo del daño letal y/o potencialmente letal

La mayor parte de los modelos matemáticos descritos para explicar la muerte celular tras irradiación generan familias de curvas de supervivencia sin hacer referencia a la tasa de dosis. El modelo de Curtis (Curtis, 1986) es un modelo dinámico capaz de simular la muerte celular radioinducida en función de la dosis y de la tasa de dosis. Cuando la tasa de dosis es elevada y la curva de supervivencia se limita al estudio de la región de baja dosis, la expresión matemática final coincide con la ecuación del modelo L-Q. Sin embargo, la interpretación de los coeficientes α y β responde a una base biológica completamente distinta.

El modelo de Curtis está basado en parte en el modelo de reparación-reparación equivocada (RMR) de Tobias (Tobias, 1980) y en el trabajo de Pohlit y col. (Pohlit, 1975) y supone que las células, como consecuencia de la irradiación, sufren dos tipos de lesión:

a) lesiones letales (LL) (no reparables), que irreversiblemente ocasionan la muerte

celular;

b) lesiones potencialmente letales (LPL), que pueden ser completamente reparadas, situación que permite a las células el mantenimiento de su capacidad clonogénica, o pueden evolucionar, "por fijación", de las mismas hacia lesiones letales. En esta segunda hipótesis, el proceso de fijación del daño se puede interpretar como una interacción binaria de lesiones potencialmente letales.

De acuerdo con lo anterior el coeficiente α representa, de alguna manera, la eficacia de la radiación para producir lesiones letales sobre la célula, mientras que el coeficiente β refleja la contribución, en términos de probabilidad de muerte celular, de los mecanismos de interacción de lesiones o de la fijación del daño subletal radioinducido.

1.5.2.4 Modelo de reparación incompleta

Comparado con el modelo LPL el modelo de reparación incompleta es un intento empírico para simular procesos de supervivencia celular dependientes del tiempo. La hipótesis de Thames (Thames, 1985) supone que la reconstitución del hombro de la curva de supervivencia, cuando se hace irradiación fraccionada, es un fenómeno dependiente del tiempo de separación entre cada dos fracciones de la dosis sucesivas. El modelo supone que la curva de supervivencia celular, tras irradiación a alta tasa de dosis, se ajusta a la ecuación lineal-cuadrática y utiliza, además, un parámetro adicional: la constante de velocidad del proceso de reparación del daño. Así, el modelo permite el ajuste de datos de supervivencia celular obtenidos en condiciones de irradiación fraccionada incluso cuando el tiempo entre cada dos fracciones es insuficiente para permitir la completa reparación del daño radioinducido (de aquí el nombre de reparación incompleta).

En este modelo, la ecuación de supervivencia para experimentos realizados en régimen de exposición continua es:

$$S = \exp(-\alpha D - \beta g D^2) \text{ donde}$$

$$g = 2 [\mu t - 1 + \exp(-\mu t)] / \mu^2 t^2$$

siendo μ la constante de velocidad del proceso de reparación.

Cuando el tiempo de exposición es muy corto g tiende a 1 y la supervivencia se ajusta a la ecuación L-Q. Por el contrario si el tiempo de exposición es muy prolongado g tiende a cero y la supervivencia viene dada por el término lineal de la ecuación.

1.5.2.5 Modelo de reparación saturable

La mayor parte de los modelos cuantitativos que intentan describir la acción de la radiación sobre células de mamíferos asumen que los procesos de reparación de lesiones radioinducidas ocurren de una manera que resulta ser independiente de la dosis. Esto lleva implícito que los mecanismos de reparación:

- 1) se ajustan a cinéticas de reacción de primer orden (no saturable);
- 2) no se afectan por el depósito de energía liberado por la interacción de la radiación con la célula;
- 3) no se activan por la presencia del daño originado por la radiación.

Una filosofía diferente ha sido desarrollada en los llamados modelos de reparación saturable (Goodhead, 1985). En ellos, la explicación subyacente al hecho de que la reparación sea insuficiente se ha apoyado en tres tipos de razones distintas:

- a) Déficit de los mecanismos de producción de energía, hipótesis que, una vez

investigada por distintos autores, no ha podido ser confirmada (no se ha encontrado, en efecto, que el nivel de ATP disminuya tras la irradiación) (Pohlit, 1975; Haynes, 1966).

b) Inactivación de los sistemas enzimáticos responsables de la reparación. Los estudios dirigidos a esclarecer esta posibilidad, parecen coincidir en la improbabilidad de que este mecanismo sea suficiente para explicar los hallazgos experimentales (Garred, 1974; Goodhead, 1985).

c) Saturación de los sistemas de reparación. Este fenómeno, dependiente de la concentración relativa de enzimas reparadores y de sustrato (lesiones a reparar) parece, según Goodhead, la explicación más probable para la forma de la curva de supervivencia celular frente a la radiación. Goodhead considera la actividad de los enzimas reparadores como el factor limitante del proceso de reparación.

Recientemente, Sánchez-Reyes (Sánchez-Reyes, 1992) ha publicado una nueva formulación para el modelo de reparación saturable en el que se considera la existencia de mecanismos de interacción de lesiones radioinducidas junto con procesos de reparación y recuperación de la capacidad clonogénica. Se ha intentado, de esta forma, integrar en la misma teoría el modelo basado en la inducción de lesiones letales y potencialmente letales (Curtis, 1986) con el que se apoya en el mecanismo de reparación incompleta (Thames, 1985) y con la hipótesis de saturación de enzimas reparadores (Goodhead, 1985).

1.5.3 Semejanza entre los distintos modelos de muerte celular radioinducida

Aunque hasta ahora no hay acuerdo generalizado sobre cuál de los numerosos modelos de muerte celular tras irradiación reproduce más fielmente los datos experimentales, puede considerarse como común en todos ellos:

1) la existencia de dos componentes de muerte celular, cuya interpretación

mecanicista difiere según el modelo utilizado.

2) Las curvas de supervivencia obtenidas sobre células tumorales humanas irradiadas con fotones muestran una pendiente inicial finita representativa quizás de la existencia de lesiones irreparables (Malaise, 1987; Stephens, 1987).

Por otra parte, los datos experimentales, según la experiencia del grupo del Institute of Cancer Research (Steel, 1989c), pueden ser ajustados, con suficiente precisión, a cualquiera de los tres modelos matemáticos siguientes:

- i) Modelo de múltiples blancos con un componente crítico (Dewey, 1977).*
- ii) Modelo lineal-cuadrático en su forma más general (Chadwick, 1981).*
- iii) Modelo de lesión letal-potencialmente letal (Curtis, 1986).*

Cuando los datos de supervivencia celular frente a la dosis se representan en escala semilogarítmica, es posible distinguir, para todos ellos, dos componentes de muerte celular: a) uno, lineal y b) otro, curvilíneo. El primero de ellos, responsable de la pendiente inicial de la curva de supervivencia, se supone que refleja, con toda probabilidad, la producción de lesiones severas sobre el DNA, un tipo de lesión que puede ser ocasionada por la acumulación sobre lugares críticos del genoma de "clusters" ionizantes que se originan al final de la trayectoria de los electrones secundarios puestos en movimiento por la interacción de la radiación con el material biológico irradiado (Peacock, 1992b). Los modelos difieren, sin embargo, en la interpretación teórica que se supone para el componente curvilíneo.

Aceptando, finalmente, que los modelos descritos se ajustan con precisión a los datos experimentales, las variaciones de la radiosensibilidad celular intrínseca pueden, obviamente,

cuantificarse haciendo uso de los parámetros que definen cada modelo. Por razones que expondremos en otro apartado de esta memoria, hemos decidido utilizar, en nuestro trabajo, el modelo L-Q para el ajuste de los datos experimentales. Esto equivale a decir que los cambios de radiosensibilidad observados en distintas líneas celulares se traducen, en mayor o menor medida, por valores diferentes en la magnitud de α , de β o de ambos parámetros.

1.6. METODOS DE ESTUDIO DE LA RADIOSENSIBILIDAD A NIVEL MOLECULAR

Se acepta de manera general que la radiación mata a las células eucariotas a través del daño producido en la estructura y/o la función de su DNA (Painter, 1980; Ward, 1988a; Bender, 1974; Blöcher, 1982a, 1982b y Ward, 1990). Sin embargo, la relación entre lesión molecular cuantificada en términos de lesión de DNA, y letalidad celular no está aún firmemente establecida.

En los últimos años se han desarrollado numerosas técnicas capaces de proporcionar estimaciones cuali o cuantitativas de las lesiones inducidas por la radiación sobre la moléculas del DNA. La medida del daño producido sobre el DNA es importante en biología de la radiación por las siguientes razones:

1) La cuantificación precisa de algún tipo de lesión molecular radioinducida (supuesta la misma como la lesión biológicamente importante), puede permitir la predicción de la respuesta tanto a nivel celular (radiosensibilidad intrínseca) como a nivel tumoral (probabilidad de radio-curación).

2) *El conocimiento de los procesos moleculares que desencadenan la muerte celular radioinducida puede ofrecer nuevas vías para la investigación de moléculas capaces de modificar la radiosensibilidad celular.*

3) *Finalmente, los ensayos de lesión sobre el DNA pueden permitir la monitorización de la exposición medioambiental a la radiación y determinar la susceptibilidad al daño radioinducido en individuos profesionalmente expuestos a la radiación. Estos ensayos tendrían un enorme valor en el campo de la radioprotección.*

Las radiaciones ionizantes producen sobre el DNA celular diferentes tipos de lesiones entre las que se incluyen: i) rupturas simples de cadena; ii) rupturas dobles de cadena; iii) lesiones sobre bases y azúcares y iv) uniones cruzadas DNA-proteínas o DNA-DNA.

En ausencia de la caracterización inequívoca de algún tipo de lesión molecular como lesión letal, las investigaciones sobre el daño molecular se han dirigido a correlacionar la magnitud de este daño con el nivel de muerte celular que se deriva de la exposición a ciertas dosis de radiación. Recientemente, Whitaker y col (Whitaker, 1991) han sometido a revisión los distintos métodos y técnicas utilizados para estudiar el daño molecular radioinducido. Entre ellos destacan:

- a) la velocidad de sedimentación del DNA en gradiente de sucrosa (Lehman, 1970),*
- b) la elución alcalina (Kovacs, 1990),*
- c) la filtración en membrana (Center, 1970),*
- d) el test de micronúcleos (Midander 1980; Bush, 1993),*
- e) el ensayo del Halo (Vogelstein 1980; Roti Rotti, 1987) y*
- f) la electroforesis de campo pulsado (Schwartz, 1984; Blöcher, 1989; Stamato, 1990; Ager, 1990; Kawamura, 1989).*

La atención de los investigadores se ha dirigido en los últimos años hacia el análisis, por distintos procedimientos experimentales, de la cantidad de rupturas dobles de cadena de DNA (rdc) inducidas por la radiación. Este interés, que surge inicialmente por eliminación (no se ha demostrado que otras lesiones radioinducidas, como rupturas simples de cadena de DNA o lesiones sobre bases o azúcares, correlacionen con la muerte celular), ha encontrado, felizmente, apoyo experimental cuando se ha descrito por algunos autores:

1) la existencia de cierto grado de relación entre supervivencia celular y nivel de rdc cuantificado inmediatamente después de la aplicación de una dosis única de radiación (Radford, 1985; McMillan 1990);

2) la asociación entre la velocidad de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación y la radiosensibilidad de las células irradiadas (Kemp, 1985; Schwartz, 1988);

3) la dependencia entre nivel de rupturas dobles de cadena de DNA no reparadas después de cierto intervalo de tiempo y supervivencia celular obtenida tras irradiación cuando se utilizan tasas de dosis diferentes (Cassoni, 1992; Kemp, 1985; Blöcher, 1991).

Para explicar las diferencias en radiosensibilidad celular encontradas al comparar las curvas de supervivencia obtenidas sobre distintas líneas celulares y/o tras modificación de las condiciones experimentales de la irradiación, se han propuesto las siguientes hipótesis (Steel, 1989c):

a) La radiación de bajo LET produce sobre las células dos tipos de lesión 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).

b) *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 1991, Ruiz de Almodóvar 1993a).*

c) *La radiosensibilidad a bajas dosis debe estar fundamentalmente determinada por la inducción de lesiones no reparables (Steel 1989c; Peacock 1992b).*

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;*

iii) *la demostración de la existencia de un nivel de correlación estrecho entre los estudios cuantitativos de lesión molecular radioinducida y la supervivencia celular estimada mediante el ensayo de formación de colonias.*

1.6.1. Determinación de rdc de DNA utilizando la técnica de electroforesis de campo pulsado

Probablemente, el más novedoso de los ensayos de cuantificación de rupturas dobles de cadena de DNA sea la técnica conocida como "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE). Esta metodología ha ampliado enormemente su campo de aplicación desde que fue originalmente descrita (Schwartz, 1984). Recientemente ha sido utilizada para la estimación del número de rdc de DNA inducidas por la radiación (Blöcher 1989; Stamato 1990; Ager 1990; Iliakis 1991a, 1991b; Whitaker 1992, 1992b).

El fundamento de la técnica es el siguiente: cuando el DNA celular resulta forzado a moverse a través de un polímero de agarosa, bajo el efecto de una fuerza eléctrica unidireccional, moléculas de menos de 30 Kpb (Kilo pares de bases) migran a una velocidad proporcional a su propio tamaño. Por el contrario, las moléculas de mayor tamaño que el anteriormente indicado, migran todas ellas a velocidad constante. Por esta razón, fragmentos de DNA superiores a 30 Kpb no pueden ser separados. Sin embargo, la alternancia en la dirección de la fuerza del campo eléctrico, esto es, el campo pulsante, consigue que las moléculas de mayor tamaño sufran un proceso de relajación y de reorientación antes de que comiencen a moverse en la nueva dirección marcada por la fuerza eléctrica. El efecto es tamaño-dependiente y permite la separación de mayores fragmentos de DNA. La resolución se facilita utilizando una angulación de campos determinada, (120°), largos tiempos de pulso (60 minutos aproximadamente) y baja fuerza eléctrica ($V < 5 \text{ v/cm}$) (Anand, 1990). En estas condiciones, es posible separar fragmentos de DNA de hasta 12 Mpb y conocer su tamaño haciendo uso, para ello, de una recta de calibración obtenida midiendo la distancia a la que se desplazan moléculas de DNA de conocido tamaño.

1.7. OBJETIVOS

La hipótesis actual relativa a la naturaleza de las lesiones inducidas por las radiaciones ionizantes en células eucariotas, postula que la pérdida de la capacidad clonogénica y la muerte celular ocasionada por la radiación derivan del daño producido en la estructura y/o en la función del DNA de la célula (Painter 1980, Ward, 1988). Si bien es conocido que las células de los mamíferos disponen de mecanismos eficaces para reparar las lesiones que se producen espontáneamente, o que son producidas por distintos agentes en su DNA (Frankenberg-Schwager, 1989), no todas las lesiones son susceptibles de reparación (Ward, 1988). Es evidente que algunas de ellas son irreparables y, por tanto, deben ser consideradas como letales (Bryant, 1988). Otras lesiones, en cambio, son potencialmente

reparables (Elkind 1990, Eguchi-Kasai 1991). Las consecuencias celulares que resultan de este segundo tipo de lesiones dependen de la competencia entre los procesos celulares de reparación o de fijación del daño radioinducido (Curtis, 1986; Peacock 1992b). La identificación de uno u otro tipo de lesiones, así como la comprensión de los procesos que conducen a la muerte celular tras irradiación, exige la profundización en el estudio de los aspectos moleculares de la Radiobiología y la disponibilidad de métodos y técnicas capaces de cuantificar el número y el tipo de las lesiones producidas (Whitaker, 1991; Ruiz de Almodóvar, 1993, 1993b). En este sentido, estudiando las relaciones Dosis/Respuesta para diferentes tipos de daño, se ha podido demostrar que la ruptura doble de cadena del DNA constituye la lesión más importante en lo que a muerte celular se refiere (Frankenberg, 1981). Por otra parte, haciendo uso de la técnica de electroforesis de campo pulsado, es posible cuantificar el número de rupturas dobles de cadena de DNA inducidas por la radiación (Ruiz de Almodóvar, 1994a), analizar la cinética de reagrupamiento de esas cadenas rotas (Schwartz, 1990; Giaccia, 1992; Whitaker, 1993; Núñez, 1994) y determinar el nivel de daño residual radioinducido Dahn-Daphi, 1993; Blöcher, 1991).

El conocimiento de los parámetros determinantes de la radiosensibilidad a nivel molecular puede suponer un importante avance en el nivel de nuestros conocimientos sobre biología tumoral y sus resultados pueden ser de rápida aplicación en protocolos terapéuticos de pacientes oncológicos (West, 1992). Por ello, utilizando como modelo para el estudio de tumores humanos las siguientes líneas celulares tumorales establecidas: MCF-7 BUS, MCF-7 BB, T47D-B1, T47D-B8, EVSA-T y RT-112, planteamos el desarrollo de este trabajo de investigación, orientado hacia la consecución total o parcial de los siguientes objetivos:

1) Estudiar las relaciones dosis de radiación / efecto biológico producido a dos niveles biológicos diferentes: i) molecular, cuantificando el número de rupturas dobles de cadena de DNA producido por la radiación y ii) celular, estimando el porcentaje de células irradiadas que conservan la capacidad clonogénica.

2) *Determinar la velocidad de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación, analizar la cinética del proceso y establecer el nivel de daño residual irreparable.*

3) *Definir la "radiosensibilidad intrínseca" de cada uno de los modelos tumorales ensayados, describir las relaciones existentes entre los parámetros celulares y moleculares derivados del estudio y validar, si es posible, el ensayo molecular como elemento predictivo del efecto final del tratamiento radiante.*

4) *Desarrollar un procedimiento alternativo de cuantificación de la lesión molecular radioinducida basado en la lectura densitométrica de los geles procedentes de electroforesis de campo pulsado.*

Finalmente, este trabajo de investigación tratará de demostrar que el uso de un método de análisis de lesión molecular (rdc de DNA) inducida por la radiación, el cálculo de los parámetros significativos de radiosensibilidad a nivel molecular y el estudio de correlación de éstos con los parámetros indicadores clásicos de radiosensibilidad celular, puede lograr la sustitución de los ensayos celulares predictivos de respuesta a la radiación ionizante, actualmente restringidos a muy pocos y muy especializados laboratorios, por ensayos moleculares predictivos de radiorrespuesta, cuya aplicación generalizada parece más posible.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. INSTRUMENTACION

2.1.1 Estufa para Cultivos Celulares

Se han utilizado incubadores ASSAB t/304, termostatzados y con regulador de dióxido de carbono. Las experiencias de cultivo se llevaron a cabo a la temperatura de 37 °C, en aire con 5% de CO₂ y atmósfera saturada de humedad. El control, tanto de temperatura como de gases se ha realizado automáticamente mediante dispositivos electrónicos. La saturación de vapor de agua se logró haciendo burbujear el CO₂, inyectado en el incubador, a través de dos cubetas llenas de agua destilada. La exactitud del sensor térmico se ha situado en torno a ± 0.05 °C, y las variaciones de temperatura en el interior de la estufa no superaron los ± 0.3 °C. Para la regulación de la presión parcial de CO₂ se utilizó un sensor basado en la medida 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 %.

2.1.2 Cámara de Flujo Laminar

Se ha utilizado una cabina de flujo laminar suministrada por Flow Laboratories, para evitar la contaminación biológica de los cultivos celulares. La circulación de aire en dirección vertical, con velocidad máxima de 0.46 m/s se estableció 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 μ de diámetro) garantizaron el mantenimiento de las condiciones de esterilidad necesarias para llevar a cabo las experiencias.

2.1.3 Microscopio Invertido

Hemos utilizado un microscopio invertido Olympus IMT/201 dotado con tres objetivos x 10, x 20 y x 40 y ocular para fotografía con contraste de fases.

2.1.4 Microscopio Optico

Hemos utilizado, también, un microscopio óptico convencional Olympus CHB con aumentos x 10, x 40, x 100. Este microscopio fue utilizado para efectuar los contajes celulares necesarios (cámara de Neubauer).

2.1.5 Espectrómetro de Centelleo Líquido

Se ha utilizado un espectrómetro de centelleo líquido, marca Beckman, modelo LS 2800, de Beckman Instruments Inc., con capacidad para 336 o 648 muestras que pueden ser analizadas automáticamente en tres canales energéticos. El proceso de centelleo se fundamenta en la conversión de parte de la energía cinética de la partícula ionizante emitida por el trazador radiactivo en fotones luz al quedar dicha radiación atenuada, o frenada, en ciertos materiales. Cuando se utiliza como material centelleador un compuesto orgánico (tolueno, benceno o dioxano, p. ej.) como disolvente de compuestos orgánicos especiales (solutos como PPO, POPOP o Butil-PBD), el proceso se denomina centelleo líquido y a la disolución centelleadora líquido de centelleo o fósforo. El material radiactivo, solubilizado en ese líquido, puede ser analizado en condiciones de máxima eficiencia. El equipo utilizado por nosotros corrige, de manera automática, la extinción (quenching) de la muestra haciendo uso del procedimiento de relación de canales externos y utilizando ^{137}Cs como fuente radiactiva externa. Todas las determinaciones de radiactividad en las muestras han sido efectuadas preseleccionando un tiempo de contaje mínimo de 5 minutos o acumulando un número de cuentas suficiente para que el error estadístico del contaje fuese menor del 1%. Se realizó también sustracción automática de la radiación de fondo. Como líquido de centelleo se ha utilizado una mezcla fabricada por Beckman y comercializada con el nombre Ready Safe.

2.1.6 Centrifuga Refrigerada

Se ha utilizado una centrifuga convencional marca Beckman, modelo TJ/6, dotada con una unidad adicional de refrigeración que permite centrifugar muestras a baja temperatura. La centrifuga consta de un rotor con soportes intercambiables para la centrifugación simultánea de un número de muestras variable (4 a 120 muestras). La máxima velocidad de centrifugación depende del rotor utilizado.

2.1.7 Cámara Frigorífica

Para el almacenamiento de reactivos y tampones así como para la realización de experimentos a baja temperatura hemos utilizado una cámara frigorífica instalada por Pedro y López S.A. cuya temperatura está regulada a 4 ± 1 °C.

2.1.8 Congeladores

Para el almacenamiento de muestras se ha utilizado un arcón congelador, marca Selecta, modelo 455, capaz de alcanzar la temperatura de -80 °C. La temperatura de operación durante todo el tiempo que ha durado este trabajo, ha sido de -75 °C.

Se han utilizado también congeladores y frigoríficos convencionales.

2.1.9 Contenedor de Nitrógeno Líquido

Las líneas celulares tumorales establecidas, utilizadas en este trabajo, se han almacenado, de manera rutinaria, congeladas a -173 °C, en un contenedor relleno de nitrógeno líquido, marca Thermolyne Locator, modelo CY50900.

2.1.10 pH metro

Para la regulación del Ph de los medios de cultivo celular y de los tampones empleados, hemos utilizado un pHmetro suministrado por la firma Orion Research, modelo 501, cuya precisión se estima en 0.01 unidades de Ph.

2.1.11 Balanza de Precisión

Se ha utilizado una balanza de precisión Mettler H 35-AR capaz de alcanzar la décima de miligramo.

2.1.12 Unidad de Filtración

Se han utilizado sistemas de filtración asépticos Millipore XX11 047 10 previamente esterilizados en autoclave. Dicho sistema consta de dos receptáculos, el superior de 250 ml de capacidad, utilizado para introducir el material líquido a esterilizar y el inferior, con igual capacidad para recoger el líquido filtrado. Ambos receptáculos están separados por una membrana de filtración recambiable de 0.22 μ de tamaño de poro y 47 mm de diámetro, tipo Millipore GSWP 047 00

2.1.13 Sistema de Electroforesis de Campo Pulsado

Se ha utilizado un equipo para electroforesis de campo pulsado suministrado por BioRad, modelo CHEF-DRII con el que es posible resolver, en función de su tamaño, fragmentos de DNA comprendidos entre 100 bases y $10-12 \cdot 10^6$ pares de bases. El sistema incluye la cubeta de electroforesis, la fuente de alimentación capaz de alcanzar los 120 voltios y dos módulos para control, uno de ellos (200/2.0 power supply) que permite regular la diferencia de potencial e indica la intensidad de corriente que circula y el otro (Pulsewave 760 switcher) que regula la intermitencia del campo pulsante y la duración total de la electroforesis.

Para la preparación de geles se han utilizado soportes construidos en lucita de distintas dimensiones. El "pocillo" en el gel se ha preparado utilizando un "peine" apropiado.

Finalmente, como quiera que fue necesario regular la temperatura del tampón de electroforesis a aproximadamente 14 - 16 °C, el sistema incorporó una bomba peristáltica de velocidad variable (BioRad) que hace circular el tampón a través de un criostato marca Selecta.

2.1.14 Transiluminador

Para la visualización de geles teñidos con bromuro de etidio hemos utilizado un transiluminador ultravioleta (312 nm de longitud de onda) suministrado por TDI laboratorios, modelo TC-312 A.

2.1.15 Cámara Fotográfica

Los geles, bajo iluminación ultravioleta, fueron fotografiados utilizando una cámara Polaroid, modelo CU-5 88-48.

2.1.16 Citómetro de Flujo

Para estudiar la distribución de elementos celulares en cada una de las fases del ciclo celular, así como la concentración intracelular de glutatión, hemos utilizado un citómetro de flujo ORTHO CYTERON, existente en el Departamento de Anatomía Patológica. La proporción de células existente en las diferentes fases del ciclo fue calculada utilizando el programa "Cell Cycle" de Ortho.

2.1.17 Unidades de Irradiación

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación en el laboratorio del Institute of Cancer Research, (Sutton, U.K) se utilizó una unidad para irradiación experimental de 33

TBq de ^{60}Co . Los experimentos de irradiación se efectuaron siempre utilizando una tasa de dosis comprendida entre 1 y 2 Gy/min.

La parte experimental de este trabajo realizada en el Laboratorio de Biología Tumoral de Granada se realizó utilizando una unidad de ^{60}Co Theratron 780 de 66 Tbq. Como en el caso anterior, la tasa de dosis se ajustó a valores comprendidos entre 1 y 2 Gy/min.

2.1.18 Lector de Densidad Óptica para Placas de Múltiples Pocillos

Para experimentos de proliferación celular hemos utilizado un lector automático basado en la lectura densitométrica de la coloración existente en placas de cultivo de 96 pocillos. El equipo, suministrado por la firma ICN Flow, se denomina Titertek Multiskan modelo MK11.

2.2. REACTIVOS

2.2.1 Medios de Cultivo

Como medio nutriente de las líneas celulares estudiadas en este trabajo hemos utilizado los siguientes medios sintéticos: Mínimo Esencial Medio suplementado con sales de Earle (MEM), Mínimo Esencial Medio con sales de Earle modificado por Dulbecco (DMEM) y Ham's F-12. Todos ellos fueron suministrados por ICN Flow Laboratories (USA).

2.2.2 Suero de Feto de Vaca

Todos los medios de cultivo utilizados fueron suplementados con un 10% de suero de feto de vaca (FCS) inactivado térmicamente por calefacción a 56°C durante 30 minutos. El FCS fue suministrado por Biospa GmbH (Alemania).

2.2.3 Otros suplementos para Cultivo Celular

Se ha utilizado de manera rutinaria los siguientes suplementos para cultivo celular: Hepes (Sigma), Bicarbonato sódico (Merck), L-glutamina (Sigma) y antibióticos (penicilina, estreptomicina, gentamicina).

2.2.4 Tripsina-Verseno

Para el subcultivo de las líneas celulares, al igual que para el inicio de cada experimento, las células se separaron del soporte sólido utilizando una disolución estéril de Tripsina (0.05%)-Verseno (0.02%). Ambos reactivos fueron obtenidos de ICN Flow Laboratories.

2.2.5 Tampón Estándar de Fosfato (PBS)

El tampón PBS fue obtenido disolviendo 3.56 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.52 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 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 reguló a 7.2.

2.2.6 Tampón Tris-Bórico-EDTA (TBE)

El tampón TBE utilizado en electroforesis de campo pulsado se preparó disolviendo 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. Se obtuvo, así, una disolución de concentración diez veces superior (10x) a la estándar. En los experimentos de PFGE la solución madre fue diluida 20 veces (0.5x). El Ph de la disolución se ajustó a 8.2.

2.2.7 Sal Disódica de Etilen-Diamino-Tetra Acético (EDTA)

Se utilizó EDTA disódico (Sigma) a concentración 0.5 M, para preparar distintas disoluciones tampón.

2.2.8 Tampón de Lisis

Para lisar las células y permitir la movilidad del DNA en el gel de electroforesis se utilizó un tampón preparado con n-lauryl-sarcosine (Sigma) al 2 %, proteinasa K 0.5 mg/ml en EDTA 0.5 M. El Ph del tampón de lisis fue ajustado a 7.6.

2.2.9 Agarosa

En la preparación de geles para electroforesis se ha utilizado 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" se utilizó 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).

2.2.10 Bromuro de Etidio

Para la tinción del DNA sometido a electroforesis en gel se ha utilizado una disolución de bromuro de etidio (Sigma) de concentración 0.5 µg/ml.

2.2.11 Ioduro de Propidio

La distribución de elementos celulares en el ciclo mitótico se estudió utilizando como colorante para la tinción del DNA una disolución al 2 % de ioduro de propidio (Sigma).

2.2.12 Triton X-100

Antes de estudiar la población celular por citometría de flujo, las células se trataron con tritón X-100 (Sigma) al 0.05 % para permitir la permeabilización de las membranas.

2.2.13 Tampón Glicina

Se utilizó, para técnicas de citometría de flujo, un tampón preparado con 0.75 g de glicina (Sigma) en 300 ml de agua bidestilada. El Ph de la disolución se ajustó a 10.

2.2.14 Líquido de Centelleo

Para cuantificar la radiactividad (^{14}C) incorporada al DNA celular y estimar, tras electroforesis de campo pulsado, la lesión molecular producida por la radiación sobre las células, hemos utilizado como líquido de centelleo, una mezcla preparada por Beckman y comercializada con el nombre de Ready Safe. Dicha mezcla centelleadora permite la solubilización de muestras acuosas siendo el grado de extinción obtenido en el contaje suficientemente bajo.

2.2.15 Otros Reactivos Químicos

Para la regulación del Ph de las disoluciones tampón se utilizaron, cuando fue necesario, disoluciones de Hcl, NaOH y de acetonitrilo de concentración apropiada. En el proceso de fusión del gel, antes de someterlo a contaje de radiactividad, se utilizó una disolución de Hcl 0.1 N. Una vez fundido el gel, la disolución resultante se neutralizó con NaOH 0.1 N.

2.2.16 Enzimas

En distintas fases de nuestro trabajo experimental hemos utilizado determinadas enzimas como proteinasa-k (Sigma) y la RNAasa (Sigma).

2.2.17 Mezcla de Gases

En determinados experimentos de formación de colonias o de estimación del daño radioinducido, los cultivos celulares se llevaron a cabo gasificando los frascos con una mezcla de gases formada por 5 % CO_2 , 3 % O_2 y 92 % de N_2 .

2.2.18 Violeta de Genciana

Para la tinción de las colonias formadas por las células (ensayo clonogénico) se utilizó una disolución de violeta de genciana en alcohol absoluto preparada a la concentración del 2 %.

2.2.19 Precursores Radiactivos

En el estudio de la inducción o de la reparación de rdc de DNA, tras irradiación celular, se utilizó como trazador una disolución acuosa de 2-¹⁴C-Timidina suministrada por Amersham con actividad específica 1.92 Gbq/mmol.

2.3. MATERIAL FUNGIBLE

2.3.1 Material de Plástico para Cultivos Celulares

Se han utilizado frascos de poliestireno de un solo uso, estériles, suministrados por Nunc, de buena calidad óptica. La superficie de crecimiento, plana, proporciona cultivos de distribución celular uniforme. Como el poliestireno manufacturado es hidrofóbico y no proporciona una superficie adecuada para el crecimiento celular, los frascos de cultivo necesitan ser tratados con radiación gamma, compuestos químicos o con electricidad. De esta manera, la superficie queda cargada eléctricamente y preparada para la adherencia de las células. A lo largo de este trabajo hemos utilizado frascos de cultivo de 25 cm² y de 80 cm² de superficie.

Por otra parte, los experimentos de crecimiento celular se realizaron utilizando placas de cultivo de 96 pocillos, construidas también con poliestireno, suministradas por Costar (Cambridge, Mass.). Fue necesario utilizar también tubos de plástico estériles, tipo universal de fondo cónico, que fueron suministrados por Eurolab (España). Finalmente, hemos utilizado

también viales para congelación en nitrógeno líquido (Nunc), así como tubos de plástico de diferentes tamaños, estériles y no estériles.

2.3.2 Pipetas

Nuestro trabajo de investigación ha requerido el empleo de pipetas de plástico estériles de volumen variable (1 a 25 ml) suministradas por Costar (Cambridge, Mass.), micropipetas de capacidad variable (5 a 1000 μ l) suministradas por Cultek (España), así como puntas para micropipetas de tamaño adecuado y pipetas de vidrio tipo Pasteur.

2.3.3 Filtros

Para esterilización de pequeños volúmenes de disoluciones o medios de cultivo, se han utilizado filtros de un solo uso Millipore HAWR 02500 con tamaño de poro de 0.22 μ .

2.3.4 Viales de Centelleo

El contaje de muestras radiactivas se efectuó en viales de vidrio con bajo contenido en potasio, de 15 ml de capacidad, que fueron suministrados por Beckman.

2.3.5 Otro Material

Hemos utilizado también diverso material tanto de vidrio como de plástico para la realización de los experimentos. Entre este material cabe citar: vasos de precipitado, probetas, erlenmeyer, quitasatos, filtros, embudos, y otros dispositivos.

2.3.6 Películas Fotográficas

Para la fotografía de geles tras iluminación ultravioleta hemos usado una película fotográfica Polaroid modelo 667 (Gran Bretaña).

2.4. MODELOS TUMORALES

Como modelos tumorales se han utilizado las siguientes líneas celulares de cáncer humano cultivadas en monocapa:

a) MCF-7, establecida por Soule y col. (Soule, 1973). La aplicación de este modelo al estudio de la proliferación celular inducida por los estrógenos ha resultado enormemente fructífera. Se han ensayado dos clones diferentes de esta línea celular, uno de ellos el clon MCF-7 BB, procedente del Institut "Jules Bordet" de Bruselas, y el otro el clon MCF-7 BUS procedente de Tufts University de Boston. Ambos clones difieren ligeramente en parámetros cinéticos y sus diferencias en la respuesta a las hormonas esteroideas parecen más claras (Olea, 1993). Ambas líneas celulares son sensibles al estradiol y proliferan a nivel óptimo utilizando como medio de cultivo Medio Mínimo Esencial con sales de Earle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero de feto de vaca (FCS) e inactivado térmicamente, por calefacción en baño termostatzado, a 56 °C durante 30 minutos. El tiempo de duplicación de la población celular cultivada en estas condiciones ha resultado ser de 40.0 ± 3.5 horas (Soto, 1985; López-González, 1989). Por otra parte, cuando se eliminan los estrógenos endógenos del suero, tratando éste con carbón-dextrano, el ritmo de proliferación de las células MCF-7 se enlentece, habiéndose demostrado,

i) que existe una relación inversa entre concentración de suero y rendimiento proliferativo celular (Soto, 1987). Cuando el cultivo se realiza en DMEM + 10% de suero humano tratado con carbón dextrano, la proliferación celular es prácticamente nula (Tiempo de duplicación, $T_D = 377$ horas, (Soto, 1985)).

ii) que la adición de pequeñísimas cantidades de estradiol al medio ($[E_2] = 10^{11} - 10^{10}$ M) promueve el crecimiento de los elementos celulares del cultivo. El valor del tiempo

de duplicación en estas condiciones, ($T_D = 39.6 \pm 3.1$ horas, (Villalobos, 1987)), ha resultado ser equivalente al encontrado en condiciones basales.

iii) que las células MCF-7 son sensibles al antiestrógeno Tamoxifeno. La acción de este antiestrógeno es fase dependiente (Sutherland, 1983). El punto de máxima sensibilidad celular se encuentra en fase G1, y fuera de este punto, el tamoxifeno ejerce una acción mínima. Cuando el antiestrógeno se utiliza a bajas concentraciones (10^8 - 10^7 M) se induce una alteración del equilibrio de distribución de los elementos celulares en las distintas fases del ciclo mitótico, prolongándose la fase presintética y haciéndose predominante el número de células detenidas en G1. Esta sincronización es máxima a los tres días de tratamiento con tamoxifeno (Sutherland, 1983).

iv) que en condiciones de sincronización parcial del cultivo, por tratamiento con antiestrógenos, si se libera a las células de esta molécula y se añade E_2 , se puede demostrar el efecto proliferativo de los estrógenos a través del acortamiento del tiempo de duplicación ($T_D = 24.8 \pm 1.7$ horas cuando el rescate se realiza por simple cambio de medio, o $T_D = 22.2 \pm 1.0$ horas cuando el rescate se efectúa utilizando medio de cultivo completo suplementado con estradiol) (López-González, 1989).

Es posible demostrar también que, en estas últimas condiciones experimentales, a) la práctica totalidad de las células contribuyen al crecimiento de la población celular (Fracción de crecimiento = 0.94), b) el tiempo de duplicación se aproxima al tiempo de ciclo ($T_c = 21.3$ horas, (Jakesz, 1984; López González, 1989), c) el crecimiento de los elementos celulares es prácticamente sincrónico (Olea, 1987, López-González, 1990) y d) existen modificaciones de la concentración intracelular de las proteínas ER y PgR ligadas a la progresión celular a lo largo del ciclo mitótico (del Moral, 1991).

b) T47D, esta línea celular establecida en cultivo a partir de un tumor de mama metastásico (Keydar, 1979) ha sido empleada, también, en estudios de hormonosensibilidad demostrando un comportamiento proliferativo frente a estrógenos y antiestrógenos similar al descrito para MCF-7 (Soto, 1986). Se han ensayado dos clones diferentes de esta línea celular, uno de ellos el clon T47D-B1, y el otro el clon T47D-B8 procedentes ambos de Tufts University de Boston.

c) EVSA-T, establecida por Lippman y col en 1975 (lippman, 1975). Es también una línea celular procedente de una enferma afecta de cáncer de mama. El T_D de esta línea celular, en condiciones de cultivo estándar, ha resultado ser de 30.5 ± 2.4 horas (Gorgojo, 1988). La diferencia fundamental respecto a los dos modelos anteriormente descritos es que su respuesta proliferativa no resulta influenciada por la presencia/ausencia de estrógenos en el medio de cultivo. Sin embargo, en determinadas condiciones experimentales, es posible demostrar la presencia de proteínas capaces de ligar específicamente el estradiol (del Moral, 1990b) o la progesterona (del Moral, 1990b; Devleeschouwer, 1986).

d) RT-112, establecida por Master y col. en 1986 (Master, 1986). Es una línea celular procedente de un paciente afecto de cáncer de vejiga humano. La razón fundamental de la inclusión de este modelo tumoral en el proyecto de investigación que se presenta es el hecho de que las células RT-112 son "relativamente resistentes" a la radiación ionizante de bajo LET (Steel, 1989c), siendo la fracción de supervivencia tras exposición única de las células a dosis de 2 Gy del orden del 70%.

La razón que justifica la utilización de esta línea celular en el presente trabajo de investigación nace de la necesidad de comprobar sobre distintas líneas celulares (y distintos clones procedentes de ellas) la existencia o no de modificaciones de los parámetros de

Radiosensibilidad Intrínseca que deriven de la propia naturaleza de las células en cultivo (Steel, 1989c; Yang, 1991).

2.5. CINETICA DE CRECIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

Para calcular los parámetros derivados del crecimiento de los cultivos en condiciones experimentales estándar, se utilizó el método colorimétrico basado en la captación intracelular de sulfo-rodamina B. Brevemente descrito, el procedimiento experimental consistió en lo siguiente:

1) mediante tripsinización de la monocapa, se recogieron células en fase de crecimiento exponencial se y se sembraron alícuotas de la suspensión celular resultante en placas multipozo. Las condiciones de crecimiento fueron las estándar. Tras dejar que las células se adhirieran al soporte se separó una de las placas de cultivo para obtener la valoración colorimétrica del número inicial de células sembrado. La proliferación celular se estudió cada período de 24 horas separando cada día una de las placas inicialmente sembradas;

2) una vez retirada la placa correspondiente, se fijaron las células añadiendo al medio de cultivo ácido tricloro-acético frío hasta alcanzar una concentración final del 10 %. En estas condiciones, las placas se mantuvieron durante 20 minutos a la temperatura de 4 °C. Este tratamiento del tapiz celular fija las células firmemente al soporte. Se eliminó por decantación el líquido contenido en los pocillos, las placas se lavaron con abundante agua y se secaron después mediante un chorro de aire templado dejándolas, así, listas para ser teñidas. Aunque cada una de las placas se puede teñir en el momento en el que se retira del incubador, la tinción de todas ellas se realizó al término de cada experimento;

3) para teñir las células fijadas se utilizó sulforodamina B a una concentración del 0.4% en ácido acético preparado al 1%. Se dejó actuar el colorante durante 20 minutos, después se decantó y se lavó el tapiz con ácido acético al 1 % para eliminar el colorante no enlazado a las células. Se dejaron secar las placas y, posteriormente, se solubilizó el colorante utilizando 500 μ l de tampón Tris 10 Mm a pH 10.5;

4) finalmente, se procedió a la lectura de densidades ópticas utilizando un Titertek Multiskan con filtro de 492 nm. Los resultados obtenidos se convirtieron en número de células utilizando una recta patrón previamente construida para cada línea celular. Finalmente, el ajuste por mínimos cuadrados de los datos de crecimiento a la función

$$N_t = N_0 \cdot \exp[(-\ln 2/T_D) \cdot t]$$

donde N_t y N_0 representan respectivamente el número de células al tiempo t y el número inicial de células, hizo posible el cálculo del tiempo de duplicación T_D , parámetro que caracteriza el crecimiento de los elementos celulares en el cultivo.

2.6. EL ENSAYO DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Mediante tratamiento del tapiz celular y después de eliminado el medio de cultivo, con 1 ml de tripsina-EDTA (0.05 % - 0.02 %), se colectaron células, en condiciones de crecimiento exponencial y se sembraron a densidad suficiente (variable en función de la dosis y de la línea celular) como para obtener entre 50 y 100 colonias tras tratamiento. Para permitir que las células se adhirieran a la monocapa, la irradiación se efectuó 4 horas después de la siembra. Las dosis de radiación utilizadas fueron 0, 2, 3, 6, 9 y 12 Gy (tres frascos de cultivo por cada valor de la dosis), la tasa de dosis se ajustó a 1.8 Gy/min y las cajas de cultivo fueron irradia-

das a la temperatura de 37 °C. Después de la irradiación, las células se incubaron en condiciones normales (37 °C, 5% CO₂, saturación de humedad o utilizando la mezcla de gases descrita en el apartado 2.2.18), durante 14-21 días, al cabo de los cuales se eliminó el medio de cultivo y las colonias formadas se tiñeron con violeta de genciana. Tras lavar abundantemente con agua para eliminar el exceso de colorante se contaron las colonias formadas (se consideraron colonias aquellas agrupaciones de células con 50 elementos como mínimo).

La fracción de supervivencia celular (FS) se calculó mediante la expresión:

$$FS = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Colonias observado}}{\text{N}^\circ \text{ de células plantadas} \times \text{Eficiencia clonaje}}$$

siendo la eficiencia de clonaje la capacidad de formación de colonias de las células no tratadas.

Cada experimento se repitió, al menos, tres veces.

Para calcular los parámetros de supervivencia celular los datos de fracción de supervivencia en función de la dosis se ajustaron al modelo lineal cuadrático. Para ello utilizamos un programa de ordenador denominado GraphPad Implot (GraphPad Software) dotado de ajuste de curvas por el procedimiento de regresión no lineal.

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

$$FS = \exp[-(\alpha D + \beta D^2)]$$

El ajuste de los puntos experimentales a este modelo matemático permite deducir los parámetros α y β como indicadores de la radiosensibilidad celular intrínseca. Otro parámetro de enorme interés en Radiobiología es la fracción de supervivencia a 2 Gy (FS2). Este valor se calculó (media \pm error estándar) a partir de los resultados experimentales encontrados tras irradiación a 2 Gy, en las distintas curvas de supervivencia realizadas.

2.7. RADIOSENSIBILIDAD A NIVEL MOLECULAR

Células en fase de crecimiento exponencial se tripsinizaron y se sembraron en cajas de cultivo T-25 para obtener un número final de $2-4 \cdot 10^5$ células por caja y se cultivaron en monocapa, durante 48 horas, en condiciones de cultivo estándar suplementando el medio con $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Timidina (actividad específica 1.9 GBq/mmol) a concentración final 0.05 $\mu\text{Ci/ml}$. Transcurrido este período de tiempo, se cambió el medio de cultivo por medio libre de timidina radiactiva y se mantuvieron las cajas en las mismas condiciones durante 18-24 horas más. Este procedimiento, común en todos los experimentos de radiosensibilidad molecular realizados, permitió el marcaje de las células con ^{14}C y, al mismo tiempo, aseguró el mantenimiento de la fase de crecimiento exponencial. En estas condiciones se realizó la irradiación.

2.7.1 Lesión Molecular Inicial Radioinducida

Para estimar el número de lesiones moleculares inducidas por la radiación ionizante sobre las células, éstas, tratadas en la forma explicada en el apartado anterior, se colectaron por disgregación mecánica de la monocapa (utilizando una espátula de material plástico flexible) en 3 ml de tampón PBS frío. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet celular se resuspendió en 300 µl de agarosa tipo IX al 1 % en PBS. Una alícuota de la suspensión celular resultante se pipeteó sobre un molde (BioRad, 250 µl) y se mantuvo a 4°C hasta completa gelificación (aproximadamente 1 hora). Los "plugs" obtenidos se transfirieron a tubos universales conteniendo DMEM + 10% FCS a la temperatura de 0 °C. La irradiación se efectuó a esta misma temperatura introduciendo los viales en hielo picado fundente y las dosis de radiación administradas fueron 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 Gy. La tasa de dosis fue de 7 Gy/min. Los viales conteniendo los "plugs" de la suspensión de células en agarosa se mantuvieron a 0 °C hasta que se realizó el paso experimental descrito en el apartado 2.7.4.

2.7.2 Cinética de Reagrupamiento de Cadenas de DNA Rotas por la Radiación

Para el estudio de la cinética de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación se siguió, inicialmente, un procedimiento experimental que incluyó el marcaje de los elementos celulares con ¹⁴C-Timidina análogo al descrito en el apartado 2.7. Una vez obtenida la población celular "marcada" el procedimiento continuó como sigue:

Se sustituyó el medio de cultivo por medio a la temperatura de 0 °C y las cajas se introdujeron en hielo picado fundente para evitar procesos de reparación de las lesiones moleculares radioinducidas durante el tiempo de irradiación. Las células se irradiaron en

monocapa a una dosis total de 45 Gy (tasa de dosis 1.8 Gy/min). Tras irradiación se reemplazó 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 fue variable: 0, 5, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos y 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. El reagrupamiento de las cadenas de DNA se detuvo en cada uno de los tiempos anteriormente especificados, por adición de PBS frío y los frascos se transfirieron a la cámara fría (temperatura 4 °C). Al término del periodo máximo de reagrupamiento permitido (24 horas), las células de todas las cajas fueron colectadas por disgregación mecánica, lavadas con PBS frío y centrifugadas a 4 °C. El pellet celular obtenido se resuspendió en 300 µl de agarosa tipo IX al 1% en PBS. Una alícuota de la suspensión celular resultante se pipeteó sobre un molde (BioRad, 250 µl) y se mantuvo a 4°C hasta completa gelificación (aproximadamente 1 hora). Una vez obtenidos los "plug" éstos se trataron de acuerdo con el procedimiento que se describe más adelante (apartado 2.7.4).

2.7.3 Daño Residual

Para estudiar la proporción de lesiones moleculares radioinducidas no reparadas por los sistemas enzimáticos celulares los experimentos se realizaron siguiendo en procedimiento que se describe a continuación.

Células marcadas con ^{14}C tal y como se describe en el apartado 2.7, fueron irradiadas utilizando una fuente de ^{60}Co de 2 TBq y baja tasa de dosis (2 Cgy/min) hasta alcanzar dosis totales comprendidas entre 0 y 60 Gy. La temperatura de irradiación se mantuvo a 37 °C utilizando un incubador. Terminada la irradiación se permitió que las células reparasen las lesiones radioinducidas durante un período adicional de 4 horas. De esa manera es posible

estimar el daño residual (Ruiz de Almodóvar, 1993). Finalmente las células se despegan del tapiz por disgregación mecánica y se mezclan con agarosa para formar "plugs" siguiendo la misma metodología descrita en el apartado anterior. Una vez obtenidos los "plugs" éstos se trataron de acuerdo con el procedimiento que se describe a continuación.

2.7.4 Lisis de las Células Incluidas en "Plugs"

Para permitir la movilidad electroforética del DNA de las células tratadas hay que someter el "plugs" de agarosa a la acción de una solución tampón capaz de destruir las membranas celulares por solubilización y de separar las proteínas que junto con el DNA constituyen la cromatina (Iliakis, 1991a). Para ello, hemos utilizado la solución tampón que ha sido descrita en el apartado 2.2.8. Al término de los experimentos descritos en apartados anteriores, los "plugs" se introdujeron en tubos universales a los que se añadió un volumen de 5 ml de tampón de lisis. El tampón se dejó actuar durante una hora a la temperatura de 4 °C y después los tubos se transfirieron a una estufa regulada a 37 °C durante 24 horas más. Este procedimiento se estima suficiente para la liberación completa del DNA intracelular. Terminado el proceso de lisis, el estudio electroforético del DNA puede hacerse inmediatamente o tras almacenamiento de las muestras a 4 °C durante periodos de tiempo no superiores a 15 días. Tiempo mayores de almacenamiento facilitan la degradación del DNA (Whitaker, 1992a).

2.8. ESTIMACION DE PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD MOLECULAR

Fragmentos de los "plugs" conteniendo las células irradiadas o control, después de haber sido lisadas, de aproximadamente 25 μ l de volumen, se cargaron en los pozos de un gel de agarosa tipo VII (Sigma) al 0.8 % en 0.5xTBE. Tras sellar con agarosa los pocillos del gel, éste se introdujo en la cubeta de electroforesis, cargada con tampón 0.5xTBE (pH = 8.2) termostaticado a 14-16 °C, y se sometió a la fuerza eléctrica creada por una diferencia de potencial de 45 voltios, durante 96 horas. La alternancia de sentido del campo eléctrico (pulso) se reguló cada 60 minutos en dos direcciones con un ángulo de separación de 120°. Cuando finalizó el tiempo de desarrollo programado, el gel se tiñó con una disolución acuosa de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml) durante al menos dos horas. Posteriormente se lavó el gel en agua destilada (mínimo 4 horas) y se fotografió bajo iluminación ultravioleta.

*Dos de los pocillos del gel se cargaron con "plugs" formados con cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (BioRad) y *Schizosacharomyces pombe* (BioRad) embebidos en agarosa y fueron sometidos a idénticas condiciones electroforéticas (figura 2.1). Como quiera que el tamaño de estos cromosomas es conocido (*S. cerevisiae*: 2.2, 1.6 y 0.1 megapares de bases (Mpb) y *S. pombe*: 5.7, 4.6 y 3.5 Mpb), la posición a la que cada uno de ellos migró sirvió para calibrar el gel resultante de la electroforesis en función del tamaño de las moléculas de DNA. En efecto, entre tamaño del cromosoma expresado en Mpb y distancia a la que migra existe una relación lineal (figura 2.2). Los puntos experimentales de cada una de las relaciones tamaño/distancia se ajustaron a una línea recta utilizando el procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados. De esta manera fue posible calcular el tamaño medio de los fragmentos de DNA separados electroforéticamente a través de su posición en el gel. La*

figura 2.3 muestra la fotografía de uno de los experimentos realizados en este trabajo. En ella puede apreciarse la fluorescencia que corresponde al pocillo (DNA intacto o fragmentos de tamaño superior al que migra en las condiciones de desarrollo electroforético) y la línea de migración del DNA (fragmentos de DNA rotos por la radiación). Para estimar el daño molecular radioinducido, se cortó el gel separando el pocillo (actividad retenida) de la línea (actividad extraída) y cortando ésta última en secciones de 5 mm. Tanto el trozo de gel que incluye el pocillo como cada uno de las secciones obtenidas a partir de la línea (7 u 8 piezas de 5 mm) se introdujeron en viales de centelleo líquido donde se fundieron por calefacción suave en presencia de 0.1 ml de Hcl 0.1 N para evitar la repolimerización del gel. El líquido resultante se neutralizó con 0.1 ml de NaOH 0.1 N, se mezcló con 8 ml de líquido de centelleo (Ready Safe) y se procedió, finalmente, al contaje de radiactividad.

El procedimiento de electroforesis y de cuantificación de resultados en términos de radiactividad fue el mismo para todos los experimentos de radiosensibilidad molecular realizados.

2.8.1 Lesión Inicial. Método de Análisis Semicuantitativo

El número de rupturas dobles de cadena de DNA inducido inicialmente sobre las células irradiadas se cree que está relacionado con la fracción de DNA que resulta fragmentada y posee el tamaño apropiado para migrar en el gel en las condiciones de electroforesis anteriormente descritas (Blöcher, 1990). La comprobación experimental de esta relación se ha llevado a cabo por Iliakis (Iliakis, 1991a) utilizando un sistema de marcaje celular con ^{125}I -UdR y analizando con posterioridad la equivalencia entre el número de desintegraciones emitidas por el ^{125}I y la fracción de DNA extraída por electroforesis. De esta forma, la cantidad

de daño que sufren las células irradiadas puede ser cuantificada en términos de fracción de actividad de ¹⁴C extraída de cada pozo. Esta fracción se calculó de la siguiente forma:

$$FAE = \frac{dpm \text{ (línea)}}{dpm \text{ (pozo)} + dpm \text{ (línea)}}$$

donde FAE es la fracción de actividad extraída y dpm (línea), dpm (pozo) representan la actividad de carbono-14 cuantificada en la línea y en el pozo, respectivamente.

Se ha demostrado (Whitaker, 1992a) que la curva de respuesta de FAR en función de la dosis tiene un aspecto bifásico, mostrando un primer tramo aproximadamente lineal (hasta 50 Gy aproximadamente) al que sigue un aplanamiento progresivo de la curva. Se ha sugerido que la forma de la curva dosis/respuesta puede estar relacionada con la existencia de uniones cruzadas entre fragmentos de DNA capaces de limitar su movilidad (Stamato, 1990). De cualquier manera es claro que la función que relaciona la fracción de actividad liberada con la dosis de radiación tiene un límite al que tiende asintóticamente (figura II.4). Este límite, cuando la representación se hace en tanto por ciento es, evidentemente, el 100 % de la actividad inicialmente colocada en el pocillo.

2.8.2 Lesión Inicial. Método de Análisis Cuantitativo

Para cuantificar de manera más precisa los datos extraíbles de PFGE, Whitaker y colaboradores (Whitaker, 1992) han utilizado los principios teóricos de un procedimiento diseñado para estudiar el tamaño de las moléculas de DNA tras ultracentrifugación en gradiente de densidad de sucrosa (Lehmann, 1970). Este método exige el conocimiento

apropiado del tamaño del fragmento de DNA y esto se consigue determinando, simultáneamente en el mismo gel, el desplazamiento de moléculas de DNA de conocido tamaño. Mediante este procedimiento se ha podido calcular la probabilidad de producción de rdc de DNA inducidas por la radiación por unidad de dosis (Gy) y por unidad de DNA (par de bases).

Recientemente, Contopoulou y cols. (Contopoulou, 1987) y Cook y Mortimer (Cook, 1991), utilizando como modelo experimental células de levadura, han propuesto una solución al problema del análisis cuantitativo de rdc de DNA tras PFGE. El modelo de Cook se apoya 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 anteriores rupturas;

2) si esto es válido, el número promedio 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 tamaños de los fragmentos rotos (Irwing, 1955; Barton, 1956).

La ecuación que describe la frecuencia de 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:

$$F(x) = (\mu/S) \cdot \exp[-(\mu/S)] \cdot G(x) \quad [I]$$

donde

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

siendo

$F(x)$ = intensidad de distribución de fragmentos

x = tamaño del fragmento

S = tamaño del cromosoma intacto

μ = promedio de rupturas por cromosoma.

Utilizando como base este modelo matemático, se ha derivado (Ruiz de Almodóvar, 1993 a,b) un sistema de ecuaciones que permite la aplicación del mismo al estudio de la distribución de tamaños de fragmentos de DNA procedentes de células humanas sometidas a irradiación. Para ello se hace uso de los datos cuantitativos de actividad relativa de ^{14}C tras PFGE, medidos en cada sección de la línea del gel, y se relaciona esta distribución con el tamaño medio relativo (x/S) del fragmento de DNA (figura 2.5). En este trabajo hemos utilizado $S = 200 \text{ Mpb}$.

Aplicando la ecuación [I] a cada una de las distribuciones de actividad originadas tras la irradiación de las células a dos dosis $D1$ y $D2$ distintas (siendo $D2 > D1$), tenemos:

$$F(x)_1 = (\mu_1/S) \cdot \exp[-(\mu_1 \cdot x/S)] \cdot G(x)_1$$

$$F(x)_2 = (\mu_2/S) \cdot \exp[-(\mu_2 \cdot x/S)] \cdot G(x)_2$$

dividiendo, ahora, una ecuación por otra tenemos:

$$F_R = F(x)_1/F(x)_2 = A \cdot \exp[(\mu_2 - \mu_1) \cdot x/S]$$

donde

$$A = (x \cdot \mu_1/S) \cdot [2 + (S-x) \cdot \mu_1/S] / (x \cdot \mu_2/S) \cdot [2 + (S-x) \cdot \mu_2/S]$$

Si x tiende a cero, esto es, cuando los fragmentos de DNA son muy pequeños en relación al tamaño del cromosoma, circunstancia que ocurre para la técnica PFGE en la que el límite de tamaño de DNA 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 cero, tenemos:

$$A_0 = [(\mu_1 \cdot (2 + \mu_1)) / (\mu_2 \cdot (2 + \mu_2))] \quad [II]$$

y

$$F_R = A_0 \cdot \exp[(\mu_2 - \mu_1) \cdot x/S] \quad [III]$$

o

$$\ln(F_R) = (\mu_2 - \mu_1) \cdot x/S + \ln(A_0) \quad [IV]$$

La representación gráfica de $\ln(F_R)$ frente a x/S da una línea recta de pendiente $(\mu_2 - \mu_1)$ e intersección en el origen $\ln(A_0)$ (figura 2.6). Si B es el valor de la pendiente de esa recta, entonces $B = \mu_2 - \mu_1$. Utilizando este valor en la ecuación [II], podemos resolver un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas y obtener los valores individuales de promedio de rdc de DNA para cada una de las dos dosis de radiación ($D1$ y $D2$) utilizadas, μ_1 y μ_2 significan promedio de rdc de DNA producidas por las dosis $D1$ y $D2$ respectivamente.

La solución para μ_1 es:

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

y despejando μ_1 , tenemos:

$$\mu_1 = \frac{-(-2 - 2A_0 - 2A_0B) + [(-2 - 2A_0 - 2A_0B)^2 + 4 \cdot (1 - A_0) \cdot (A_0B) \cdot (2 + B)]^{1/2}}{2 \cdot (1 - A_0)} \quad [VI]$$

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. Una representación de μ frente a la dosis (D) está compuesta por una combinación de todos los valores μ derivados de todas las posible comparaciones entre dos dosis diferentes. La pendiente de esta línea da la frecuencia de inducción de rdc de DNA (en términos de rdc/Gy/unidad de DNA) (figura 2.7). Los cálculos correspondientes a la estimación cuantitativa de las rupturas dobles de cadena han sido realizados utilizando un

programa escrito en lenguaje de programación CLIPPER por Muñoz Ropa (Muñoz Ropa, 1993).

2.8.3 Método para el 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 de las distintas líneas celulares ensayadas en este trabajo hemos procedido de la forma siguiente:

La fracción de actividad de ^{14}C extraída (FAE) en función del tiempo de incubación se calculó de manera análoga a la descrita en el apartado 2.8.1. Los datos experimentales mostraron la rápida reducción del valor FAE respecto del tiempo (figura 2.8). El valor de FAE encontrado tras 24 horas de incubación fue considerado como daño residual irreparable. Este valor se sustrajo de cada uno del resto de puntos experimentales, y la capacidad de reagrupamiento de rdc se evaluó calculando la relación:

$$FR = FAE_{(t)}/FAE_{(0)} \quad [VII]$$

donde FR significa fracción de reagrupamiento, $FAE_{(t)}$ y $FAE_{(0)}$ representan, respectivamente, la fracción de actividad extraída al tiempo t y la fracción de actividad extraída al tiempo 0. Los valores de FR obtenidos, representados en función del tiempo en coordenadas semilogarítmicas se ofrecen en la figura 2.9.

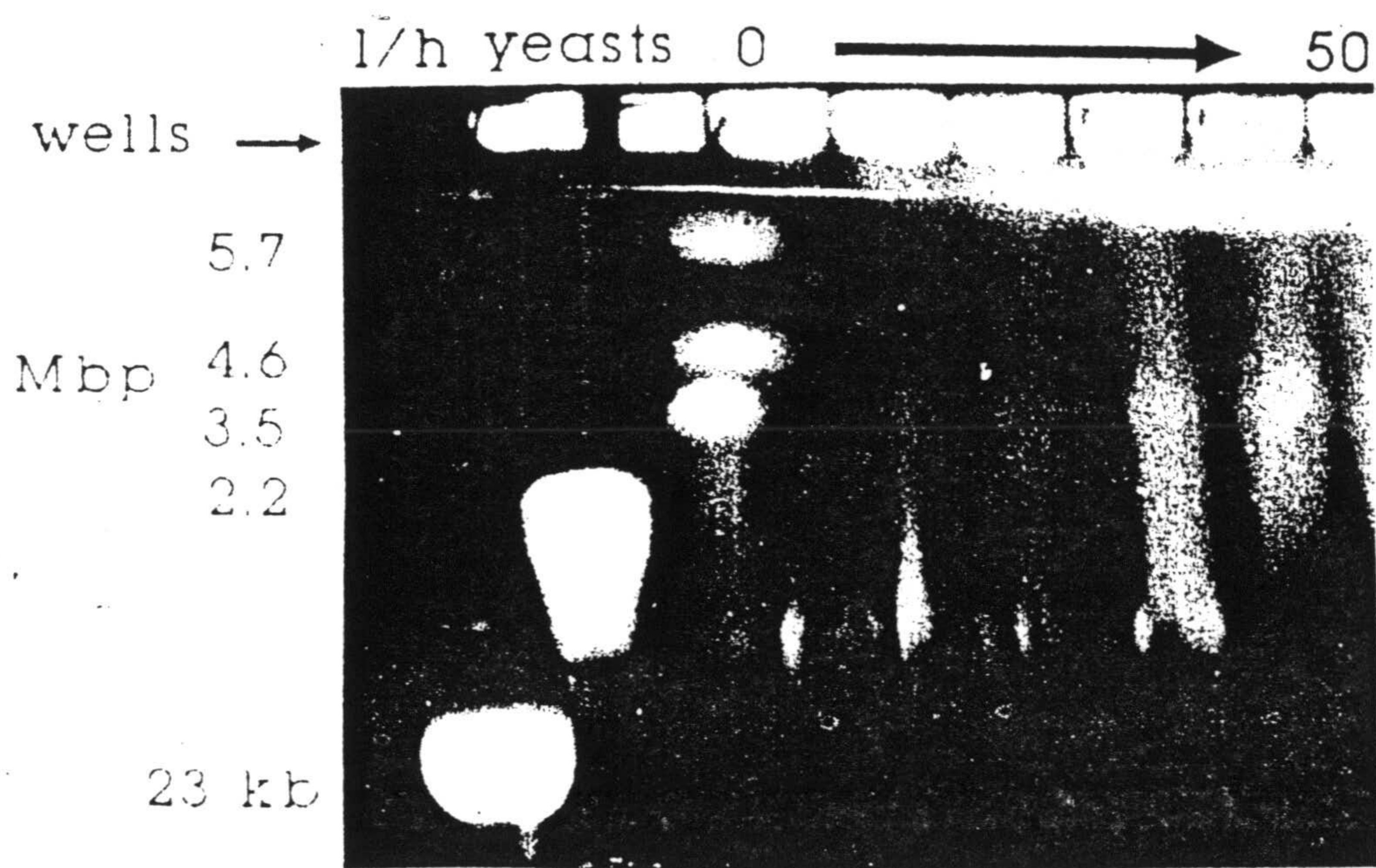


Figura 2.1 Electroforesis de campo pulsado. Las líneas 1, 2 y 3 contienen marcadores de tamaño de DNA.

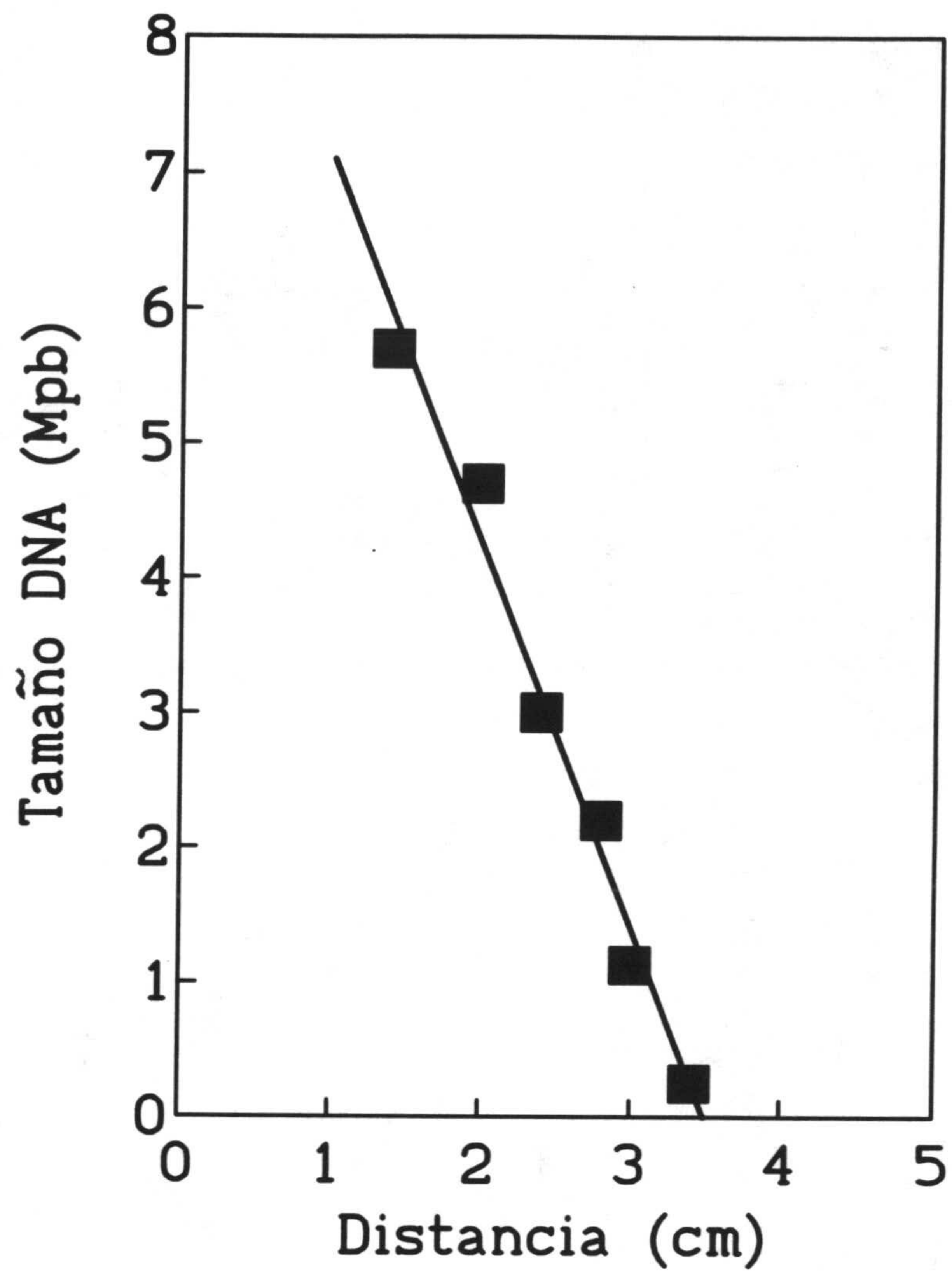


Figura 2.2 Calibración del gel de agarosa tras PFGE tomando en consideración el tamaño de la molécula de DNA y la distancia a la que migra.



Figura 2.3 Fotografía de un gel tras electoforesis de campo pulsado. En ella puede apreciarse la fluorescencia que corresponde al pocillo y la línea de migración del DNA roto

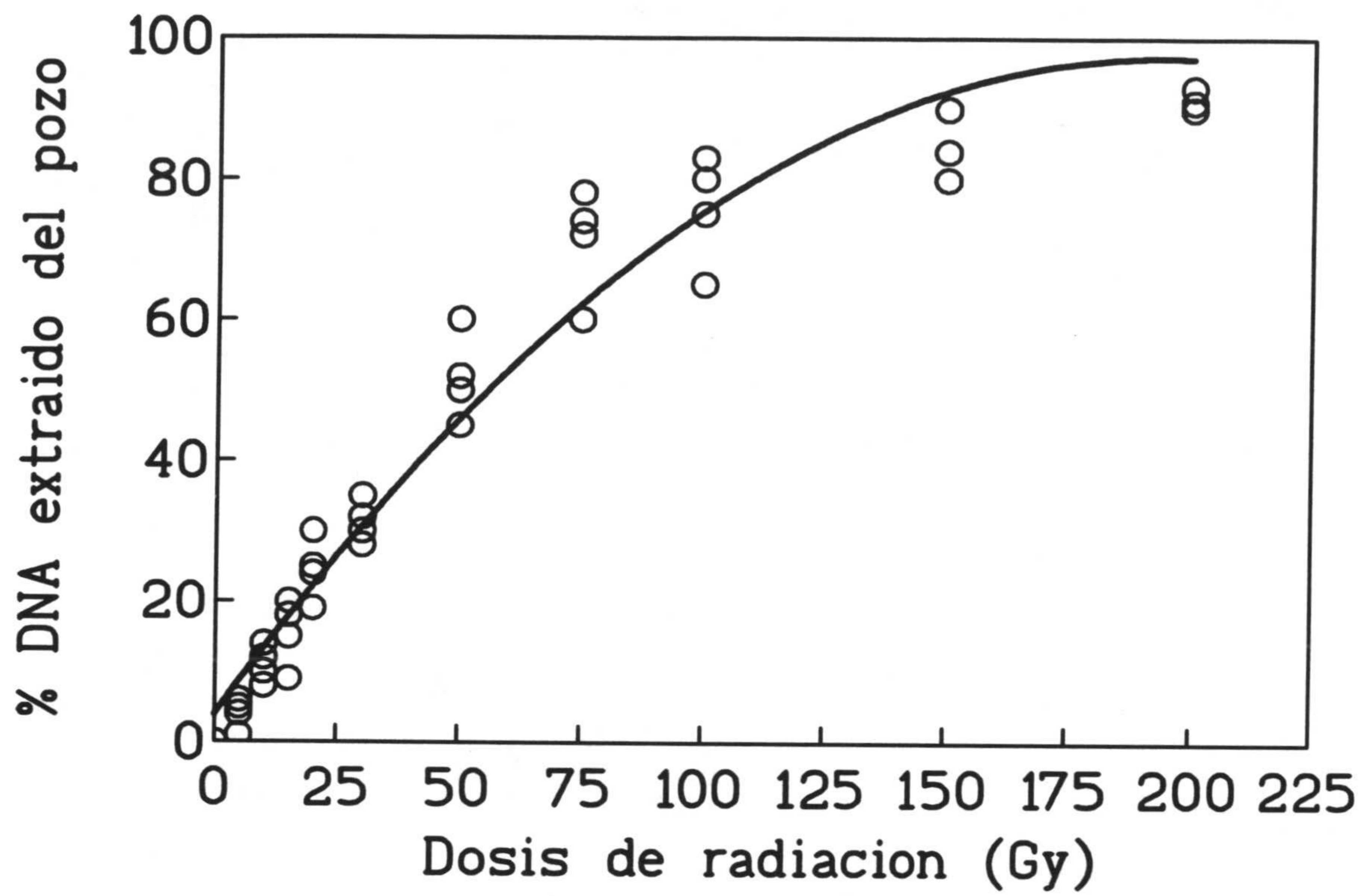


Figura 2.4 Fracción de DNA extraído en función de la dosis de radiación

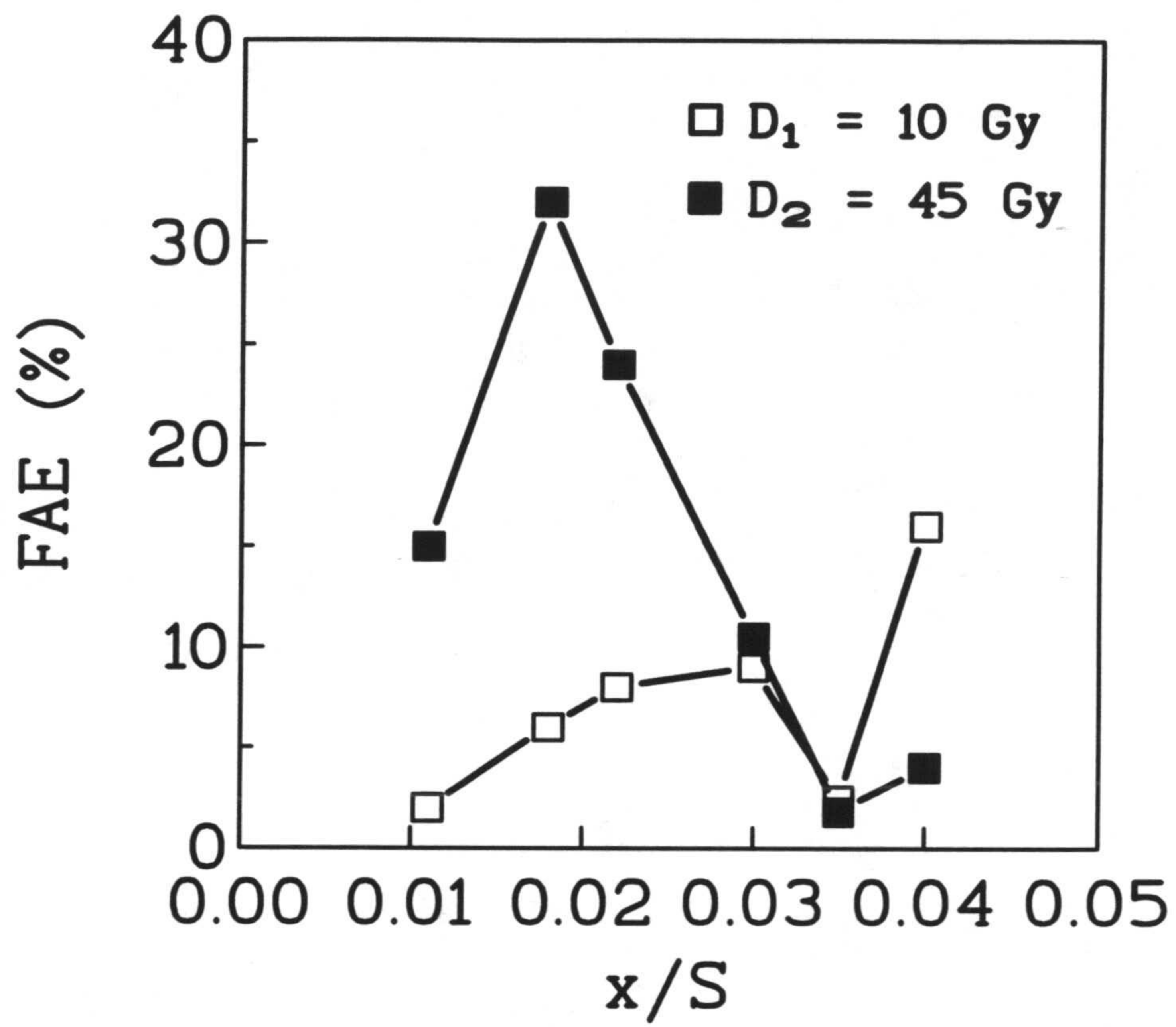


Figura 2.5 Distribución de tamaños de fragmentos de DNA para dos dosis de radiación diferentes

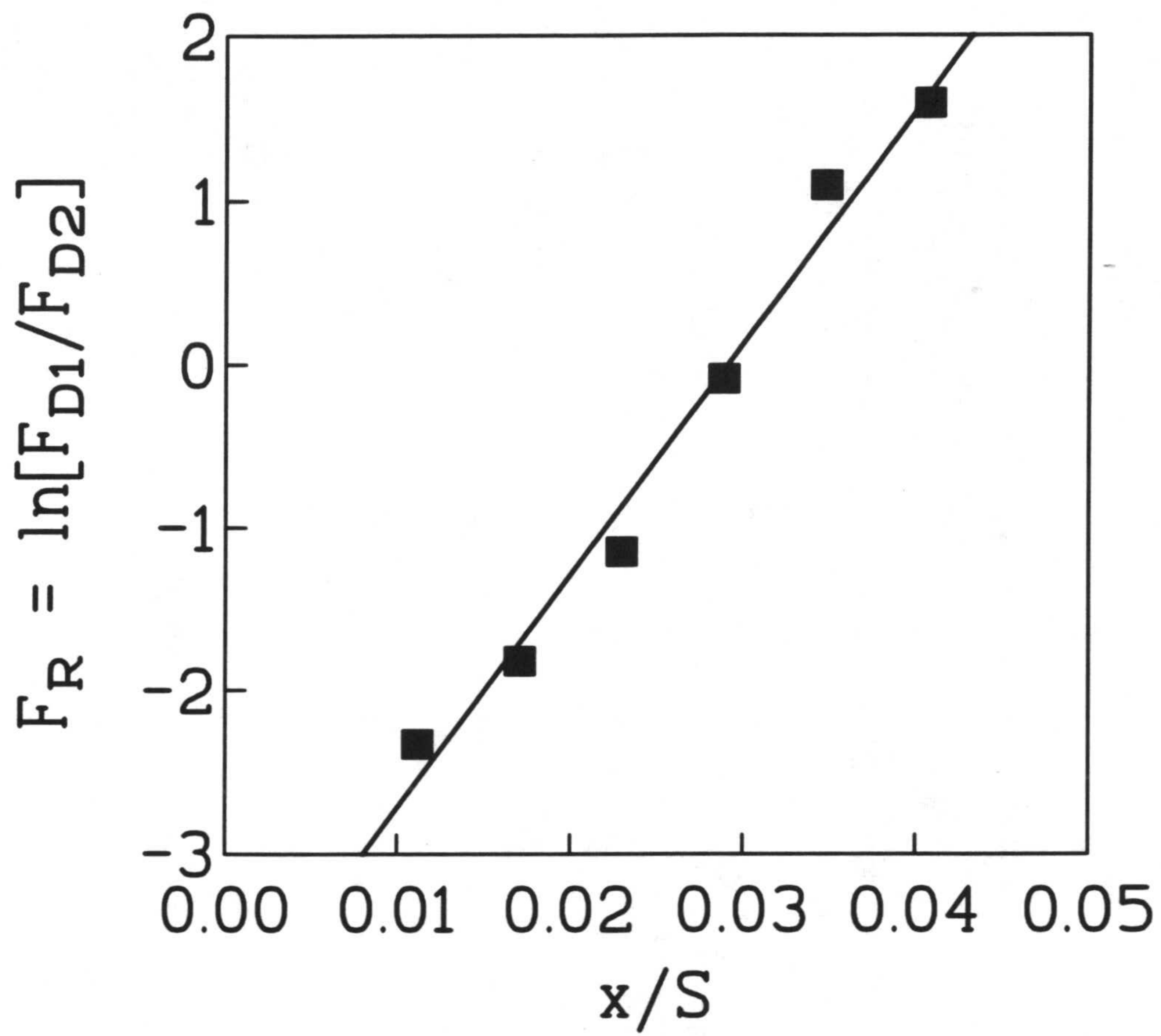


Figura 2.6 Transformación matemática de la relación de tamaño de fragmentos de DNA obtenidos tras irradiación celular a dos dosis diferentes.

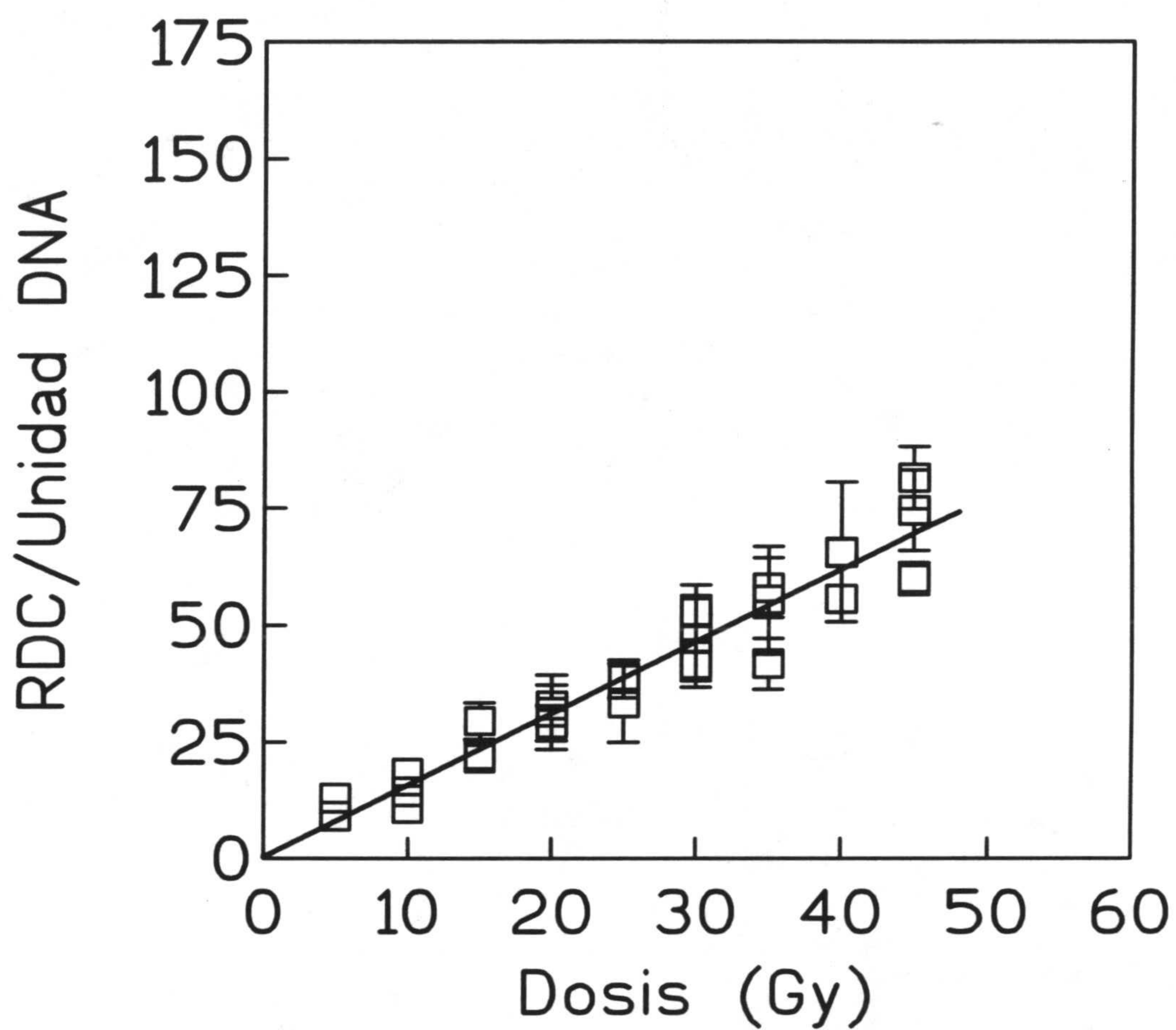


Figura 2.7 Representación gráfica del número de rupturas de DNA en función de la dosis administrada.

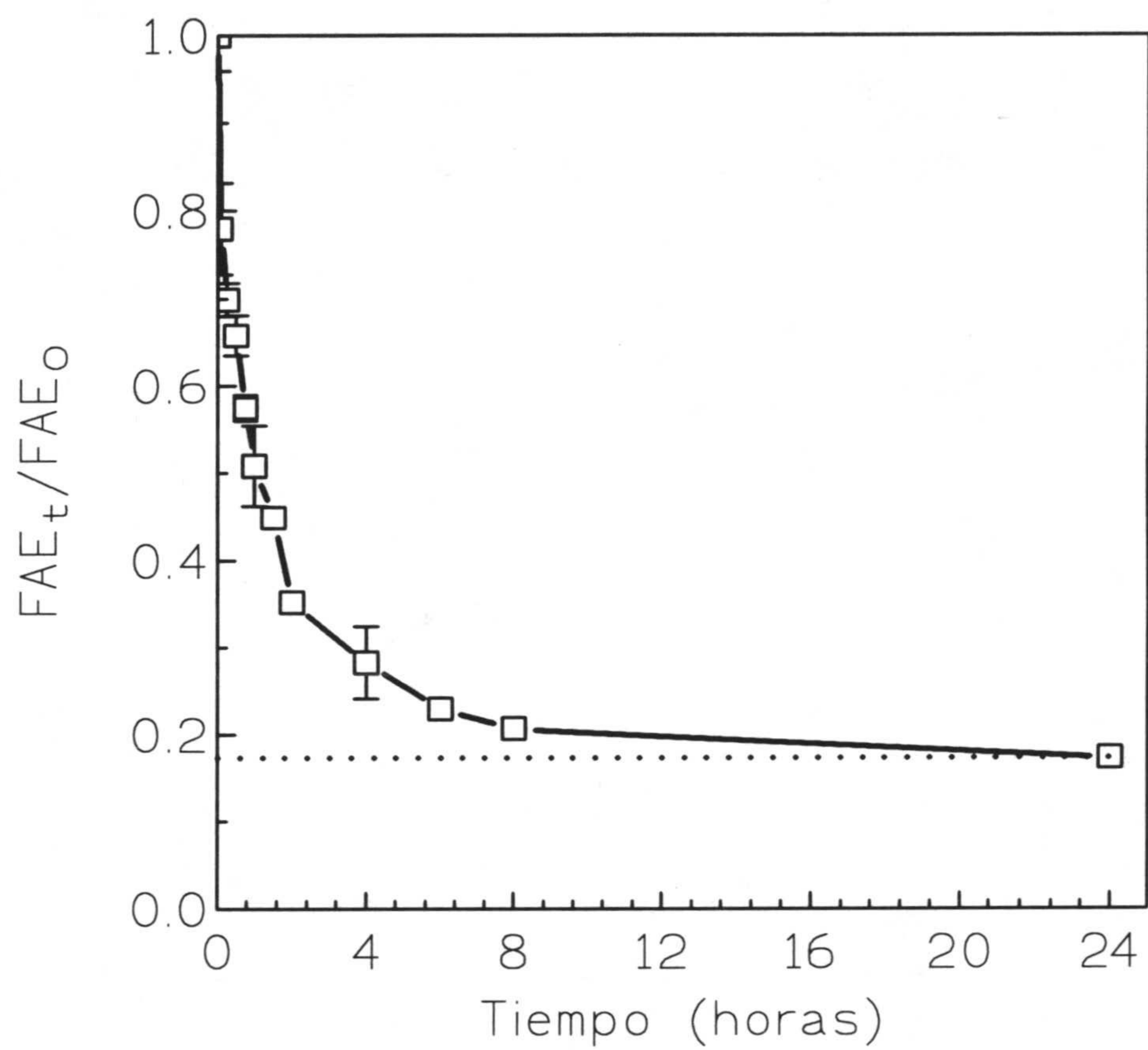


Figura 2.8 Cinética de reagrupamiento de fragmentos de DNA (rdc) por la radiación.

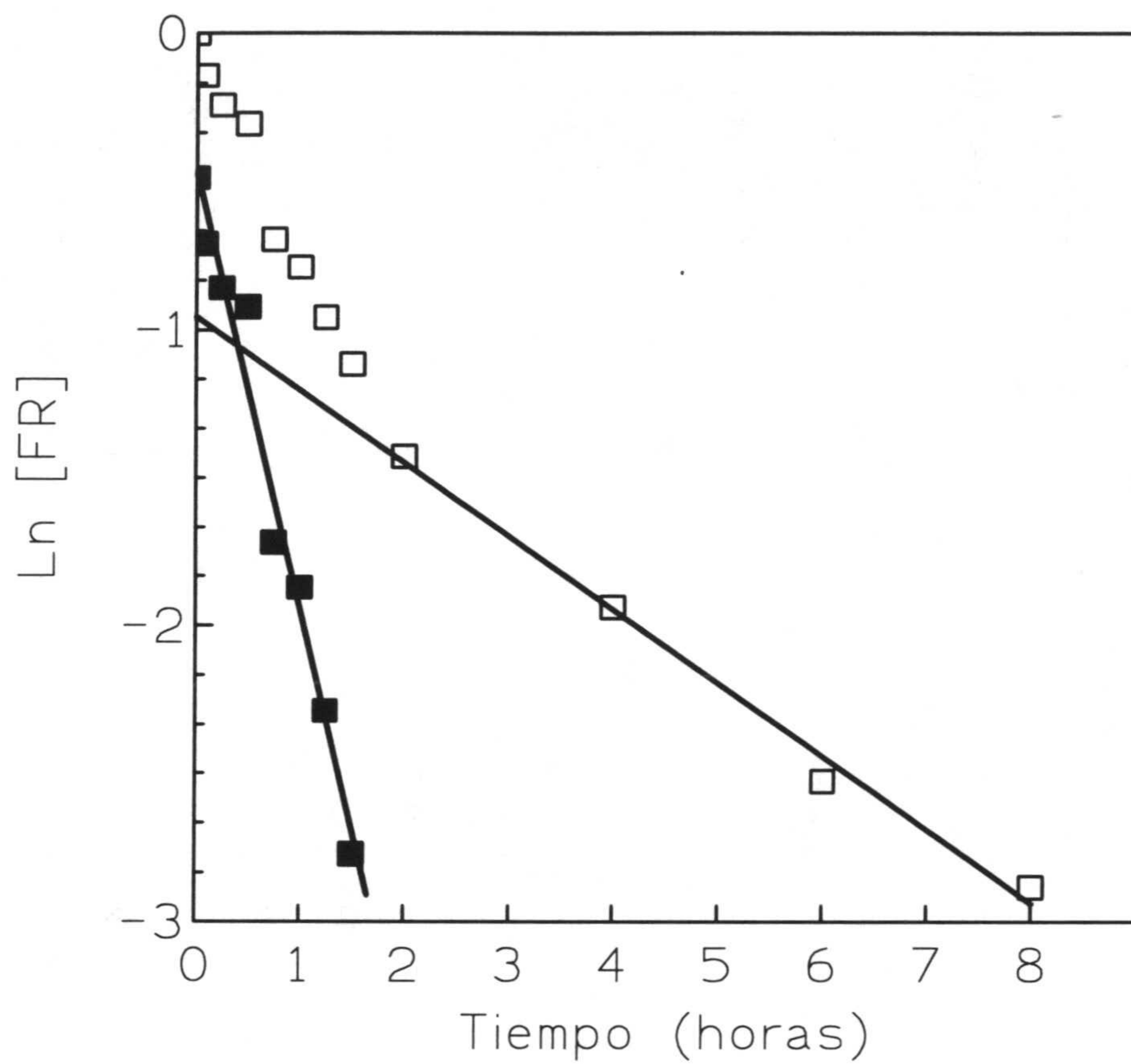


Figura 2.9 Ajuste de los datos experimentales de reagrupamiento de cadenas de DNA rotas por la radiación a un modelo compuesto por dos componentes exponenciales

La cinética de reagrupamiento de rdc de DNA durante el tiempo de incubación postirradiación de células se ajustó, finalmente, a un modelo basado en dos reacciones cinéticas no-saturadas o de primer orden que pueden ser descritas por la siguiente ecuación (Frankenberg-Schwager, 1992):

$$RR = \frac{(FAE)_{(t)}}{(FAE)_{(0)}} = f_1 \cdot \exp(-k_1 t) + f_2 \cdot \exp(-k_2 t) \quad [VIII]$$

donde

f_1 y f_2 son, respectivamente, las fracciones iniciales de rupturas dobles de cadena de DNA que se reagruparán de acuerdo con el primer y segundo componente de la cinética bifásica y k_1 y k_2 son las constantes de velocidad de cada uno de los procesos cinéticos.

2.9 EVALUACION DEL DAÑO RESIDUAL

Los experimentos para evaluar el daño residual se realizaron irradiando las células a baja tasa de dosis (nótese que la reparación de lesiones radioinducidas se produce durante el tiempo de irradiación puesto que la temperatura se reguló a 37 °C) y con un período de incubación adicional (4 horas) para asegurar que el reagrupamiento de cadenas de DNA es completo. Los resultados obtenidos se analizaron calculando la fracción de actividad extraída en función de la dosis (apartado 2.8.1).

2.10. CICLO CELULAR

Para estudiar la distribución celular en las distintas fases del ciclo mitótico se procedió de la siguiente manera: se recogieron células en fase de crecimiento exponencial con tripsina-verseno (0.05 - 0.02%), se suspendieron en medio de cultivo completo y se sembraron en cajas T-25 ($2 \cdot 4 \cdot 10^5$ por caja). Los frascos de cultivo se incubaron durante 48 horas en condiciones estándar, se realizó después un cambio de medio y las células se dejaron crecer durante 18-24 horas más. [Nótese que el procedimiento experimental es el mismo que ha sido expuesto en el apartado 2.7 (la única diferencia es que no se adiciona ^{14}C -Timidina). Los experimentos de citometría de flujo son, por tanto, paralelos a los experimentos de marcaje celular con precursores radiactivos y en el momento de la irradiación, la distribución de células en cada una de las fases del ciclo celular debe ser análoga a la estimada por citometría de flujo].

Al término del período de crecimiento las células se colectaron con Tripsina-verseno, se centrifugaron a 900 g durante 3 minutos y el "pellet" celular obtenido se resuspendió en 200 μl de Triton 0.05% a 4 °C, manteniéndose a esta temperatura durante 10 minutos. Después se adicionaron 200 μl de PBS y los tubos conteniendo la suspensión celular se centrifugaron durante 3 min. a 900 g. El "pellet" se resuspendió en 2 ml de "buffer" glicina conteniendo 50 μl de RNAasa (a 2 mg/ml) y 100 μl de yoduro de propidio (1% p/v). Finalmente, tras incubación de las células a temperatura ambiente durante 20 min, se procedió a la inyección de la suspensión celular en el citómetro de flujo (ORTHO CYTERON) utilizando 488 nm como longitud de onda de excitación y 560 nm como longitud de onda de emisión. La proporción de células existente en las diferentes fases del ciclo fue calculada utilizando el programa "Cell Cycle" de Ortho.

2.11. ANALISIS DE IMAGEN

Para la evaluación de los resultados obtenidos en el desarrollo de los métodos de radio-sensibilidad) descritos, así como para la lectura densitométrica de geles procedentes de experimentos de inducción de daño inicial, hemos utilizado un sistema de análisis de imagen compuesto por un microscopio Olympus con lente Neofluor 25 y lámpara HQ con filtros de reflexión (verde) y transmisión (rojo). El microscopio tiene acoplada una cámara de video de alta resolución y ésta está conectada a un ordenador IBM PC que almacena la información y la procesa utilizando el programa de análisis de imagen "Optimas" comercializado por Olympus (Olympus Image Analyzer).

3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

3. RESULTADOS OBTENIDOS

3.1 CARACTERISTICAS DE LAS LINEAS CELULARES UTILIZADAS

Para conocer las características proliferativas de las líneas celulares estudiadas en este trabajo se realizaron, utilizando placas multipozo (24 pozos, ICN Flow), experimentos en los que, partiendo de un número inicial de células, se estudió su crecimiento en función del tiempo y en condiciones de cultivo estándar. Para ello fue necesario poner a punto la técnica colorimétrica basada en la captación intracelular de sulfo-rodamina B, utilizada para conocer la relación entre número de células existente en los pocillos y densidad óptica cuantificada. Los resultados de dichos ensayos, para cada una de las líneas celulares ensayadas por nosotros se resumen a continuación:

3.1.1 Ensayos de linealidad

a) Línea celular MCF-7 BUS

La tabla 3.1 recoge los resultados de un experimento representativo de la relación observada entre densidad óptica y número de células sembradas.

TABLA 3.1

Línea Celular MCF-7 BUS

<i>Nº de Células</i>	<i>D.O. (M±ESM)</i>
9075	0.056 ± 0.001
24562	0.075 ± 0.002
48250	0.104 ± 0.001
81500	0.163 ± 0.001
110000	0.208 ± 0.009
158000	0.252 ± 0.009
172000	0.285 ± 0.003
266000	0.385 ± 0.002

El valor medio así como el error estándar de la media se refieren a 12 puntos experimentales. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

b) Línea celular MCF-7 BB

La tabla 3.2 recoge los resultados de un experimento representativo de la relación observada entre densidad óptica y número de células sembradas.

TABLA 3.2

LINEA CELULAR MCF-7 BB

<i>Nº de Células</i>	<i>D.O. (M±ESM)</i>
<i>12500</i>	<i>0.070 ± 0.002</i>
<i>25000</i>	<i>0.087 ± 0.001</i>
<i>50000</i>	<i>0.138 ± 0.005</i>
<i>75000</i>	<i>0.172 ± 0.002</i>
<i>150000</i>	<i>0.302 ± 0.015</i>
<i>300000</i>	<i>0.550 ± 0.029</i>

El valor medio así como el error estándar de la media se refieren a 12 puntos experimentales. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

c) Línea celular T47D-B1

La tabla 3.3 recoge los resultados de un experimento representativo de la relación observada entre densidad óptica y número de células sembradas.

TABLA 3.3

LINEA CELULAR T47D-B1

<i>Nº de Células</i>	<i>D.O. (M±ESM)</i>
8750	0.070 ± 0.002
18700	0.081 ± 0.004
32500	0.115 ± 0.003
40000	0.129 ± 0.006
70000	0.179 ± 0.010
100000	0.201 ± 0.029
140000	0.323 ± 0.010
280000	0.614 ± 0.020

El valor medio así como el error estándar de la media se refieren a 12 puntos experimentales. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

d) Línea celular T47D-B8

La tabla 3.4 recoge los resultados de un experimento representativo de la relación observada entre densidad óptica y número de células sembradas.

TABLA 3.4

LINEA CELULAR T47D-B8

<i>Nº de Células</i>	<i>D.O. (M±ESM)</i>
6250	0.050 ± 0.001
12500	0.061 ± 0.002
25000	0.082 ± 0.002
50000	0.127 ± 0.004
101000	0.213 ± 0.014
202000	0.393 ± 0.037

El valor medio así como el error estándar de la media se refieren a 12 puntos experimentales. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

e) Línea celular EVSA-T

La tabla 3.5 recoge los resultados de un experimento representativo de la relación observada entre densidad óptica y número de células sembradas.

TABLA 3.5

LINEA CELULAR EVSA-T

<i>Nº de Células</i>	<i>D.O. (M±ESM)</i>
25000	0.060 ± 0.002
50000	0.091 ± 0.004
75000	0.129 ± 0.017
100000	0.167 ± 0.013
150000	0.269 ± 0.018
200000	0.340 ± 0.019

El valor medio así como el error estándar de la media se refieren a 12 puntos experimentales. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

f) Línea celular RT-112

La tabla 3.6 recoge los resultados de un experimento representativo de la relación observada entre densidad óptica y número de células sembradas.

TABLA 3.6

LINEA CELULAR RT-112

<i>Nº de Células</i>	<i>D.O. (M±ESM)</i>
<i>10000</i>	<i>0.036 ± 0.001</i>
<i>15000</i>	<i>0.041 ± 0.001</i>
<i>100000</i>	<i>0.124 ± 0.004</i>
<i>125000</i>	<i>0.155 ± 0.003</i>
<i>200000</i>	<i>0.220 ± 0.001</i>
<i>250000</i>	<i>0.291 ± 0.003</i>

El valor medio así como el error estándar de la media se refieren a 12 puntos experimentales. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

3.1.2 Ensayos de linealidad. Resultados medios

Utilizando todos los datos extraídos de los experimentos anteriormente reflejados hemos obtenido, utilizando el procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados, la ecuación de dependencia de la densidad óptica (D.O.) en función del número de células. Los datos correspondientes a tales ajustes aparecen recogidos en la tabla 3.7.

TABLA 3.7

RELACION D.O / N° DE CELULAS

<i>Línea celular</i>	<i>Pendiente (D.O/cel)</i>	<i>Intersección (D.O)</i>	<i>Coefficiente correlación</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	<i>1.15E-6</i>	<i>0.030</i>	<i>0.999</i>
<i>MCF-7 BB</i>	<i>1.67E-6</i>	<i>0.049</i>	<i>0.999</i>
<i>T47D-B1</i>	<i>2.02E-6</i>	<i>0.042</i>	<i>0.999</i>
<i>T47D-B8</i>	<i>1.66E-6</i>	<i>0.042</i>	<i>0.995</i>
<i>EVSA-T</i>	<i>1.65E-6</i>	<i>0.011</i>	<i>0.997</i>
<i>RT-112</i>	<i>1.15E-6</i>	<i>0.020</i>	<i>0.994</i>

Los resultados obtenidos son demostrativos de la necesidad de realizar una calibración independiente para cada línea celular. En efecto, las pendientes que relacionan la D.O. con el número de células difieren claramente entre si lo cual indica que, de alguna manera, el tipo celular ensayado condiciona la captación intracelular del colorante. Por otra parte, es evidente que existe una buena relación lineal entre los valores de densidad óptica y el número de células puesto en cada pocillo. Por ello, el ensayo permite, conocida la densidad óptica, calcular el número de células existentes. Los datos medios correspondientes a los experimentos realizados se han representado gráficamente y se ofrecen en la figuras 3.1 a 3.3.

3.1.3 Características proliferativas de las líneas celulares ensayadas

De acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 2.5 de esta memoria, se han obtenido valores representativos del tiempo de duplicación de cada una de las líneas celulares utilizadas. Dichos valores aparecen recogidos en la tabla 3.8.

La figura 3.4 ofrece, por otra parte, un ejemplo de proliferación celular en la línea de cáncer de vejiga humano RT-112. En la gráfica hemos incluido el valor del tiempo de duplicación (T_D) correspondiente.

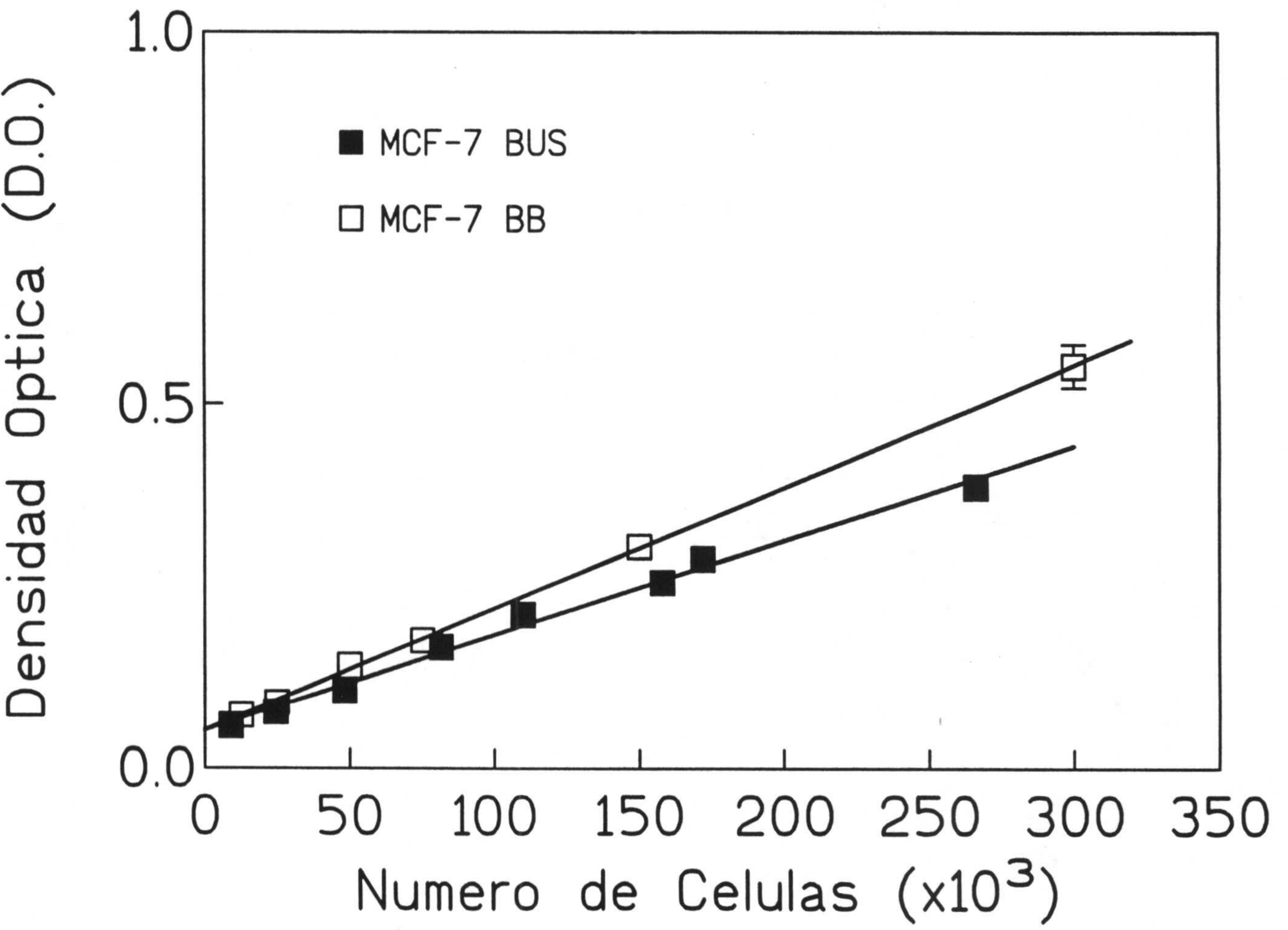


Fig. 3.1. *Relación entre número de células y densidad óptica. Línea celular MCF-7 BUS y MCF-7 BB*

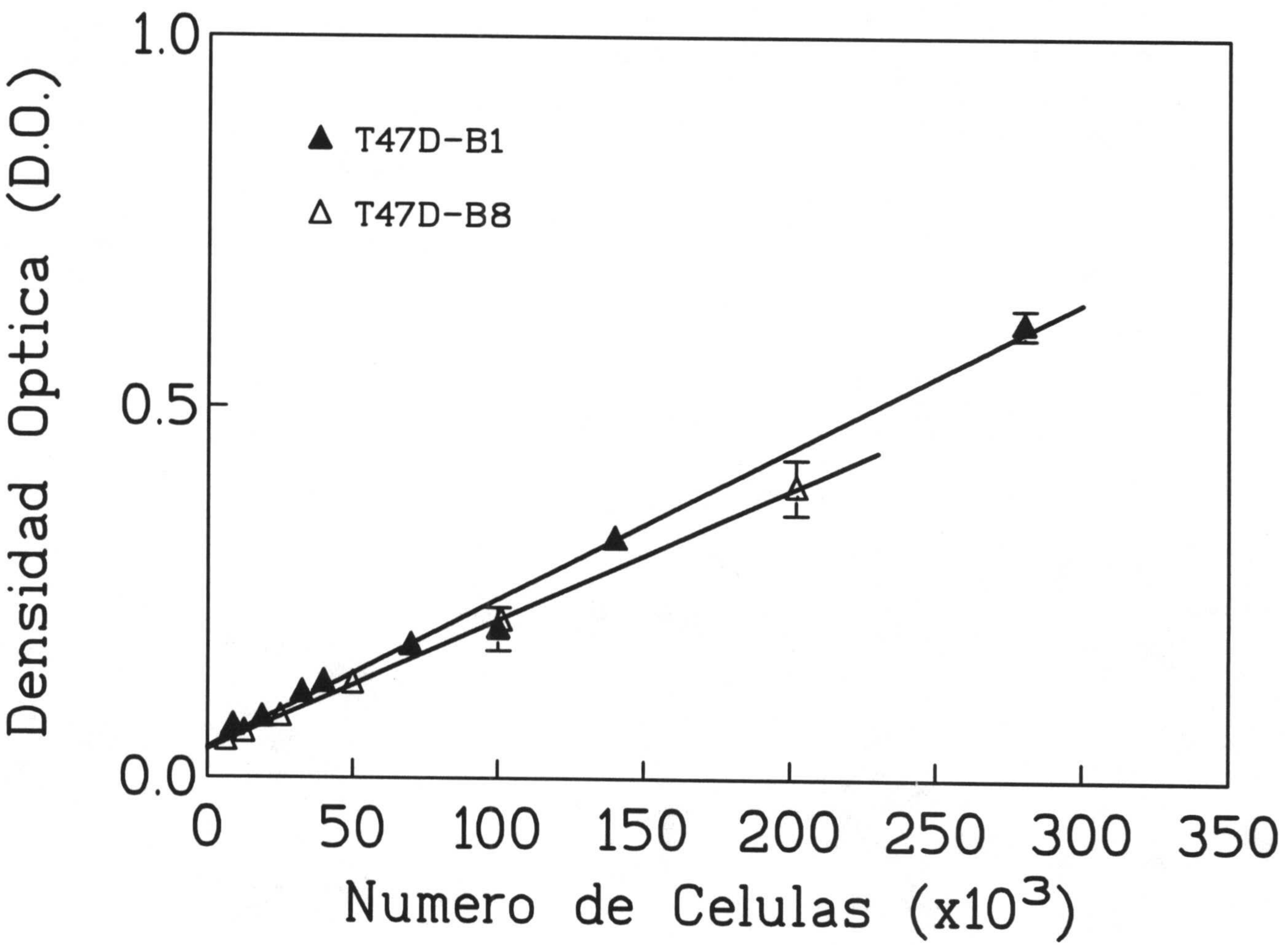


Fig. 3.2 Relación entre número de células y densidad óptica. Líneas celulares T47D-B1 y T47D-B8

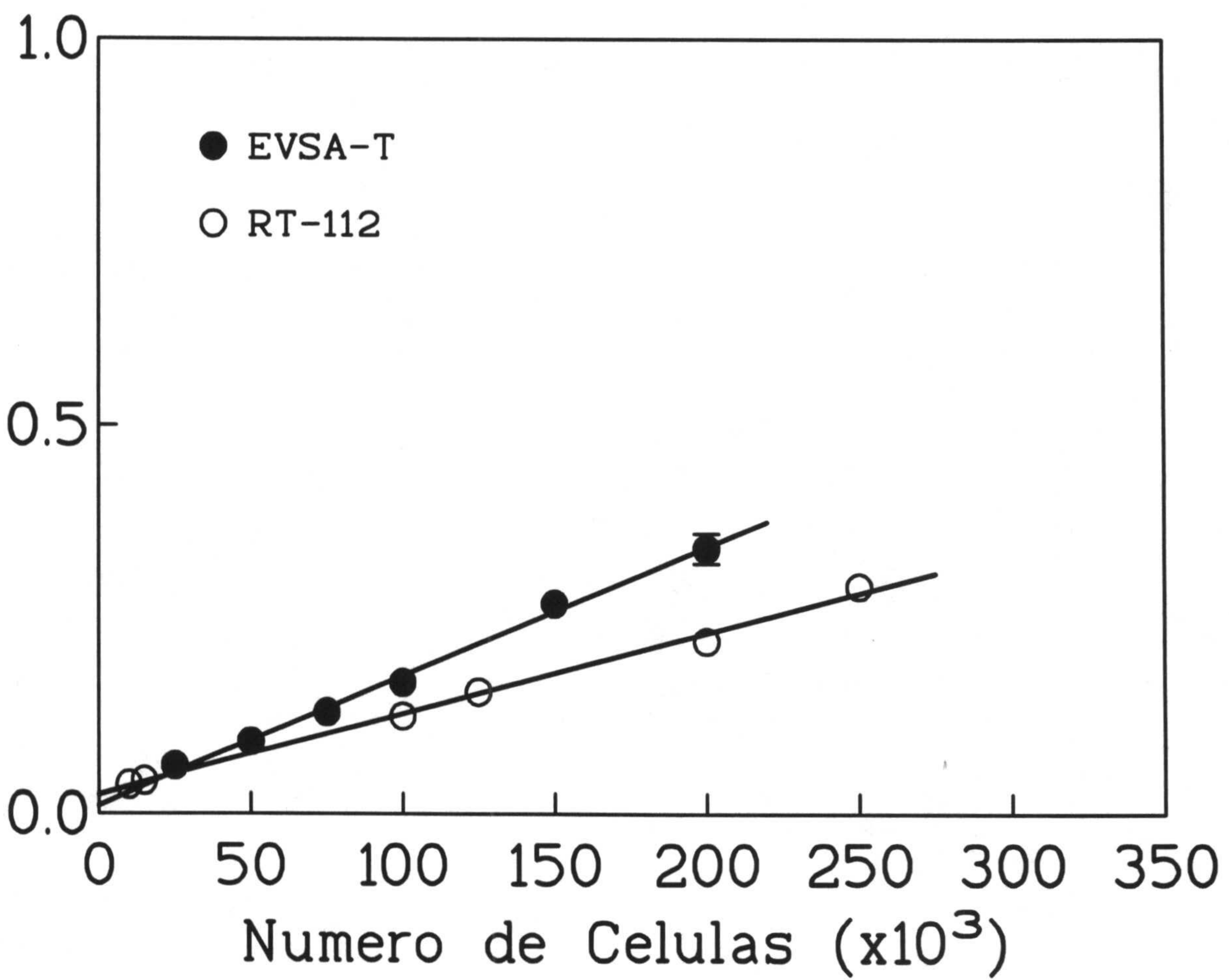


fig. 3.3 *Relación entre número de células y densidad óptica. línea celular EVSA-T y RT-112*

UNIVERSIDAD DE GRANADA
 1 MAR. 1994
 COMISION DE DOCTORADO

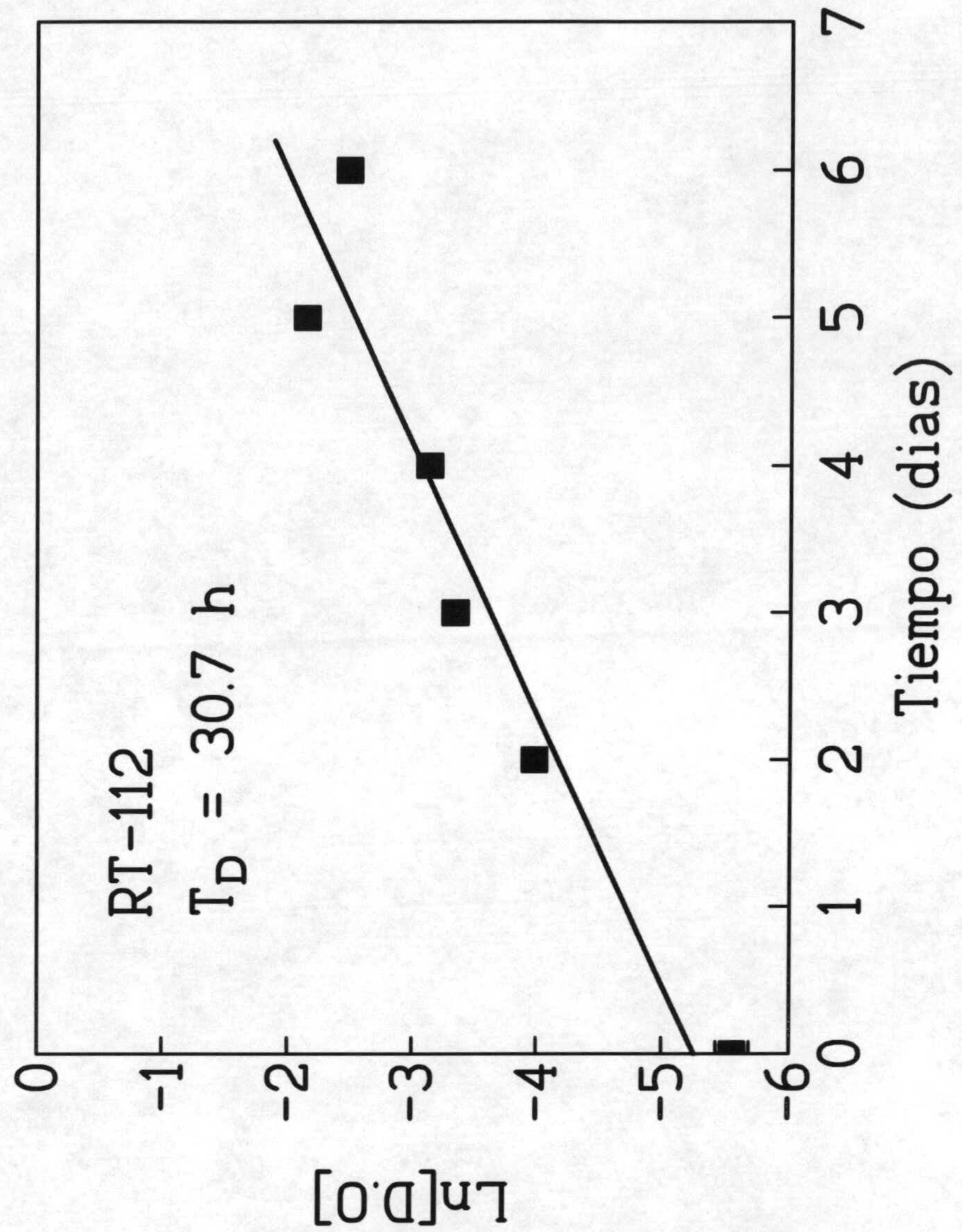


Figura 3.4 Representación gráfica de los cambios de densidad óptica observados en función del tiempo en la línea celular RT112. El carácter lineal de la relación indica con claridad que el crecimiento de la población es de naturaleza exponencial

TABLA 3.8

CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR

<i>Línea Celular</i>	<i>T_D (horas)</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	<i>34.5 ± 4.0</i>
<i>MCF-7 BB</i>	<i>40.0 ± 5.7</i>
<i>T47D-B1</i>	<i>31.2 ± 3.8</i>
<i>T47D-B8</i>	<i>43.4 ± 2.9</i>
<i>EVSA-T</i>	<i>30.0 ± 3.0</i>
<i>RT-112</i>	<i>29.3 ± 2.8</i>

Con el fin de facilitar la lectura de estos valores hemos incluido también una representación gráfica, en forma de histograma, que se ofrece en la figura 3.5.

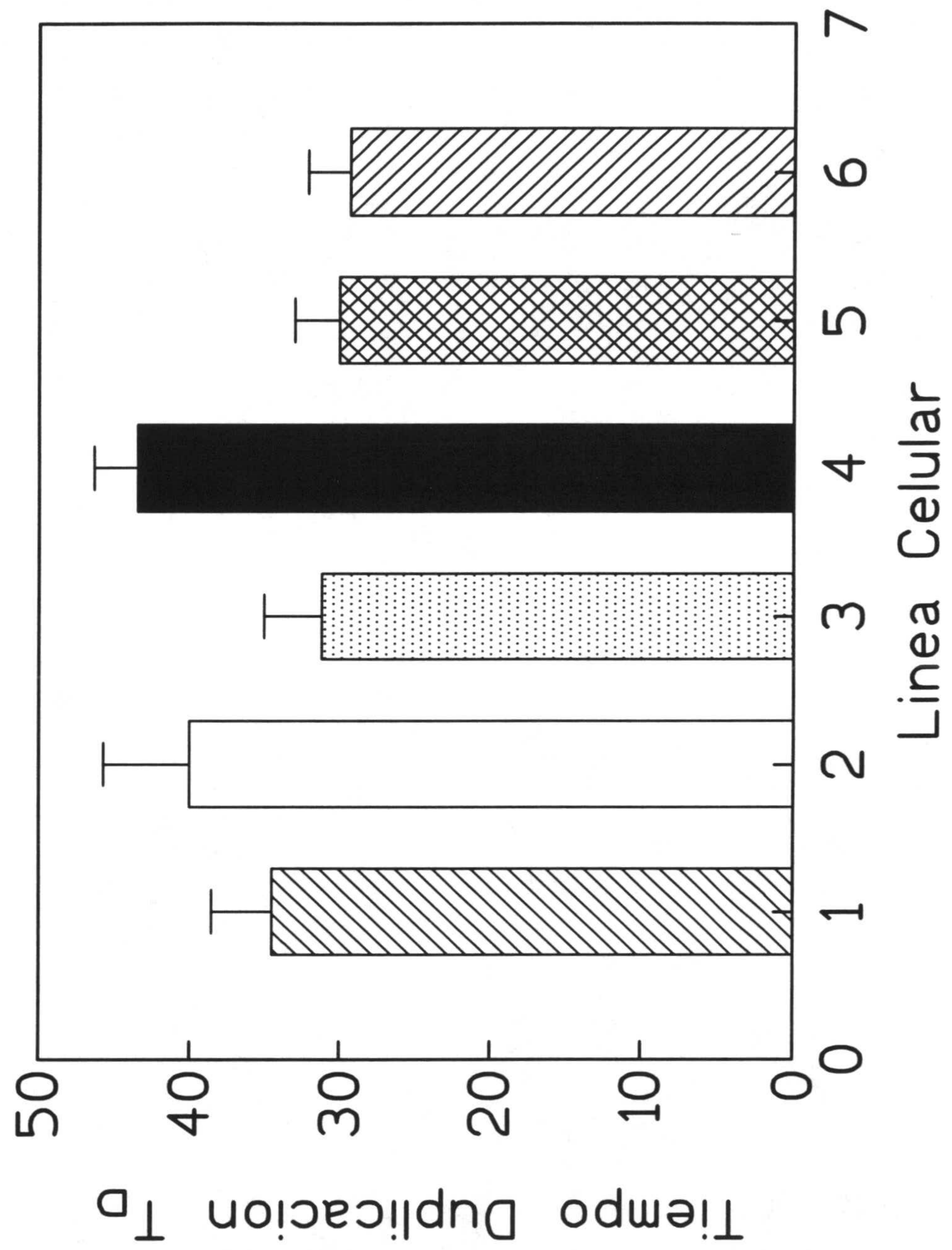


Figura 3.5 Tiempos de duplicación para las distintas líneas celulares ensayadas: MCF-7 BUS (1), MCF-7 BB (2), T47D-B1 (3), T47D-B8 (4), EVSA-T (5) y RT-112 (6)

3.1.4 Características de la dependencia hormonal

Como quiera que cinco de las seis líneas celulares utilizadas en este trabajo derivan de cáncer de mama humano, nos ha parecido oportuno incluir, en esta memoria de investigación, datos relativos a la cuantificación de receptores hormonales de estrógenos (ER) y de progesterona (PgR), así como datos relativos a la respuesta proliferativa celular inducida por el estradiol¹, (tablas 3.9 y 3.10).

¹ Villalobos y col. Trabajo en curso. 1993

TABLA 3.9

CUANTIFICACION DE RECEPTORES HORMONALES

<i>Línea Celular</i>	<i>ER (fmol/mg)</i>	<i>PgR (fmol/mg)</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	453 ± 67	135 ± 38
<i>MCF-7 BB</i>	626 ± 115	396 ± 62
<i>T47D-B1</i>	195 ± 15	2765 ± 235
<i>T47D-B8</i>	27 ± 11	930 ± 178
<i>EVSA-T</i>	- -	- -
<i>RT-112</i>	- -	- -

Los resultados de concentración de ER y PgR se han expresado en fentomoles de hormona específicamente enlazada por mg de proteína cuantificada sobre el tapiz celular utilizando el procedimiento de Bradford (Bio Rad).

TABLA 3.10

RESPUESTA PROLIFERATIVA AL ESTRADIOL

<i>Línea Celular</i>	<i>Respuesta</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	+++
<i>MCF-7 BB</i>	+
<i>T47D-B1</i>	++
<i>T47D-B8</i>	++
<i>EVSA-T</i>	-
<i>RT-112</i>	-

3.2. ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD CELULAR

Los resultados correspondientes a los ensayos encaminados a determinar la capacidad clonogénica de los distintos modelos tumorales utilizados (apartado 2.6) se muestran en las tablas 3.11 a 3.16. Los datos experimentales se han tabulado considerando la dosis de radiación a la que las células fueron expuestas, el valor medio de la fracción de supervivencia obtenida (FS) y el correspondiente error estándar de la media.

TABLA 3.11

CURVA DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Línea Celular: MCF-7 BUS

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FS</i>	<i>ESM</i>
0	1.00000	0.00000
2	0.32661	0.03834
3	0.17109	0.01920
6	0.02211	0.00357
9	0.00204	0.00059
12	0.00009	0.00001

FS = valor medio de la fracción de supervivencia celular

ESM = error estándar del valor medio

TABLA 3.12

CURVA DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Línea Celular: MCF-7 BB

<i>Dosis(Gy)</i>	<i>FS</i>	<i>ESM</i>
0	1.00000	0.00000
2	0.50177	0.02905
3	0.35258	0.05543
6	0.07342	0.01549
9	0.00161	0.00281
12	0.00126	0.00037

FS = valor medio de la fracción de supervivencia celular

ESM = error estándar del valor medio

TABLA 3.13

CURVA DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Línea Celular: T47D-B1

<i>Dosis(Gy)</i>	<i>FS</i>	<i>ESM</i>
0	1.00000	0.00000
2	0.58430	0.03068
3	0.33695	0.02190
6	0.08567	0.00374
9	0.00889	0.00059
12	0.00050	0.00011

FS = valor medio de la fracción de supervivencia celular

ESM = error estándar del valor medio

TABLA 3.14

CURVA DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Línea Celular: T47D-B8

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FS</i>	<i>ESM</i>
0	1.00000	0.00000
2	0.55463	0.01744
3	0.32988	0.00977
6	0.07935	0.00232
9	0.00811	0.00053
12	0.00030	0.00004

FS = valor medio de la fracción de supervivencia celular

ESM = error estándar del valor medio

TABLA 3.15

CURVA DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Línea Celular: EVSA-T

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FS</i>	<i>ESM</i>
0	1.00000	0.00000
2	0.62617	0.04083
3	0.43667	0.05136
6	0.17333	0.03442
9	0.01600	0.00082
12	0.00833	0.00269

FS = valor medio de la fracción de supervivencia celular

ESM = error estándar del valor medio

TABLA 3.16

CURVA DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Línea Celular: RT-112

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FS</i>	<i>ESM</i>
0	1.00000	0.00000
2	0.67667	0.01453
3	0.52100	0.01159
6	0.11733	0.01299
9	0.01300	0.00231
12	0.00076	0.00004

FS = valor medio de la fracción de supervivencia celular

ESM = error estándar del valor medio

** Cada valor de la FS es la media de 3 puntos experimentales. Cada experimento fue realizado por triplicado*

Las figuras 3.6 a 3.11 reflejan las curvas de supervivencia obtenidas en función de la dosis de radiación administrada. Estas representaciones gráficas han sido ajustadas utilizando un procedimiento de regresión no lineal basado en el modelo Lineal-Cuadrático.

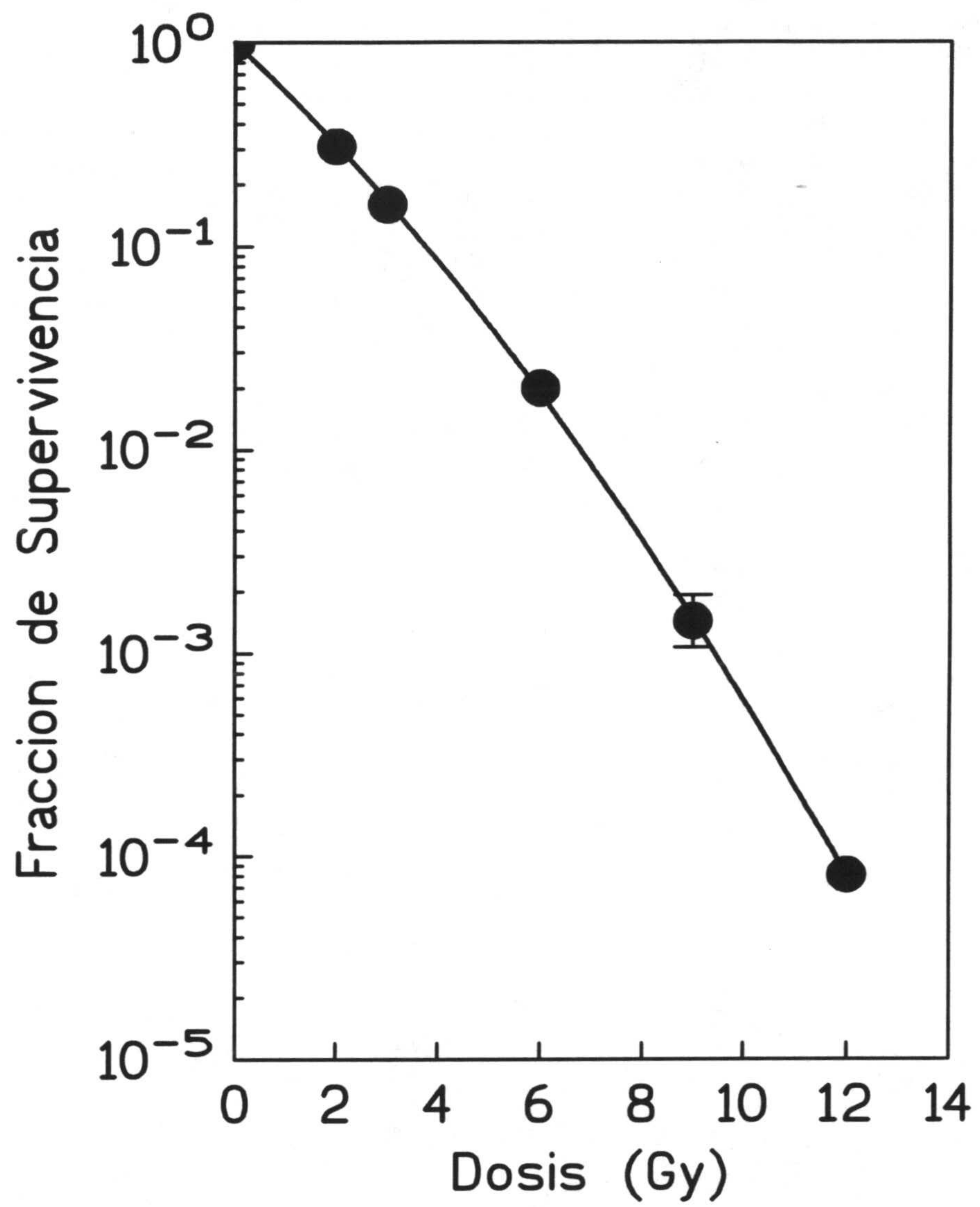


Figura 3.6 Curva de supervivencia en función de la dosis de radiación.

Línea celular MCF-7 BUS

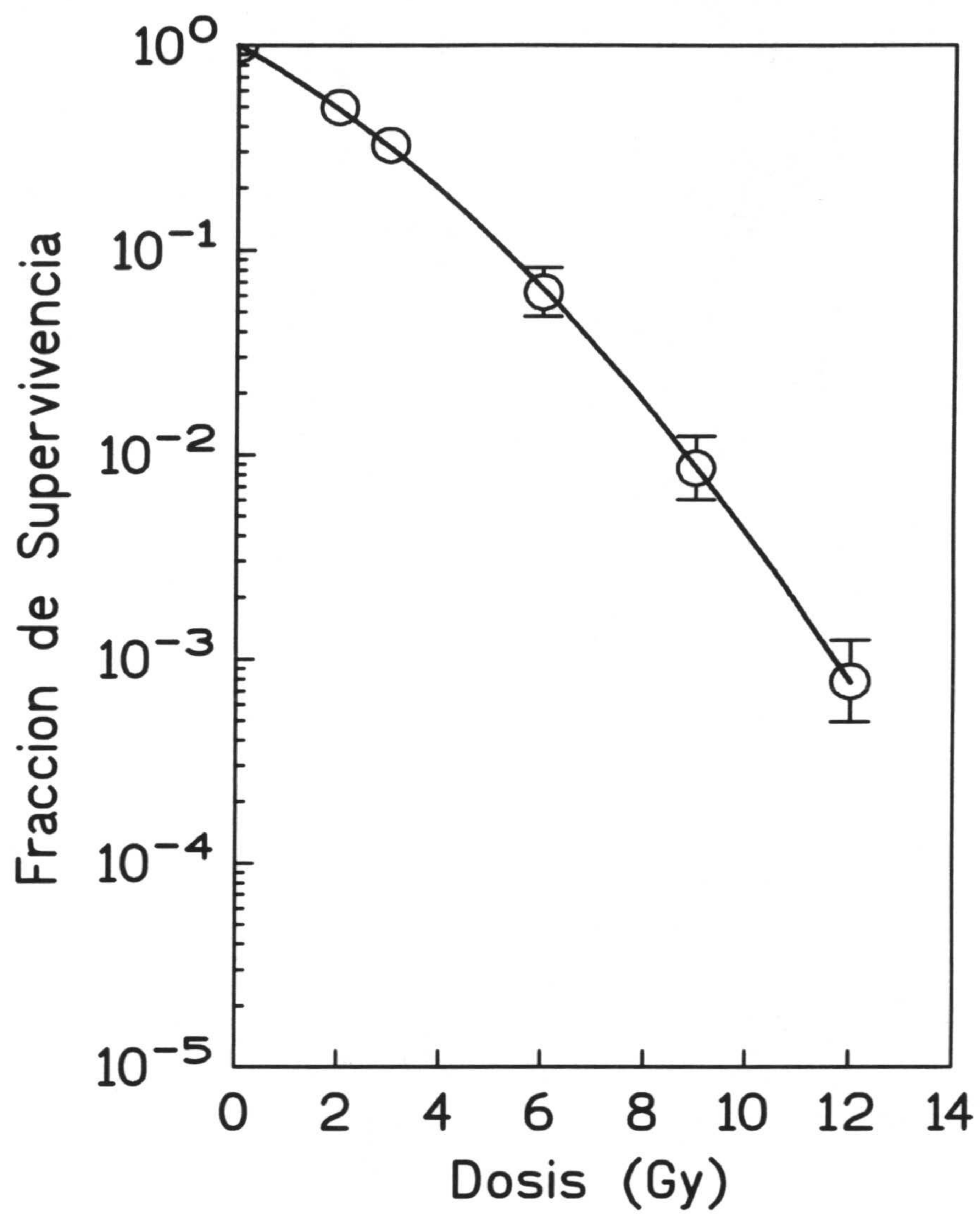


Figura 3.7 Curva de supervivencia en función de la dosis de radiación.

Línea celular MCF-7 BB

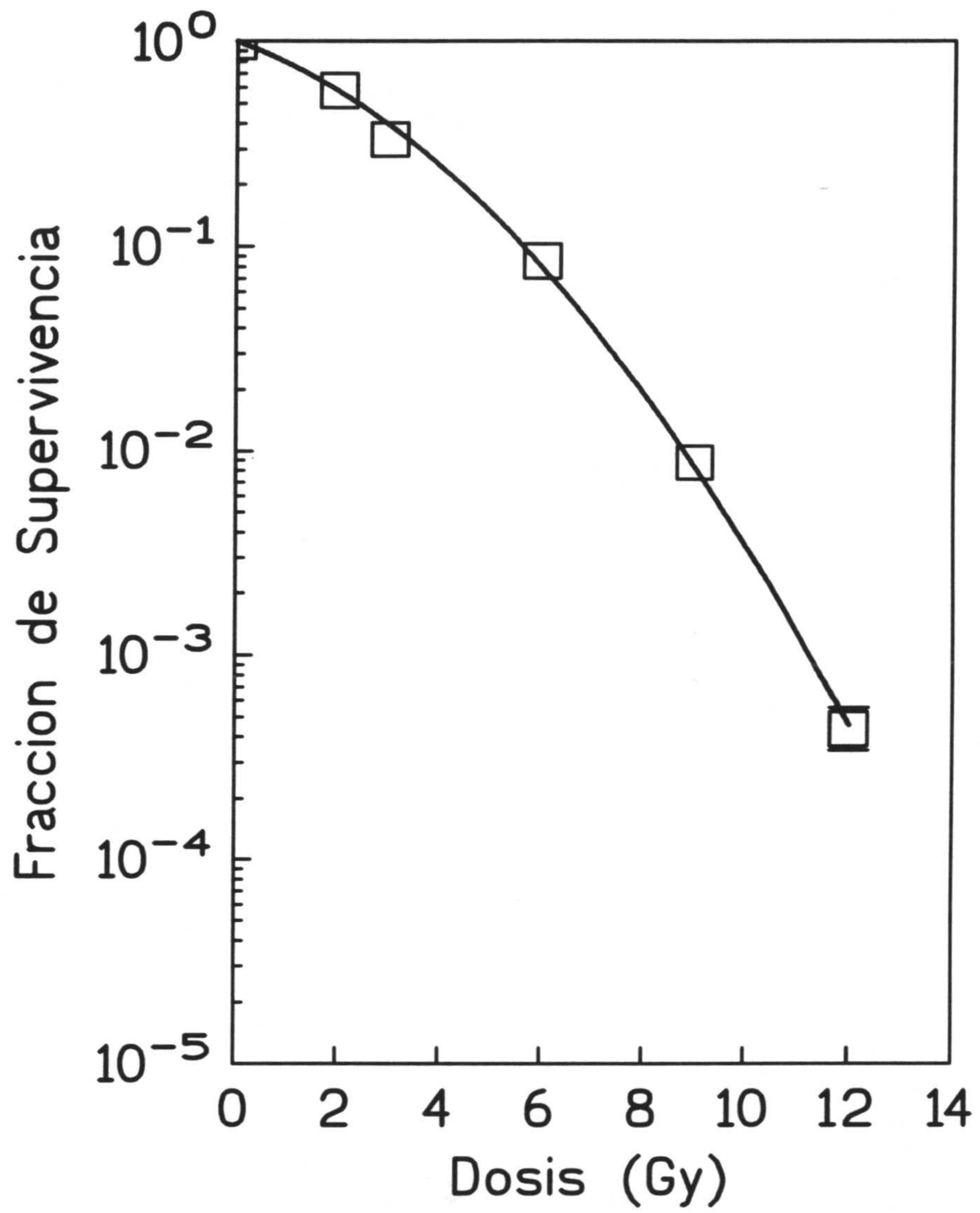


Figura 3.8 Curva de supervivencia en función de la dosis de radiación.
Línea celular T47D-B1

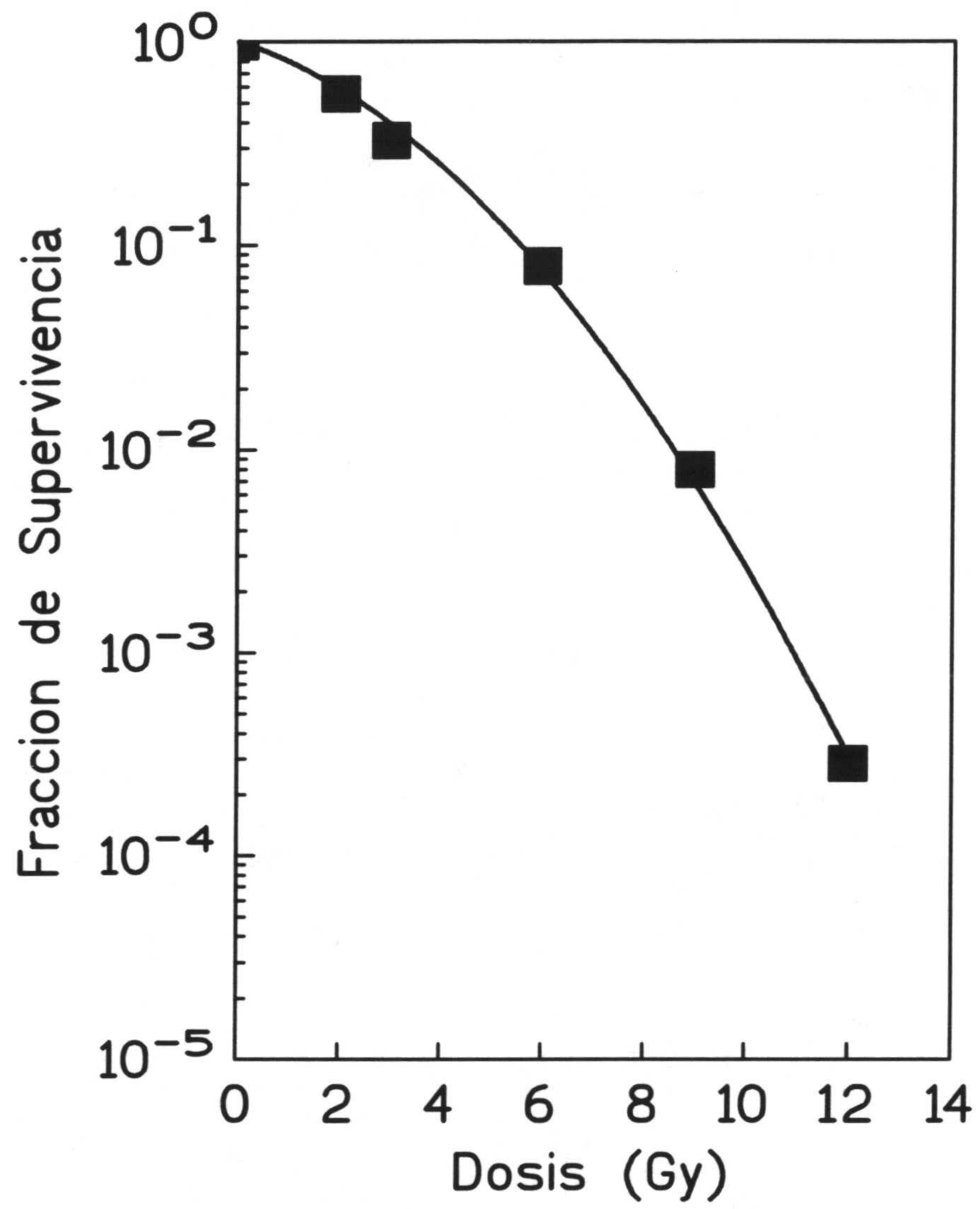


Figura 3.9 Curva de supervivencia en función de la dosis de radiación.
Línea celular T47D-B8

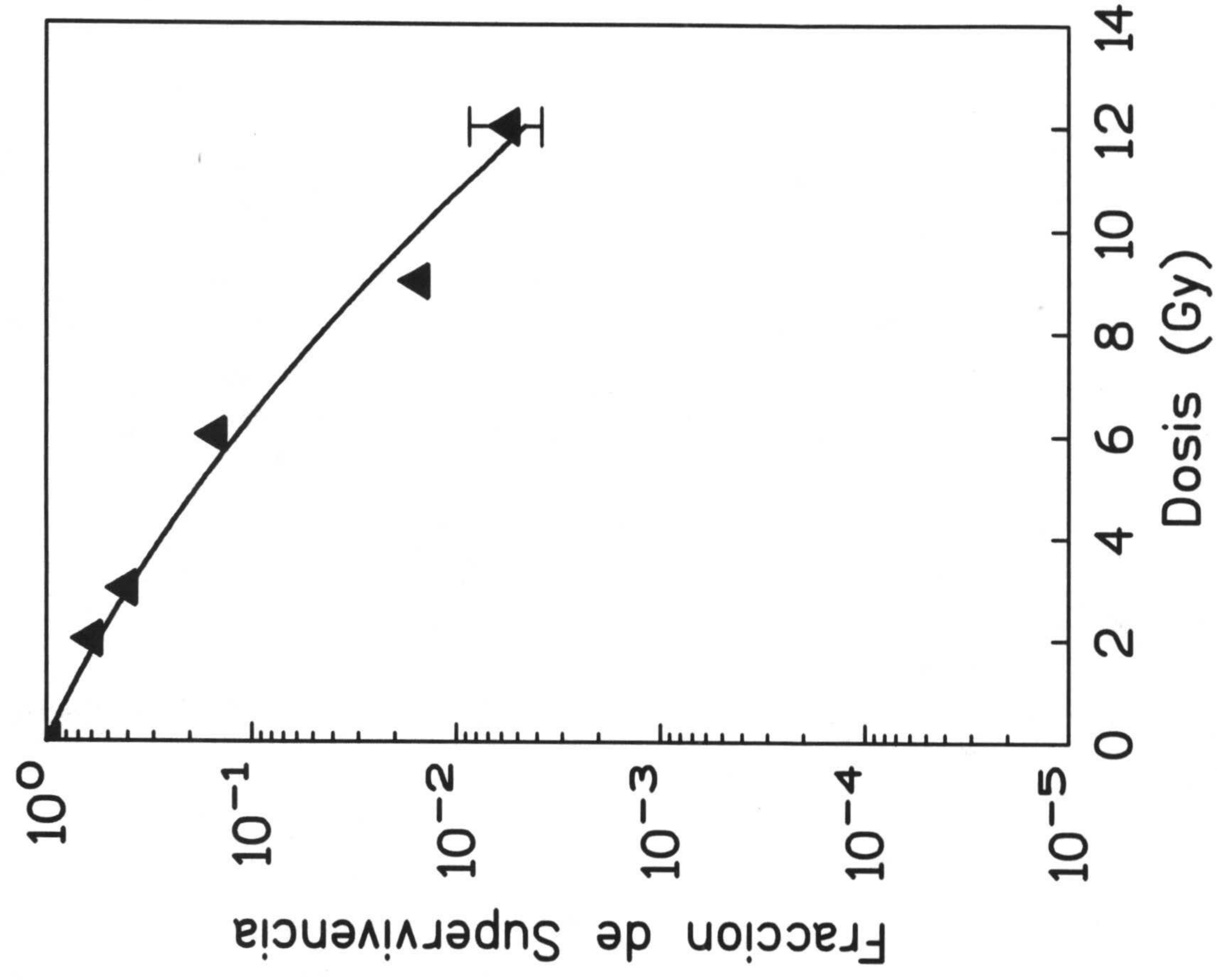


Figura 3.10 Curva de supervivencia en función de la dosis de radiación. Línea celular EVSA-T

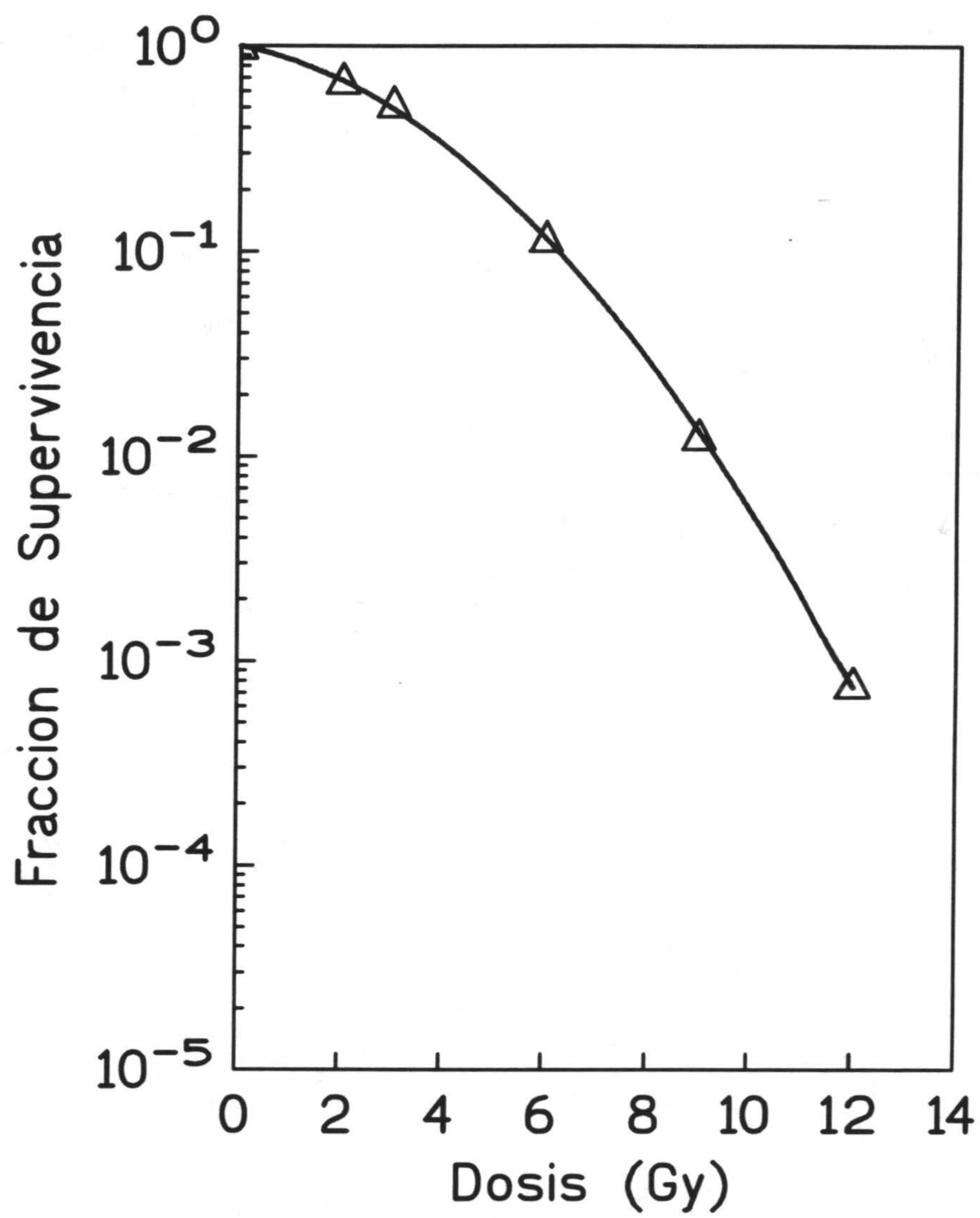


Figura 3.11 Curva de supervivencia en función de la dosis de radiación.

Línea celular RT-112

Los parámetros correspondientes a los coeficientes α y β obtenidos, así como su error típico, figuran, por otra parte, en la tabla 3.17.

TABLA 3.17

PARAMETROS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Modelo Lineal-Cuadrático

<i>Línea celular</i>	<i>alfa (Gy⁻¹)</i>	<i>beta (Gy⁻²)</i>	<i>r</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	<i>0.536 ± 0.038</i>	<i>0.021 ± 0.004</i>	<i>0.998</i>
<i>MCF-7 BB</i>	<i>0.316 ± 0.059</i>	<i>0.023 ± 0.006</i>	<i>0.999</i>
<i>T47D-B1</i>	<i>0.206 ± 0.024</i>	<i>0.036 ± 0.002</i>	<i>0.999</i>
<i>T47D-B8</i>	<i>0.190 ± 0.015</i>	<i>0.040 ± 0.001</i>	<i>0.998</i>
<i>EVSA-T</i>	<i>0.262 ± 0.051</i>	<i>0.016 ± 0.005</i>	<i>0.997</i>
<i>RT-112</i>	<i>0.120 ± 0.018</i>	<i>0.040 ± 0.002</i>	<i>0.897</i>

Hemos ajustado, asimismo, los valores de supervivencia celular al modelo de múltiples blancos (MB) definido por la ecuación:

$$S = (1 - (1 - e^{-\alpha D}))^n$$

Los parámetros obtenidos a partir del mencionado ajuste Dosis Letal Media (D_0), Dosis Quasi-Umbral (D_q) y Número de Extrapolación (n), ofrecieron los valores en la Tabla 3.18.

TABLA 3.18

PARAMETROS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

Modelo de Múltiples Blancos

<i>Línea celular</i>	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	n	r
<i>MCF-7 BUS</i>	1.20	1.18	2.7	0.995
<i>MCF-7 BB</i>	1.60	1.56	2.6	0.998
<i>T47D-B1</i>	1.38	2.04	4.4	0.988
<i>T47D-B8</i>	1.29	2.16	5.4	0.984
<i>EVSA-T</i>	2.10	1.45	2.0	0.975
<i>RT-112</i>	1.38	2.57	6.4	0.991

3.3. RELACION ENTRE PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD CELULAR

Desde un punto de vista general, el parámetro experimental de mayor interés en clínica humana es, probablemente, la fracción celular superviviente tras irradiación a dosis única de 2 Gy. En relación con ello y utilizando los datos obtenidos en nuestro trabajo, hemos definido la "Radiosensibilidad Celular Intrínseca" como la fracción de células que sobreviven tras aplicar, en condiciones estándar, la dosis de 2 Gy. Este parámetro es especialmente útil porque coincide, además, con la dosis habitualmente utilizada como fracción diaria en el tratamiento de los pacientes oncológicos.

De conformidad, pues, con nuestros resultados podemos decir que la línea celular MCF-7 BUS es, entre los modelos tumorales utilizados en este trabajo, la más radiosensible ($FS2 = 32.7\%$), mientras que las células RT-112 son las que ofrecen mayor radiorresistencia ($FS2 = 67.7\%$). Esta definición nos ha obligado a definir la relación existente entre los parámetros de radiosensibilidad obtenidos mediante el ajuste de los datos experimentales a cada uno de los dos modelos teóricos precedentemente expuestos. Las tablas 3.19 y 3.20 recogen, en este sentido, los resultados del análisis estadístico de correlación antes mencionado.

TABLA 3.19

**RELACION ENTRE RADIOSENSIBILIDAD CELULAR INTRINSECA
Y PARAMETROS DEL MODELO LQ**

	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>FS2/α</i>	-78.8 ± 14.5	75.9 ± 4.4	0.939	0.0055
<i>FS2/β</i>	----	----	0.430	0.3950

P: pendiente de la relación dosis/respuesta

I: intersección de la recta para $D = 0$ Gy (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido.

TABLA 3.20

**RELACION ENTRE RADIOSENSIBILIDAD CELULAR
INTRINSECA Y PARAMETROS DEL MODELO MB**

	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>FS2/D₀</i>	---	---	0.459	0.388
<i>FS2/D_q</i>	---	---	0.731	0.100
<i>FS2/n</i>	---	---	0.490	0.324

P: pendiente de la relación dosis/respuesta

I: intersección de la recta para $D = 0$ Gy (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido

Del análisis de las dos tablas anteriores es fácil deducir que entre FS2 y el componente alfa de la curva de supervivencia celular ajustada al modelo L-Q existe una relación de dependencia lineal.

No hemos podido demostrar, por el contrario, que los parámetros derivados de la ecuación del modelo de múltiples blancos se asocien significativamente con el valor de FS2. Sin embargo los valores de FS2 y dosis quasi-umbral (D_q) sugieren cierto grado de relación, que no alcanza, sin embargo, significación estadística. Para profundizar en el conocimiento de esta relación, si existe, hemos correlacionado los valores del coeficiente alfa (modelo L-Q) con los valores de D_q correspondientes. Sorprendentemente entre ambos parámetros, de significado teórico completamente distinto, hemos podido demostrar la existencia de una fuerte relación de dependencia:

<i>pendiente:</i>	<i>- 0.249 ± 0.066</i>
<i>intersección:</i>	<i>0.73 ± 0.12</i>
<i>coef. Correlación:</i>	<i>- 0.884</i>
<i>significación (p):</i>	<i>0.019</i>

Las rectas de regresión obtenidas para $FS2/\alpha$ y α/D_q han sido gráficamente representadas y se muestran en las figuras 3.12 y 3.13.

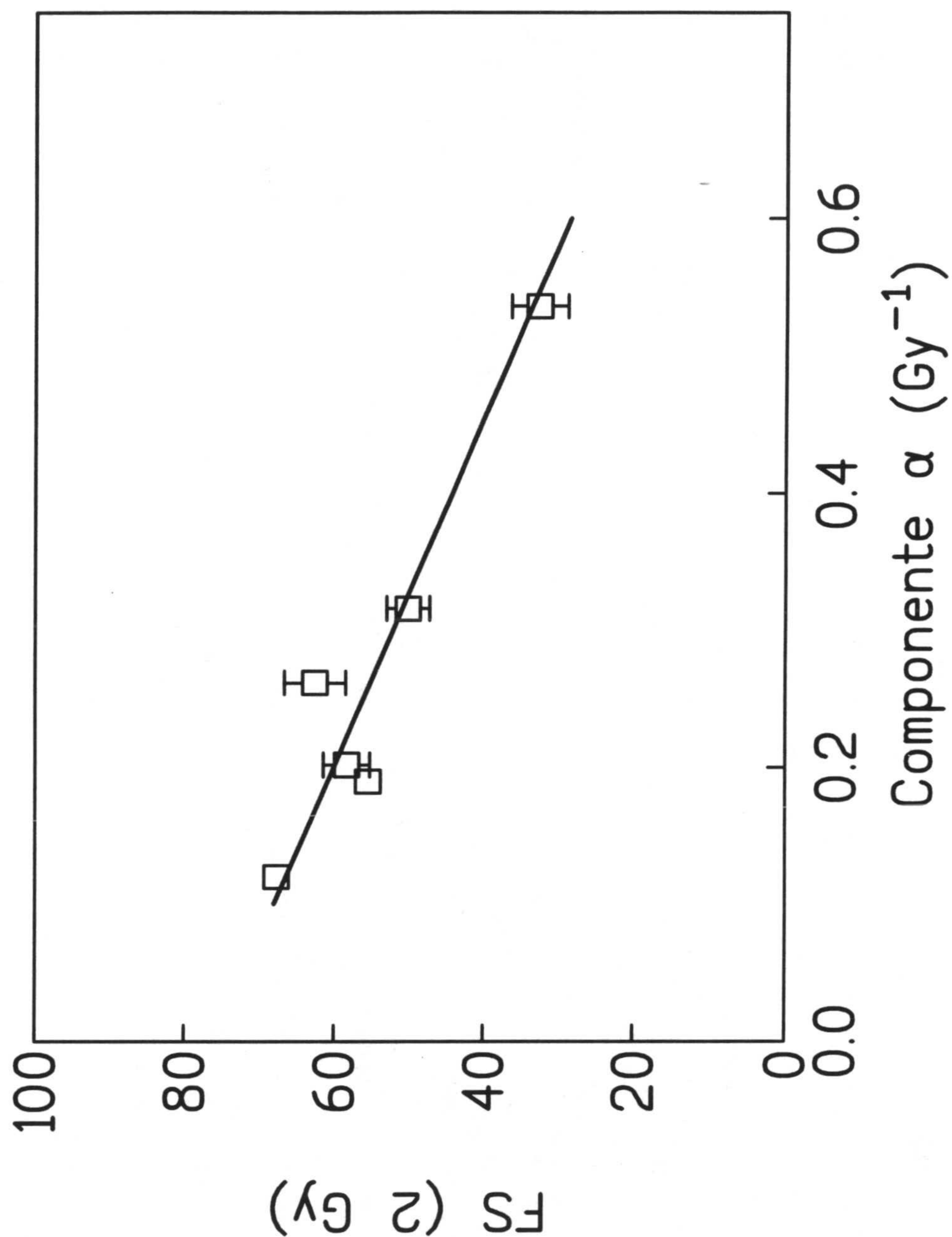


Figura 3.12

Representación gráfica de la fracción de supervivencia a 2 Gy y el componente α de la curva de supervivencia celular. La relación lineal inversa entre uno y otro parámetro es claramente demostrativa.

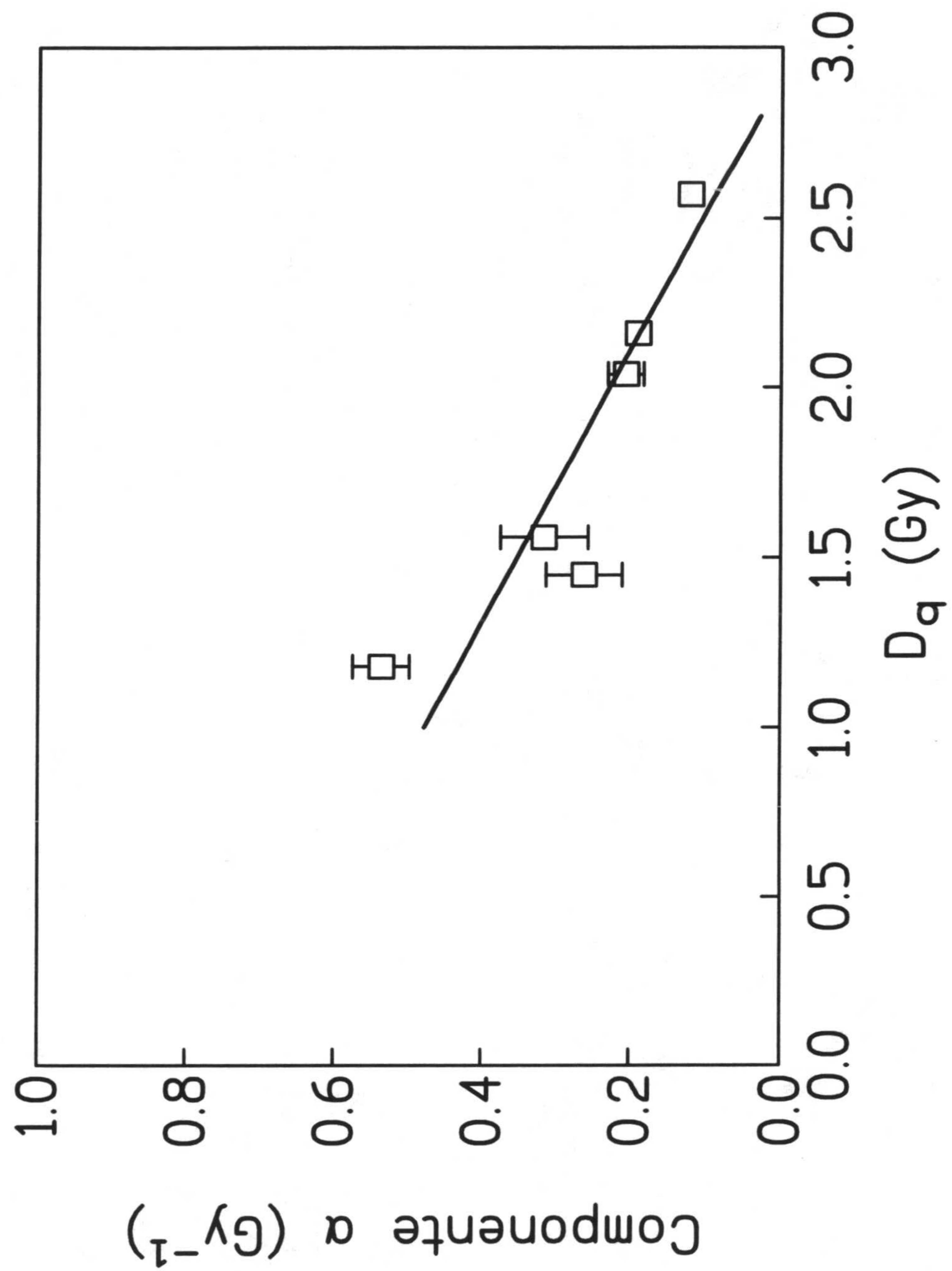


Figura 3.13 Representación gráfica de la relación, lineal inversa, existente entre el componente α y la dosis quasi-umbral (D_q)

3.4. ESTIMACION DEL NUMERO DE LESIONES MOLECULARES INICIALES INDUCIDAS POR LA RADIACION

La magnitud de la lesión inicial radioinducida fue estudiada para dosis comprendidas entre 0 y 45 Gy, a intervalos de 5 Gy, y expresada en términos de porcentaje de DNA retenido en el pozo (apartado 2.8.1). Los resultados obtenidos, para cada uno de los modelos tumorales utilizados, se exponen en las tablas a 3.21 a 3.26.

TABLA 3.21

LESION MOLECULAR INICIAL RADIOINDUCIDA

Línea Celular MCF-7 BUS

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>% DNA (M±ESM)</i>
0	100.0 ± 0.1
5	91.9 ± 2.9
10	93.9 ± 14.4
15	76.6 ± 6.0
20	77.2 ± 1.4
25	82.6 ± 9.1
30	73.1 ± 6.9
35	64.8 ± 5.3
40	63.4 ± 4.6
45	63.2 ± 7.6

Los valores recogidos en la tabla representan el valor medio y el error estándar de la media de, al menos, dos experimentos diferentes.

TABLA 3.22

LESION MOLECULAR INICIAL RADIOINDUCIDA

Línea Celular MCF-7 BB

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>% DNA (M±ESM)</i>
0	100.0 ± 3.5
5	91.3 ± 1.7
10	84.2 ± 1.8
15	77.4 ± 4.4
20	74.9 ± 6.0
25	72.0 ± 4.8
30	70.9 ± 1.5
35	66.7 ± 3.2
40	70.7 ± 4.6
45	59.7 ± 3.9

Los valores recogidos en la tabla representan el valor medio y el error estándar de la media de, al menos, dos experimentos diferentes.

TABLA 3.23

LESION MOLECULAR INICIAL RADIOINDUCIDA

Línea Celular T47D-B1

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>% DNA (M±ESM)</i>
0	100.0 ± 1.9
5	88.5 ± 2.5
10	85.4 ± 0.2
15	66.7 ± 1.5
20	60.9 ± 1.0
25	58.7 ± 4.0
30	52.9 ± 0.4
35	49.0 ± 3.7
40	48.8 ± 0.3
45	39.7 ± 6.7

Los valores recogidos en la tabla representan el valor medio y el error estándar de la media de, al menos, dos experimentos diferentes.

TABLA 3.24

LESION MOLECULAR INICIAL RADIOINDUCIDA

Línea Celular T47D-B8

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>% DNA (M±ESM)</i>
0	100.0 ± 0.1
5	93.9 ± 3.2
10	87.2 ± 3.7
15	79.7 ± 5.6
20	75.6 ± 4.0
25	72.0 ± 6.3
30	69.6 ± 2.8
35	64.0 ± 5.9
40	58.0 ± 9.0
45	57.5 ± 13.5

Los valores recogidos en la tabla representan el valor medio y el error estándar de la media de, al menos, dos experimentos diferentes.

TABLA 3.25

LESION MOLECULAR INICIAL RADIOINDUCIDA

Línea Celular EVSA-T

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>% DNA (M±ESM)</i>
0	100.0 ± 1.7
5	95.3 ± 6.0
10	90.5 ± 5.0
15	86.8 ± 7.8
20	70.9 ± 1.1
25	75.0 ± 6.1
30	76.4 ± 5.7
35	60.7 ± 6.7
40	64.7 ± 13.4
45	52.0 ± 4.9

Los valores recogidos en la tabla representan el valor medio y el error estándar de la media de, al menos, dos experimentos diferentes.

TABLA 3.26

LESION MOLECULAR INICIAL RADIOINDUCIDA

Línea Celular RT-112

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>% DNA (M±ESM)</i>
0	100.0 ± 1.5
5	87.9 ± 2.3
10	78.5 ± 3.4
15	80.3 ± 4.5
20	62.3 ± 2.2
32	66.6 ± 6.7
35	45.3 ± 5.3
45	52.7 ± 1.9

Los valores recogidos en la tabla representan el valor medio y el error estándar de la media de, al menos, dos experimentos diferentes.

3.4.1 Parámetros derivados del estudio semicuantitativo de lesión molecular

En los últimos años el parámetro de lesión molecular (rupturas dobles de cadena de DNA, RDC), extraíble de los experimentos de electroforesis de campo pulsado, ha sido la pendiente inicial de la curva dosis/respuesta obtenida (Blöcher, 1989, Iliakis, 1991, Whitaker, 1992). Como es fácil ver en las gráficas 3.14 a 3.19, la cantidad de DNA retenida en el pozo del gel disminuye en función de la dosis de radiación administrada, ajustándose inicialmente a una relación lineal (al menos para valores de dosis inferiores a 25 Gy). Para valores superiores a 25 Gy, la curva dosis/respuesta muestra un aplanamiento progresivo (Blöcher, 1990). Se supone que la porción inicial de la curva de extracción es proporcional al número de RDC de DNA (Iliakis, 1991; Whitaker, 1992; Ruiz de Almodóvar, 1994). De acuerdo con esta forma de pensar, hemos calculado la pendiente de las curvas de retención de DNA en función de la dosis de radiación (para valores comprendidos entre 0 y 20 Gy). Dichos valores aparecen reflejados en la tabla 3.27 en la que hemos incluido, además, los parámetros estadísticos que se refieren a la relación existente entre dosis y cantidad de DNA retenida en el pozo.

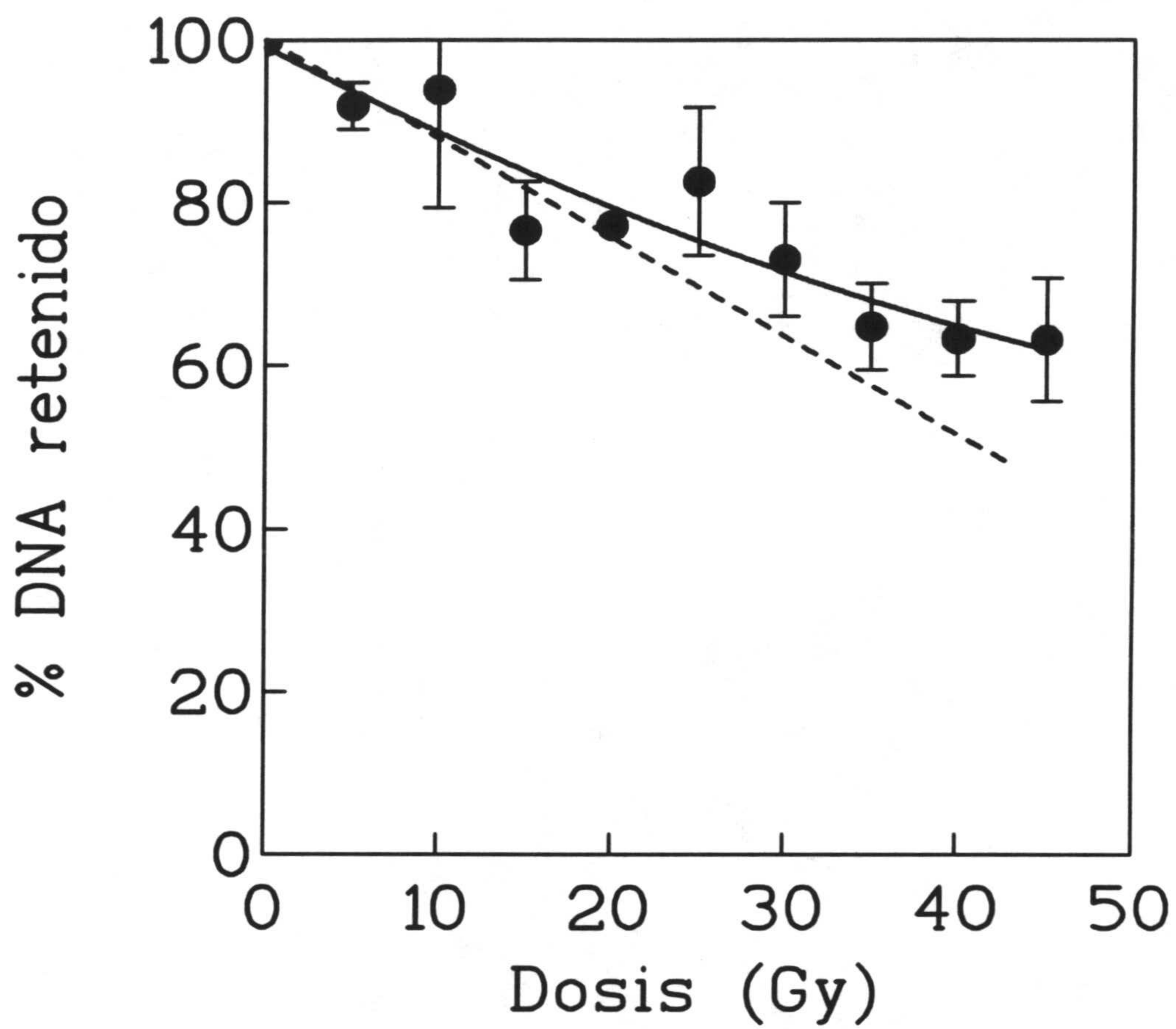


Figura 3.14

DNA (%) retenido en el pozo en función de la dosis. Línea celular MCF-7 BUS

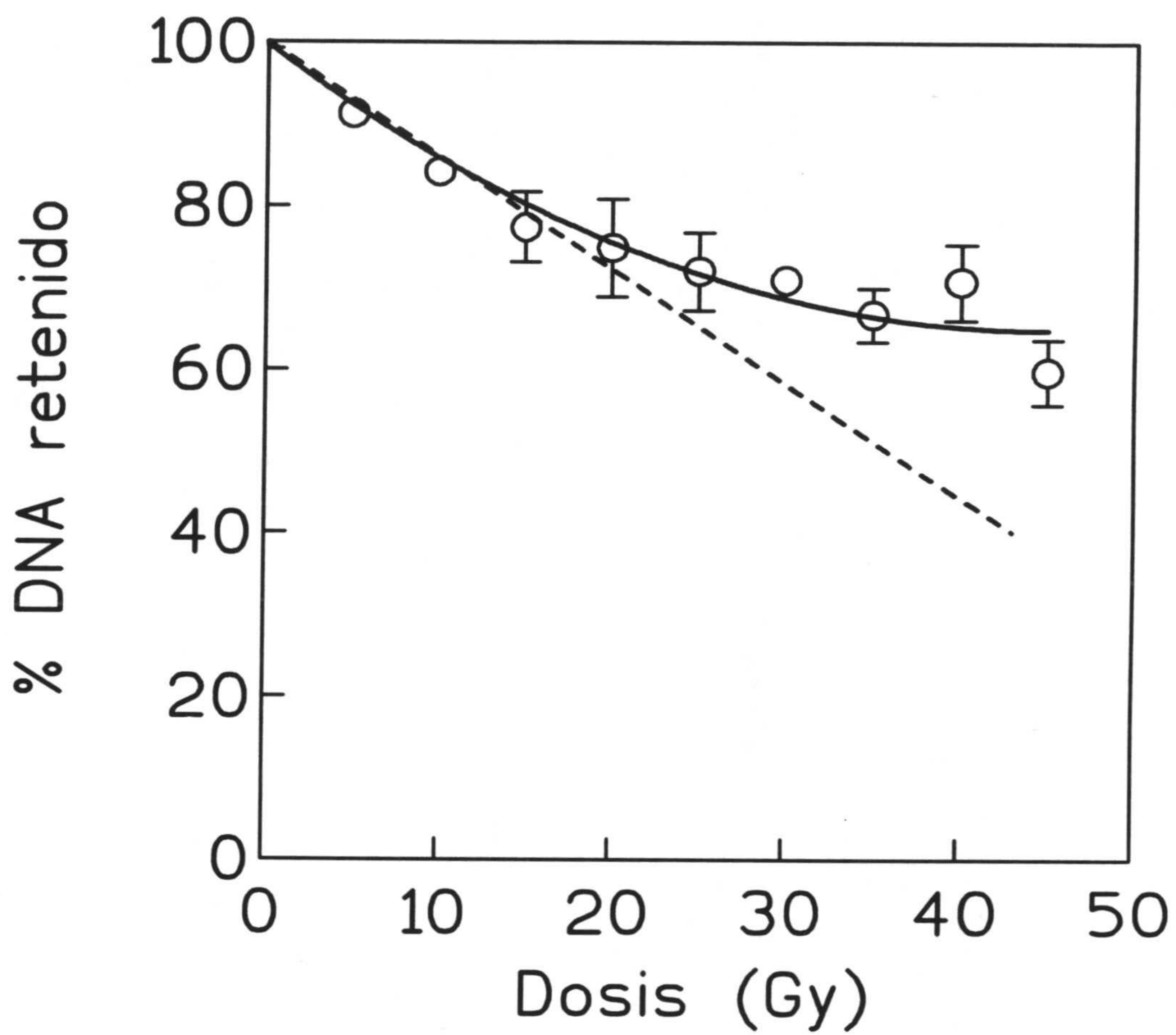


Figura 3.15 DNA (%) retenido en el pozo en función de la dosis. Línea celular MCF-7 BB

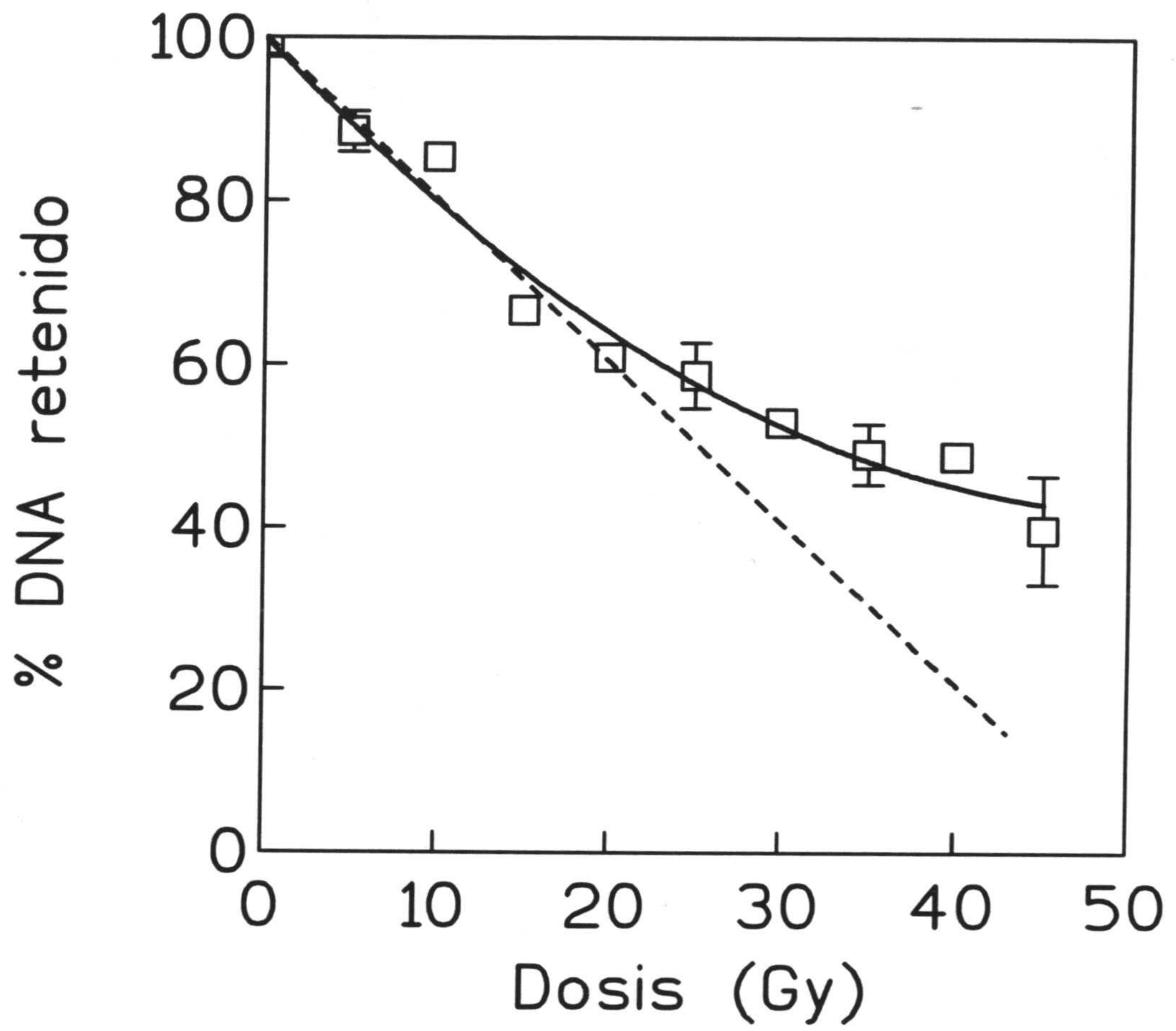


Figura 3.16 DNA (%) retenido en el pozo en función de la dosis. Línea celular T47D-B1

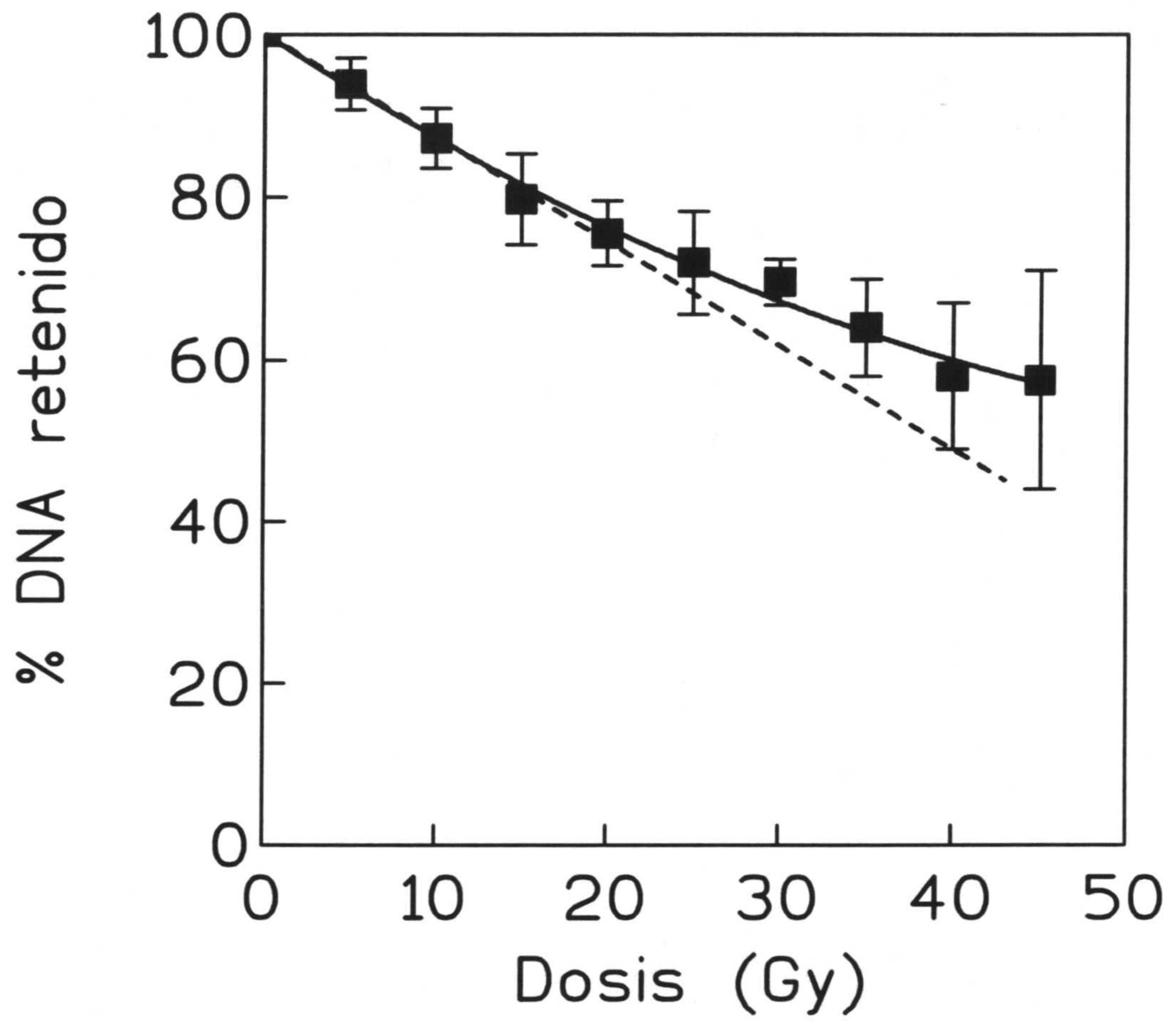


Figura 3.17

DNA (%) retenido en el pozo en función de la dosis. Línea celular T47D-B8

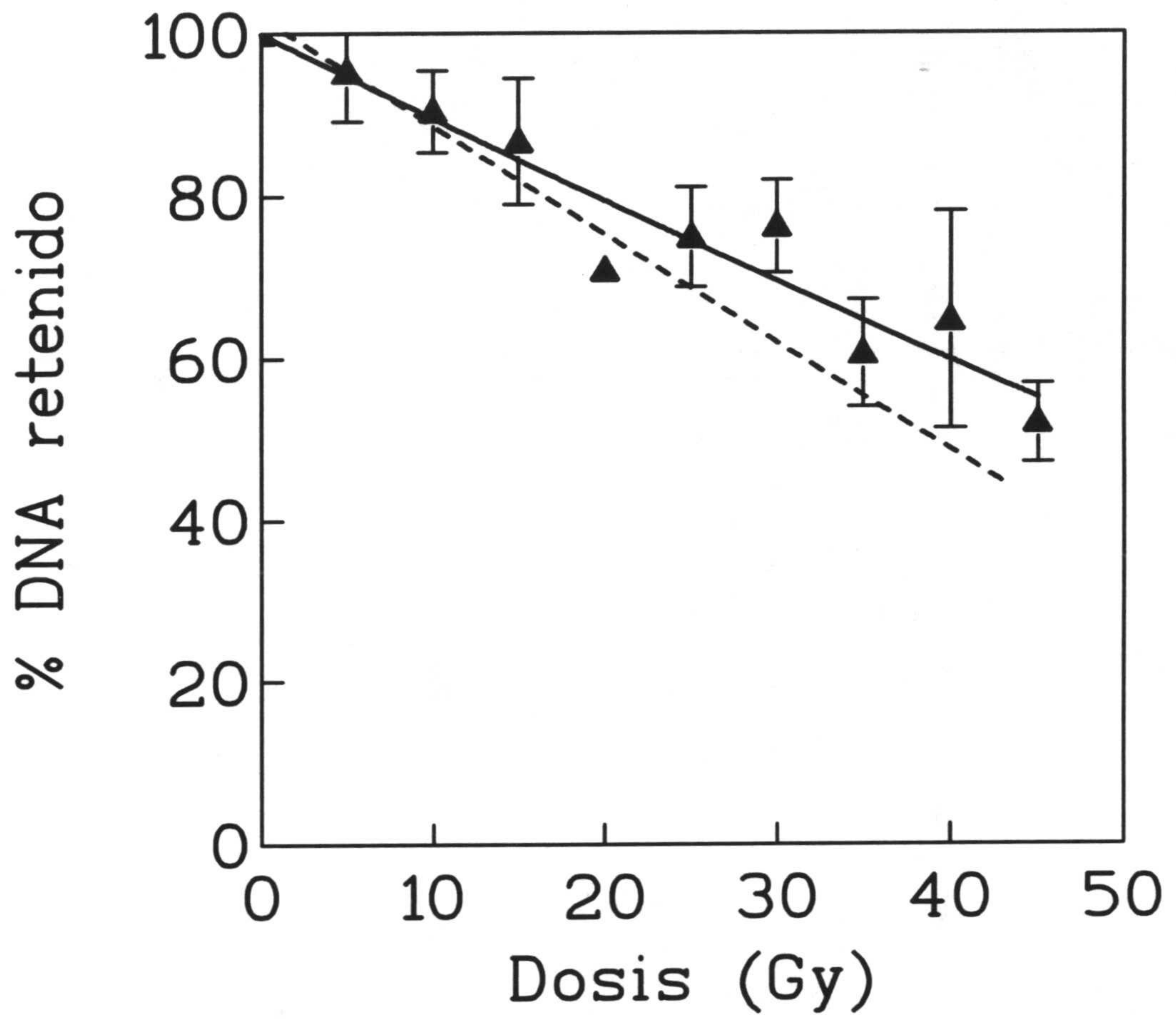


Figura 3.18 DNA (%) retenido en el pozo en función de la dosis. Línea celular EVSA-T

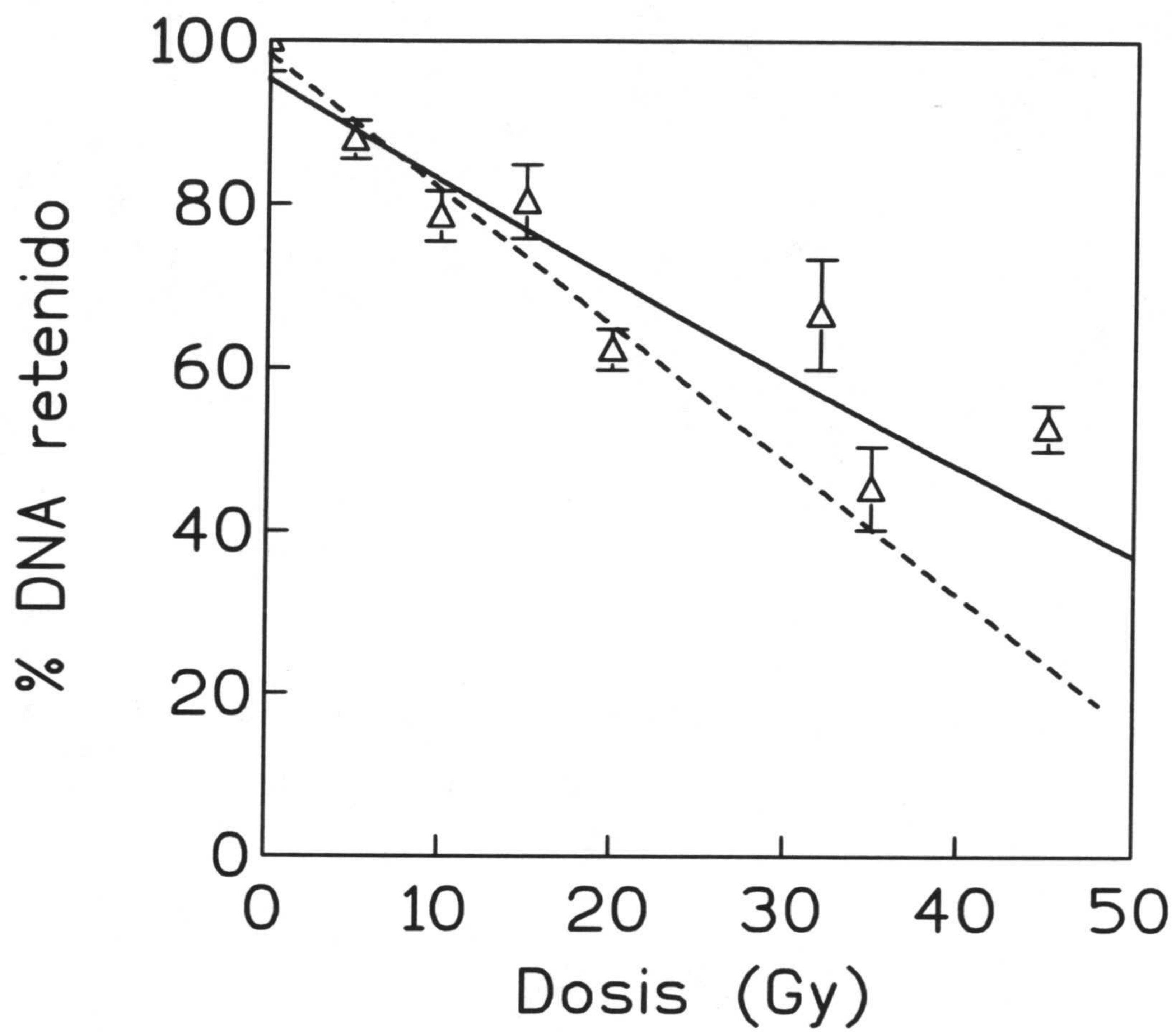


Figura 3.19

DNA (%) retenido en el pozo en función de la dosis. Línea celular RT-112

TABLA 3.27

**PARAMETROS DE RADIOSENSIBILIDAD MOLECULAR
PENDIENTE DE LAS CURVAS DOSIS / RESPUESTA**

<i>Línea Celular</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	-1.21 ± 0.4	100.0 ± 4.9	0.729	0.0170
<i>MCF-7 BB</i>	-1.39 ± 0.2	100.0 ± 2.9	0.743	0.0001
<i>T47D-B1</i>	-1.98 ± 0.2	100.0 ± 2.1	0.973	0.0001
<i>T47D-B8</i>	-1.28 ± 0.3	99.5 ± 3.6	0.863	0.0013
<i>EVSA-T</i>	-1.30 ± 0.2	102.3 ± 2.7	0.908	0.0007
<i>RT-112</i>	-1.66 ± 0.3	98.4 ± 3.8	0.951	0.0130

P: pendiente de la relación dosis/respuesta

I: intersección de la recta para $D = 0$ Gy (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido.

Las rectas de regresión obtenidas, tras ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales, han sido también dibujadas (líneas de trazos, figuras 3.1 a 3.19) y dejan ver con claridad el fenómeno de aplanamiento de las curvas, antes descrito, que se observa cuando la dosis supera el valor de 20-25 Gy.

3.4.2 Relación entre parámetros de supervivencia celular y parámetros de lesión molecular inicial.

No hemos podido demostrar la existencia de ningún tipo de relación entre los valores de supervivencia celular a 2 Gy (radiosensibilidad celular intrínseca), o los valores del componente alfa de la curva de supervivencia (modelo lineal-cuadrático) y la pendiente de la curva de retención de DNA. Los datos correspondientes al estudio estadístico efectuado (FS2/pendiente: $r = 0.658$, $p = 0.227$; α /pendiente: $r = 0.580$, $p = 0.305$), demuestran con claridad la anterior afirmación.

3.4.3 Parámetros de radiosensibilidad molecular derivados del estudio cuantitativo de lesión inicial radioinducida.

La aplicación del procedimiento matemático para cálculo de las rupturas dobles de cadena de DNA (Ruiz de Almodóvar, 1993; Ruiz de Almodóvar 1994 a,b) a los resultados de la electroforesis de campo pulsado, nos ha permitido conocer la magnitud de la lesión molecular inicialmente radioinducida, en función de la dosis de radiación administrada, para cada uno de los modelos tumorales ensayados. Los resultados obtenidos se han resumido en las tablas 3.28 a 3.33. En ellas se exponen los resultados del cálculo de RDC para cada uno de los experimentos realizados utilizando como expresión el valor medio del número de rupturas dobles de cadena de DNA y el error estándar de dicho valor medio.

TABLA 3.28

ESTIMACION CUANTITATIVA DE LESION MOLECULAR INICIAL

Línea Celular MCF-7 BUS

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>RDC / DNA*</i>	
	<i>Exp 1</i>	<i>Exp 2</i>
5	20.8 ± 1.3	33.4 ± 2.5
10	27.2 ± 1.8	21.0 ± 1.2
15	25.7 ± 2.3	424.3 ± 4.4
20	46.2 ± 3.9	77.1 ± 10.7
25	49.0 ± 4.6	117.8 ± 13.3
30	65.0 ± 14.5	85.0 ± 24.0
35	92.8 ± 19.5	112.7 ± 10.2
40	135.3 ± 22.6	103.4 ± 12.2
45	141.0 ± 23.2	103.3 ± 9.9

* *RDC: número de roturas dobles de cadena*

Unidad DNA: 200 Mpb

TABLA 3.29

ESTIMACION CUANTITATIVA DE LESION MOLECULAR INICIAL

<i>Línea Celular MCF-7 BB</i>			
<i>Dosis (Gy)</i>	<i>RDC / DNA*</i>		
	<i>Exp 1</i>	<i>Exp 2</i>	<i>Exp 3</i>
5	10.5±1.7	22.5±2.3	13.4± 6.5
10	16.6±2.4	33.5±3.6	33.9± 6.3
15	23.9±2.3	45.2±4.6	25.0±10.4
20	43.1±5.1	63.9±5.8	32.8± 5.4
25	46.7±6.1	73.3±9.7	41.4±8.3
30	69.6±6.3	88.6±9.6	60.7±17.3
35	72.1±6.5	96.7±10.4	73.3±7.2
40	80.4±5.6	110.9±8.5	103.9±4.9
45	82.8±7.5	--	94.8±5.2

* *RDC: número de roturas dobles de cadena*

Unidad DNA: 200 Mpb

TABLA 3.30

ESTIMACION CUANTITATIVA DE LESION MOLECULAR INICIAL

Línea Celular T47D-B1

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>RDC / DNA*</i>		
	<i>Exp 1</i>	<i>Exp 2</i>	<i>Exp 3</i>
5	12.9±1.0	9.1±1.2	----
10	14.3±1.6	18.4±2.2	10.8±2.1
15	29.4±3.9	22.2±1.5	21.5±3.0
20	342.9±4.4	31.4±8.0	29.0±3.8
25	38.6±4.0	-----	33.4±8.4
30	52.7±5.8	47.2±9.0	41.6±4.8
35	58.0±6.4	55.4±11.5	41.8±5.5
40	65.5±2.4	65.7±15.0	55.6±2.9
45	81.6±6.7	74.6±8.7	59.9±3.5

* *RDC: número de roturas dobles de cadena*

Unidad DNA: 200 Mpb

TABLA 3.31

ESTIMACION CUANTITATIVA DE LESION MOLECULAR INICIAL

Línea Celular T47D-B8

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>RDC / DNA*</i>	
	<i>Exp 1</i>	<i>Exp 2</i>
5	4.3±2.3	9.2±1.2
10	12.4±2.2	13.9±1.7
15	22.5±5.1	20.4±1.9
20	26.9±4.6	30.3±3.7
25	22.9±2.8	39.1±4.9
30	25.9±7.3	39.7±4.4
35	63.0±2.4	52.1±5.4
40	47.3±5.6	62.7±4.4
45	51.4±4.8	67.7±4.2

* *RDC: número de roturas dobles de cadena*
Unidad DNA: 200 Mpb

TABLA 3.32

ESTIMACION CUANTITATIVA DE LESION MOLECULAR INICIAL

Línea Celular EVSA-T

<i>Dosis</i> (Gy)	<i>RDC / DNA*</i>	
	<i>Exp 1</i>	<i>Exp 2</i>
5	13.3 ± 1.6	10.8 ± 0.7
10	28.5 ± 4.9	16.3 ± 1.3
15	19.0 ± 2.6	19.5 ± 1.4
20	42.2 ± 4.8	28.4 ± 3.9
25	39.0 ± 8.4	29.7 ± 3.4
30	60.0 ± 10.0	37.4 ± 3.4
35	50.2 ± 5.1	46.2 ± 3.0
40	61.5 ± 5.9	54.4 ± 4.5
45	67.1 ± 5.9	56.1 ± 2.9

* *RDC: número de roturas dobles de cadena*

Unidad DNA: 200 Mpb

TABLA 3.33

ESTIMACION CUANTITATIVA DE LESION MOLECULAR INICIAL

Línea Celular RT-112

<i>Dosis</i> (Gy)	<i>RDC / DNA*</i>	
	<i>Exp 1</i>	<i>Exp 2</i>
5	14.6 ± 1.7	9.1 ± 2.3
10	15.0 ± 1.7	20.2 ± 3.5
20	26.4 ± 1.5	30.5 ± 4.7
32	39.4 ± 1.0	40.9 ± 2.4
55	55.2 ± 8.8	63.0 ± 5.1

* *RDC: número de roturas dobles de cadena*

Unidad DNA: 200 Mpb

Las figuras 3.20 a 3.25 ofrecen en forma gráfica los resultados obtenidos. En ellas se ha representado, en ordenadas, el número de rupturas dobles de cadena de DNA por unidad de DNA (hemos utilizado 200 Mpb como valor medio de tamaño del cromosoma humano) y en abcisas los correspondientes valores de dosis. La pendiente de cada una de las rectas obtenidas representa, por tanto, el número de RDC de DNA inducidas por la radiación por cada 200 Mpb y por cada Gy de dosis.

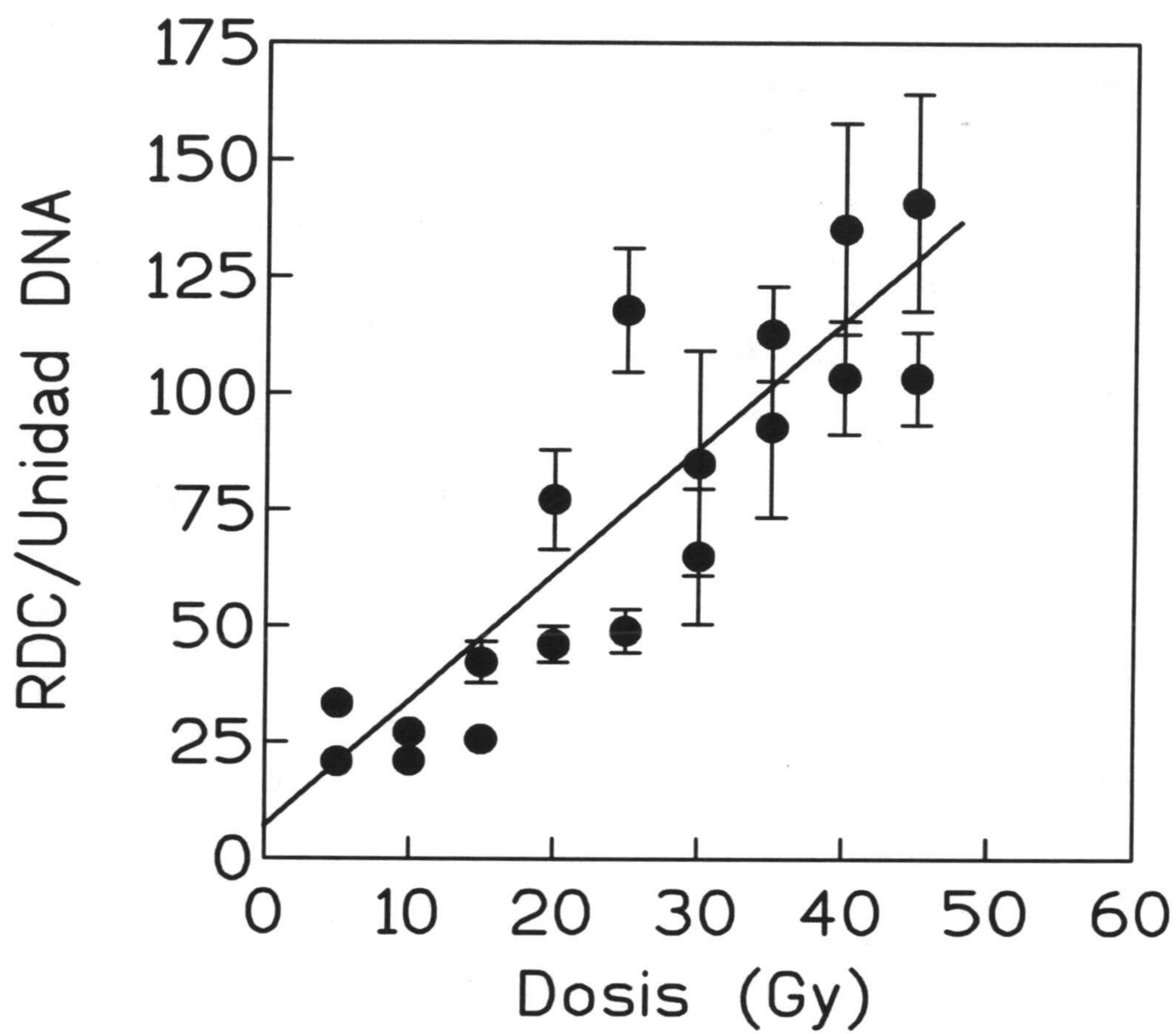


Figura 3.20 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis. Línea celular MCF-7 BUS

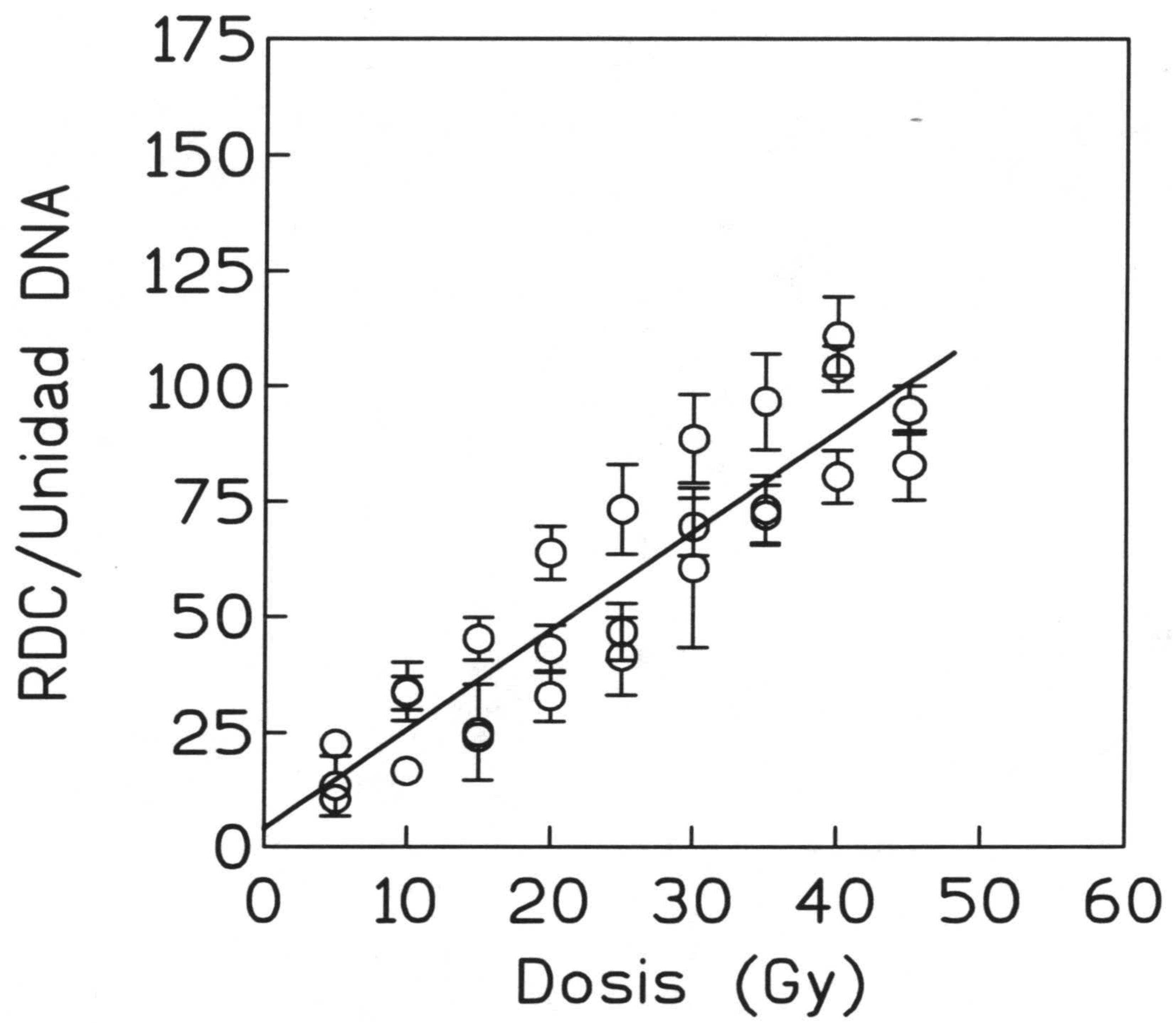


Figura 3.21 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis. Línea celular MCF-7 BB

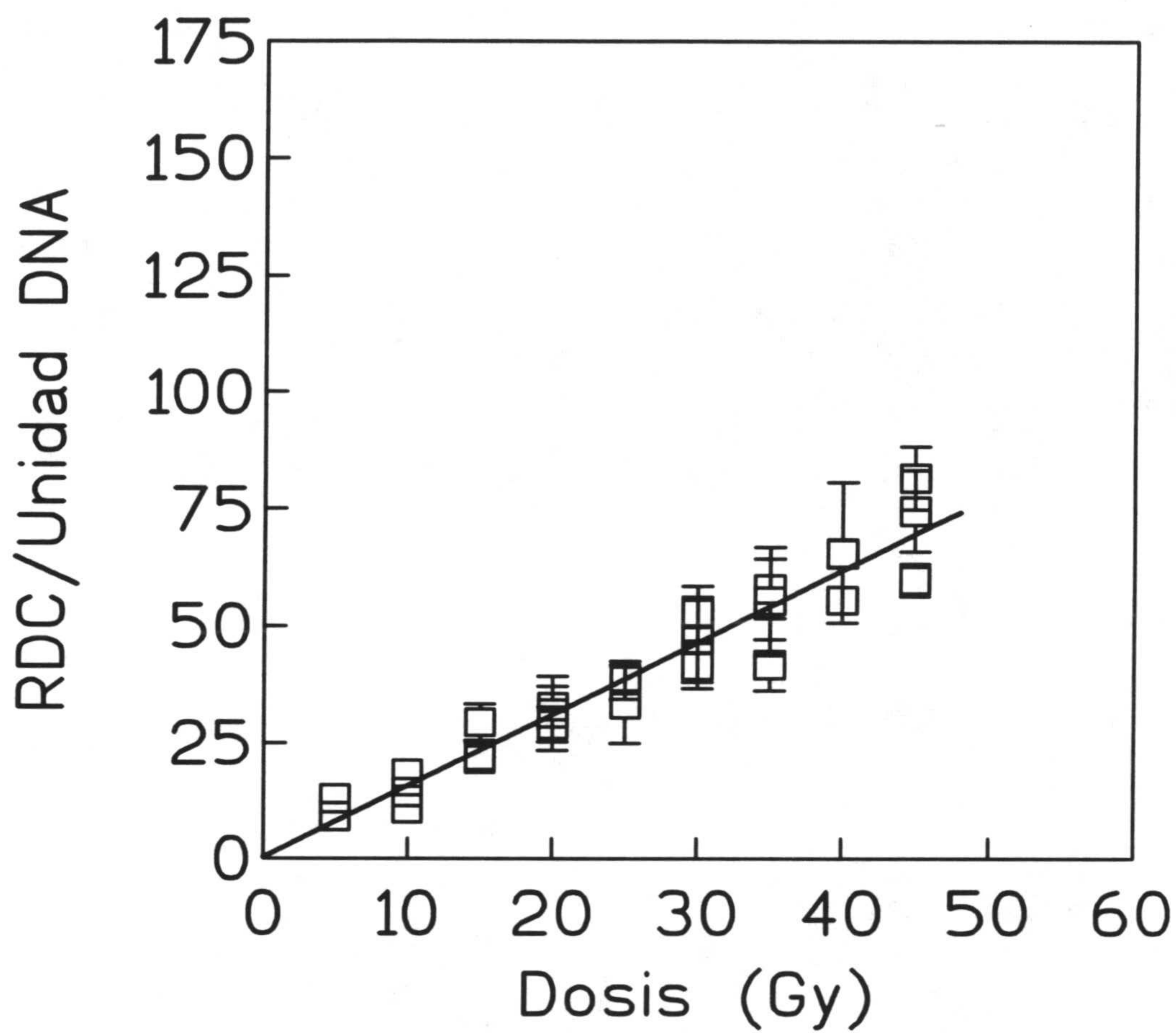


Figura 3.22 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis. Línea celular T47D-B1

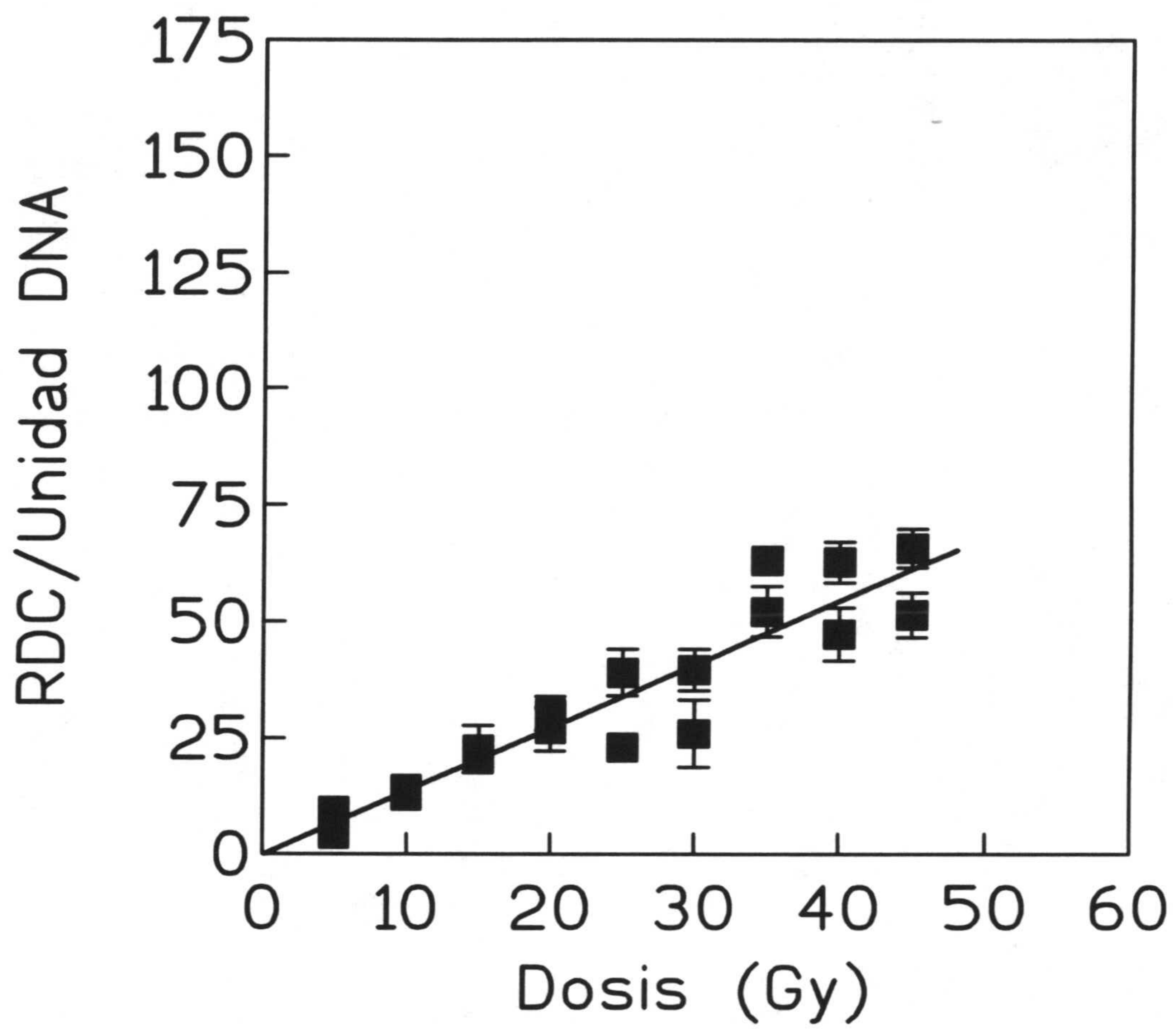


Figura 3.23 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis. Línea celular T47D-B8

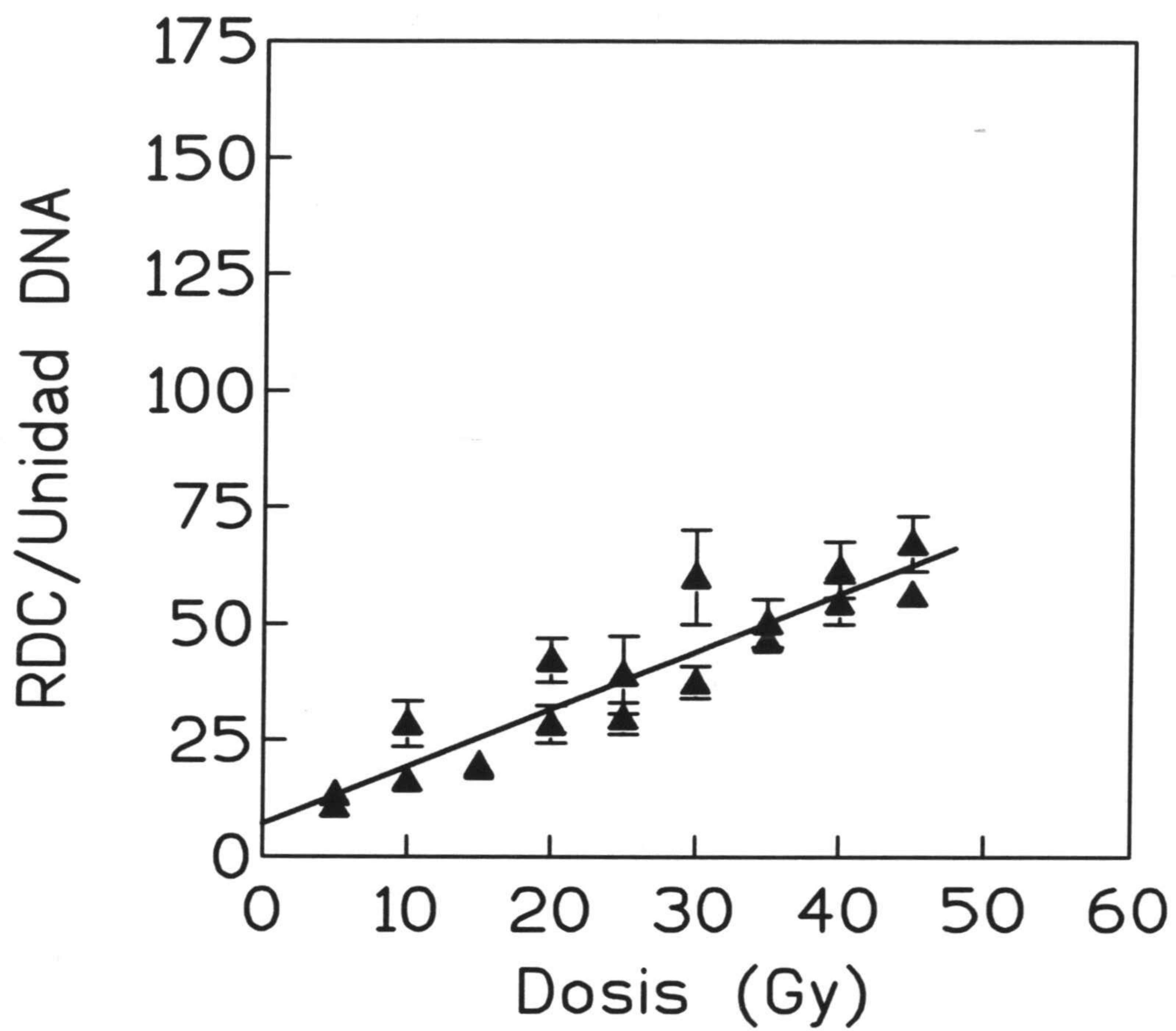
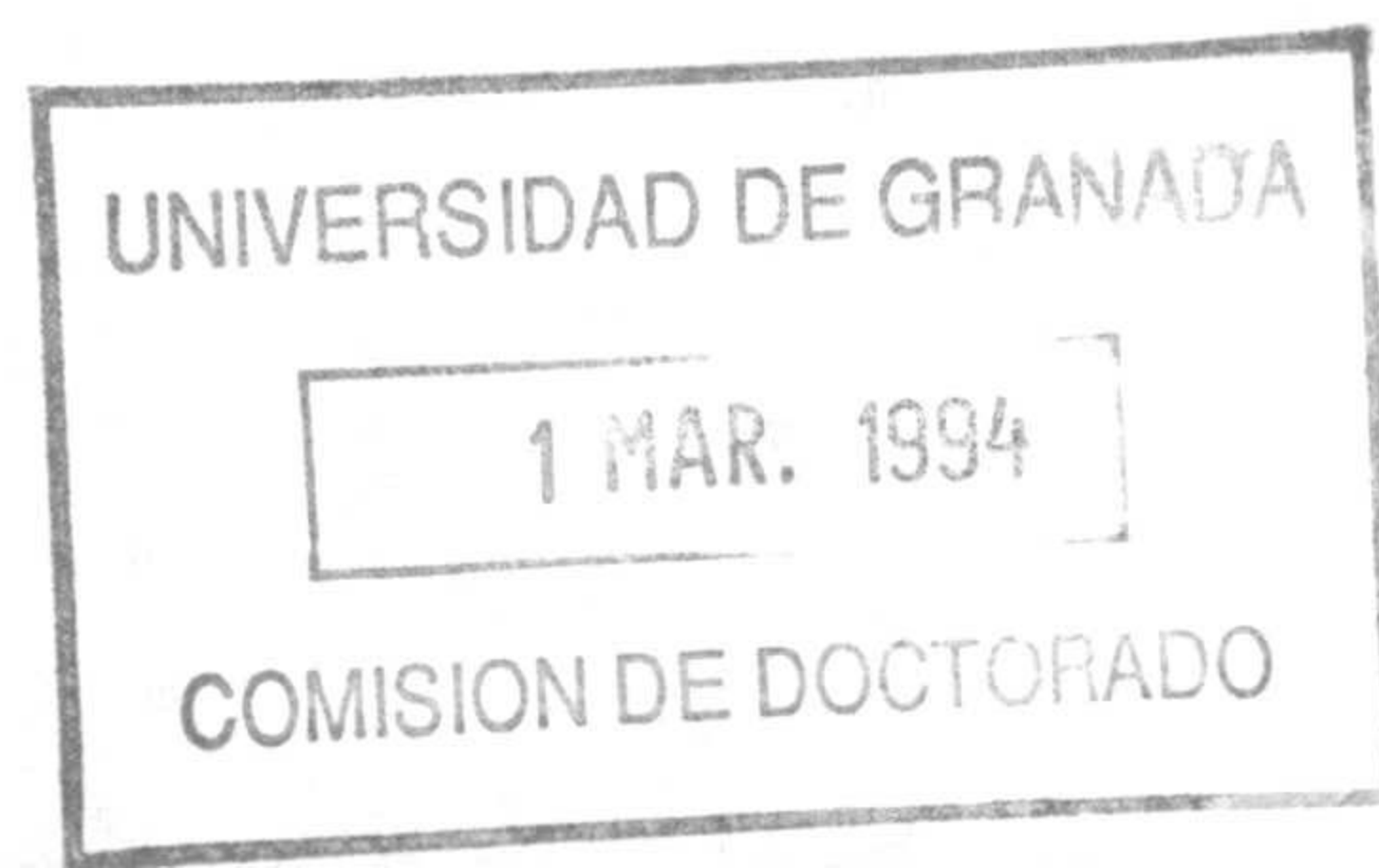


Figura 3.24 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis. Línea celular EVSA-T



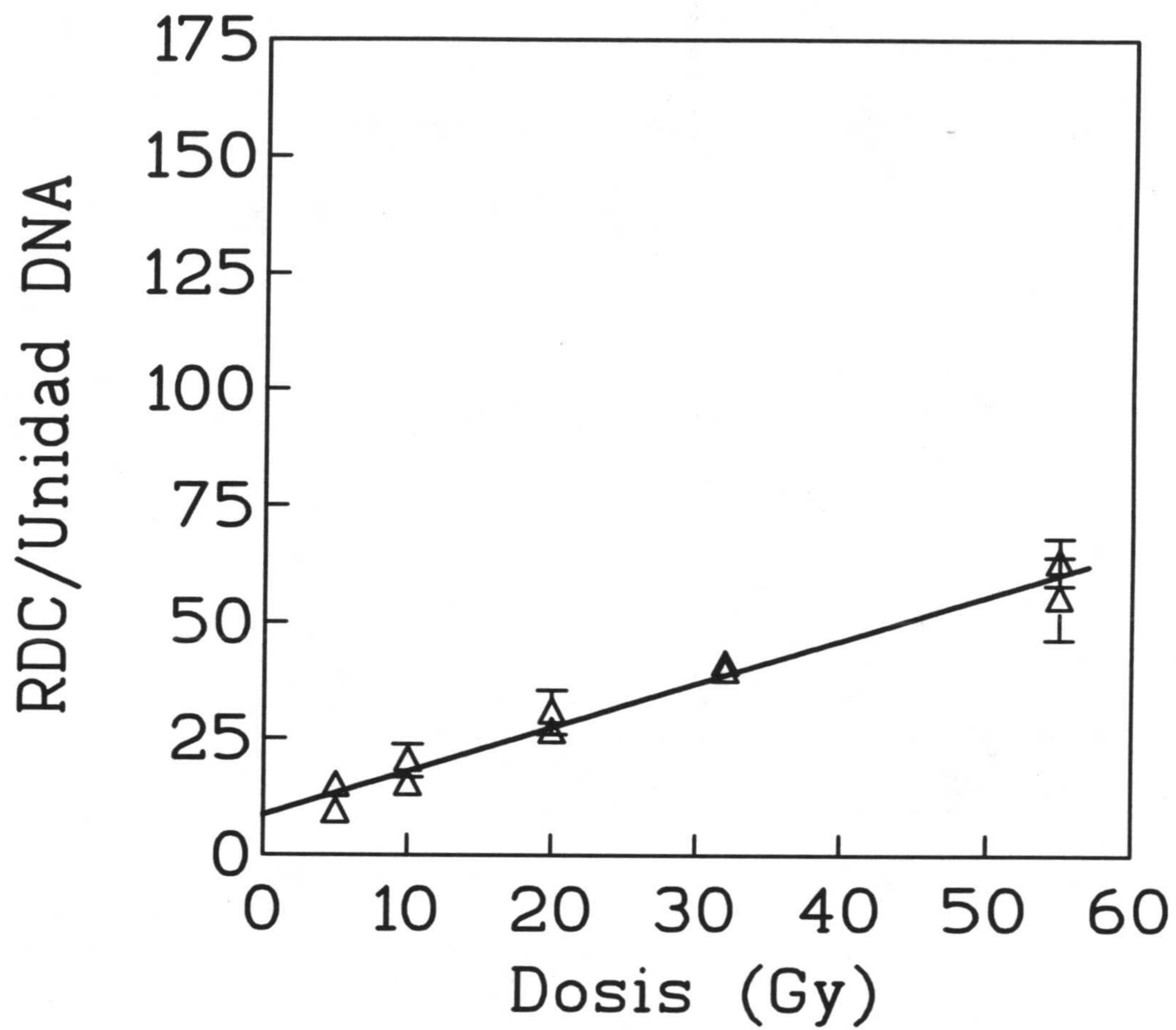


Figura 3.25 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA en función de la dosis.

Línea celular RT-112

Los parámetros de tales funciones lineales, así como los correspondientes valores de los estadísticos: coeficiente de correlación lineal y nivel de significación estadística, se han tabulado (tabla 3.34) y son demostrativos de dos hechos:

a) Entre el número de RDC de DNA inducidas por la radiación y la magnitud de la dosis administrada, existe una relación lineal.

b) Entre los diferentes modelos tumorales ensayados existen diferencias en el parámetro de representa el daño molecular inducido por cada 200 Mpb y por unidad de dosis (pendiente de las rectas de regresión obtenidas).

TABLA 3.34

ESTIMACION CUANTITATIVA DEL DAÑO MOLECULAR RADIOINDUCIDO

<i>Línea Celular</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	2.70 ± 0.27	7.1 ± 7.7	0.890	< 0.0001
<i>MCF-7 BB</i>	2.15 ± 0.19	4.0 ± 5.0	0.914	< 0.0001
<i>T47D-B1</i>	1.54 ± 0.09	0.4 ± 2.5	0.966	< 0.0001
<i>T47D-B8</i>	1.36 ± 0.14	0.2 ± 3.8	0.928	< 0.0001
<i>EVSA-T</i>	1.23 ± 0.11	7.5 ± 3.2	0.971	< 0.0001
<i>RT-112</i>	0.94 ± 0.06	8.4 ± 1.7	0.986	< 0.0001

P: pendiente de la relación dosis/respuesta

I: intersección de la recta para $D = 0$ Gy (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido.

3.4.3 Relaciones entre parámetros cuantitativos moleculares y celulares de radiosensibilidad.

En la búsqueda de las relaciones de asociación o dependencia entre los parámetros celulares derivados del ensayo de clonogenicidad celular (considerados como indicadores clásicos de la radiosensibilidad celular intrínseca) y los parámetros moleculares incluidos en la tabla 3.34 (RDC/200 Mpb/Gy), hemos utilizado los datos extraídos tanto del modelo lineal-cuadrático (tabla 3.17), como los obtenidos tras el ajuste al modelo de múltiples blancos (tabla 3.18).

Los resultados obtenidos nos han permitido poner de manifiesto que entre los parámetros celulares (fracción de supervivencia a 2 Gy y componente α de la curva de supervivencia) y la estimación de daño molecular inducido por unidad de dosis y de tamaño de cromosoma, existe una estrecha relación lineal.

Las funciones que relacionan ambos datos de radiosensibilidad se muestran en la tabla 3.35. En ella hemos incluido también los resultados del estudio de correlación entre RDC y los parámetros D_0 , D_q y n , derivados del ajuste de los datos experimentales de supervivencia celular al modelo de múltiples blancos.

TABLA 3.35

**RELACIONES ENTRE PARAMETROS CELULARES Y MOLECULARES
DE RADIOSENSIBILIDAD**

	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>RDC/FS2</i>	-5.12 ± 0.7	4.5 ± 0.4	-0.964	0.019
<i>RDC/α</i>	-4.16 ± 0.8	0.52 ± 0.2	-0.932	0.007
<i>RDC/β</i>	--	--	-0.513	-0.298
<i>RDC/D₀</i>	--	--	0.338	0.512
<i>RDC/D_q</i>	(0.97 ± 0.4)	(3.4 ± 0.8)	-0.769	0.074
<i>RDC/n</i>	--	--	-0.586	0.222

P: pendiente de la relación dosis/respuesta

I: intersección de la recta para $D = 0$ Gy (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido.

Hemos incluido en la tabla los valores de la pendiente e intersección en el origen para el ajuste RDC/D_q por encontrarse éstos cerca del límite de significación estadística.

Las relaciones existentes entre FS2 y RDC, componente α y RDC, así como la sugerida entre D_q y RDC se ofrecen en las figuras 3.26 a 3.28.

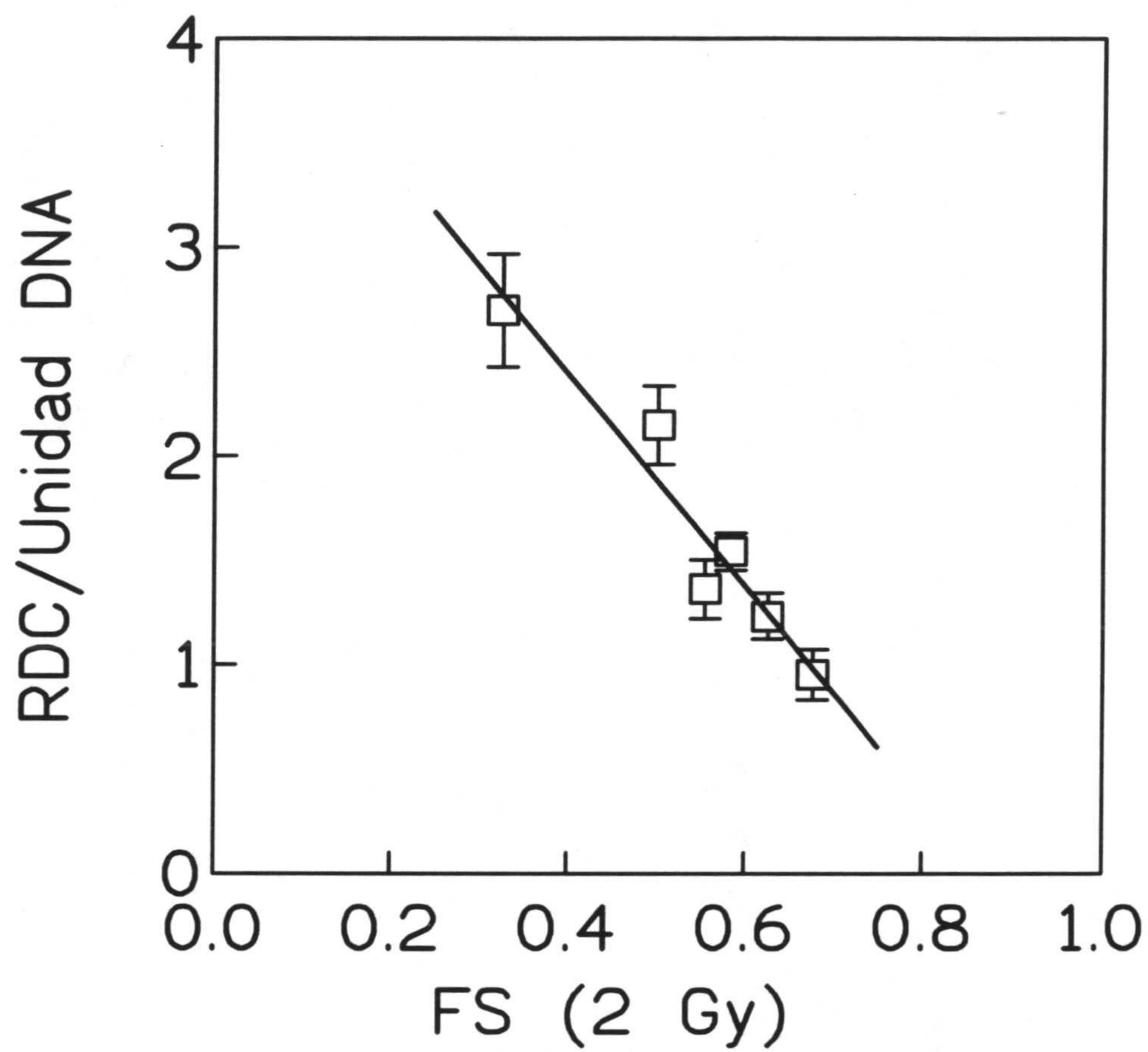


Figura 3.26 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA y fracción de supervivencia a 2 Gy. Relación lineal inversa

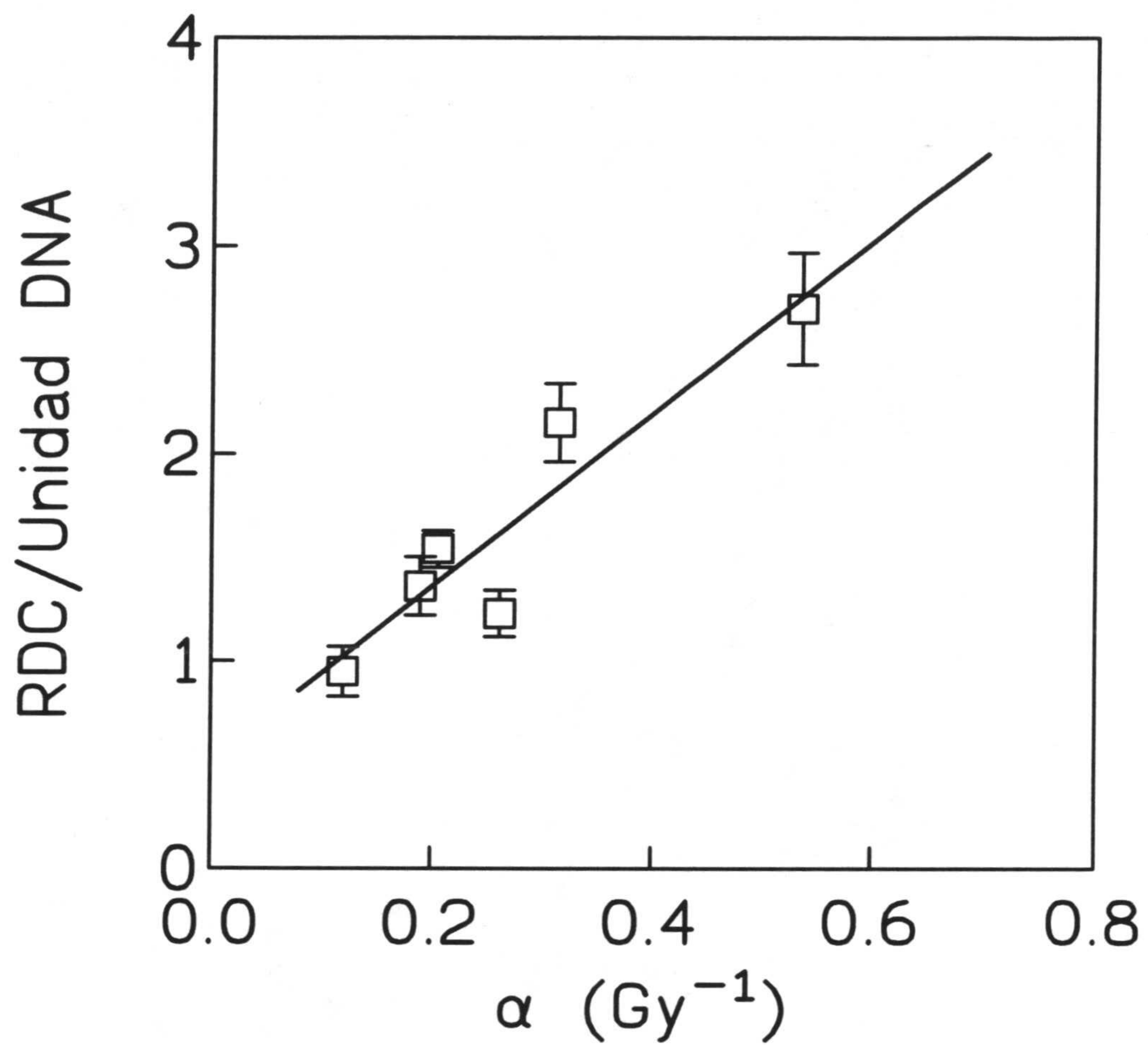


Figura 3.27 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA y componente α de la curva de supervivencia. Relación directa.

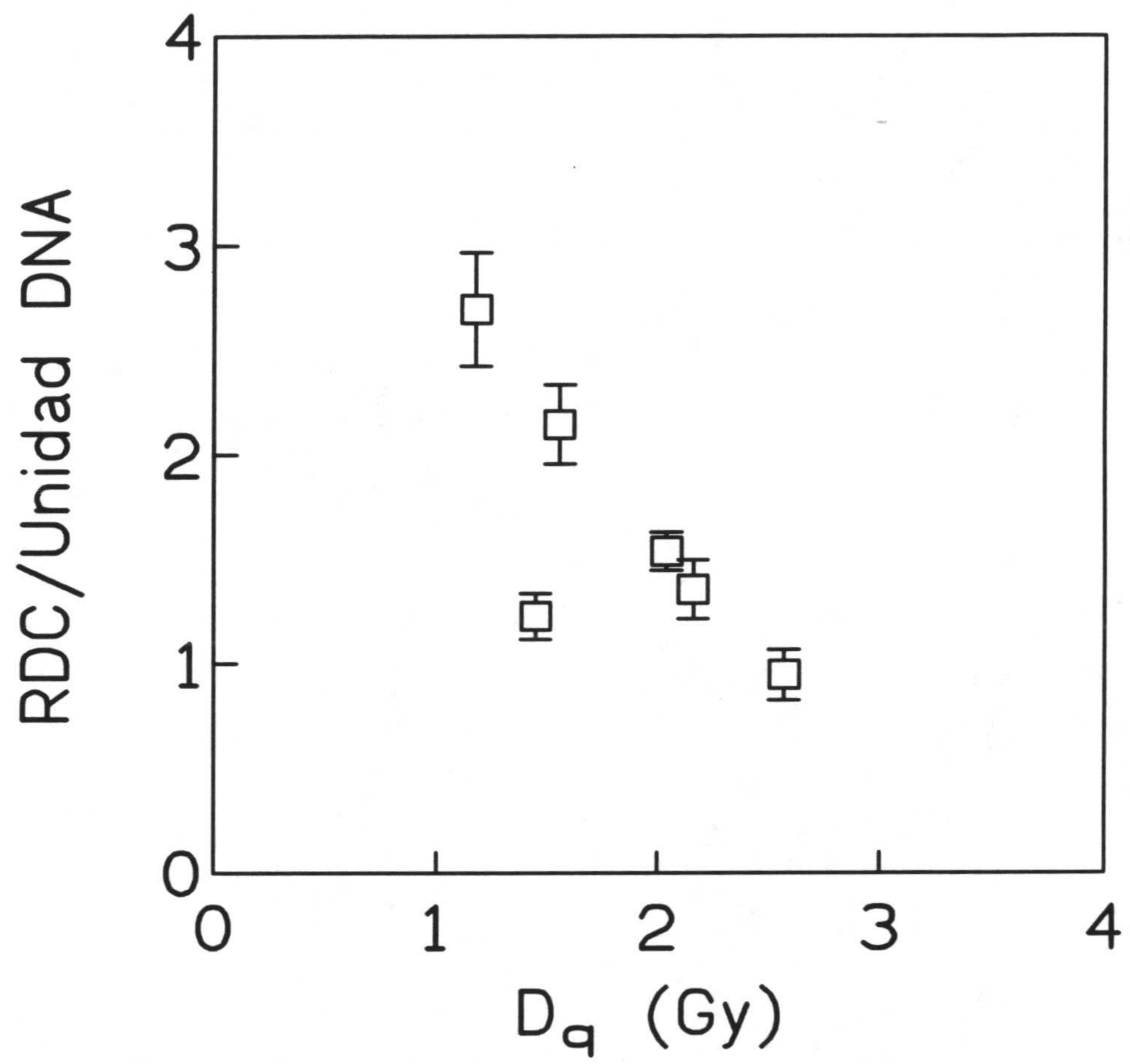


Figura 3.28 Rupturas dobles de cadena por unidad de DNA y parámetro D_q .

Relación no lineal

3.5. CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE LAS RUPTURAS DOBLES DE CADENA DE DNA

Los experimentos encaminados a valorar la capacidad de cada uno de los modelos tumorales ensayados para reagrupar las cadenas de DNA rotas por la radiación, se desarrollaron de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito (apartado 2.7.2; Núñez, 1994). Para ello, células irradiadas a dosis de 45 Gy se incubaron durante periodos de tiempo variables (0 a 24 horas), a la temperatura de 37 °C. La capacidad de reagrupamiento de RDC se evaluó utilizando los datos de actividad liberada del pozo para cada tiempo de incubación, tomando como referencia el valor correspondiente al tiempo "cero". De esta manera, se ha calculado la fracción de actividad liberada para cada uno de los puntos experimentales. Los datos correspondientes a cada uno de los modelos tumorales utilizados figuran en las tablas 3.36 a 3.41.

TABLA 3.36

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular MCF-7 BUS

<i>Tiempo (h)</i>	<i>FAE_t/FAE₀</i>	<i>ESM</i>
0	1.000	0.012
0.0833	0.820	0.053
0.25	0.715	0.019
0.5	0.593	0.017
0.75	0.540	0.011
1	0.520	0.009
1.25	0.481	0.028
1.5	0.432	0.012
2	0.332	0.054
4	0.273	0.098
6	0.243	0.075
8	0.215	0.053
24	0.125	0.013

FAE_t/FAE₀ = Fracción de actividad extraída en el tiempo *t* dividida por la fracción de actividad extraída en el tiempo 0 (Valor medio de al menos 2 experimentos).

ESM = Error estándar del correspondiente valor medio.

TABLA 3.37

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular MCF-7 BB

<i>Tiempo (h)</i>	<i>FAE_t/FAE₀</i>	<i>ESM</i>
0	1.000	0.040
0.0833	0.780	0.052
0.25	0.699	0.019
0.5	0.658	0.023
0.75	0.574	0.015
1	0.508	0.046
1.5	0.449	0.013
2	0.352	0.009
4	0.283	0.041
6	0.230	0.012
8	0.207	0.008
24	0.174	0.011

FAE_t/FAE₀ = Fracción de actividad extraída en el tiempo t dividida por la fracción de actividad extraída en el tiempo 0 (Valor medio de al menos 2 experimentos).

ESM = Error estándar del correspondiente valor medio

TABLA 3.38

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular T47D-B1

<i>Tiempo (h)</i>	<i>FAE_t/FAE₀</i>	<i>ESM</i>
0	1.000	0.084
0.0833	0.850	0.038
0.25	0.702	0.021
0.5	0.614	0.051
0.75	0.467	0.034
1	0.458	0.028
1.25	0.438	0.078
1.5	0.320	0.022
2	0.305	0.017
4	0.269	0.011
6	0.226	0.029
8	0.200	0.092
24	0.171	0.034

FAE_t/FAE₀ = Fracción de actividad extraída en el tiempo t dividida por la fracción de actividad extraída en el tiempo 0 (Valor medio de al menos 2 experimentos).

ESM = Error estándar del correspondiente valor medio.

TABLA 3.39

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular T47D-B8

<i>Tiempo (h)</i>	<i>FAE_t/FAE₀</i>	<i>ESM</i>
0	1.000	0.098
0.0833	0.887	0.030
0.25	0.816	0.025
0.5	0.774	0.045
0.75	0.569	0.012
1	0.531	0.023
1.25	0.470	0.031
1.5	0.422	0.026
2	0.347	0.018
4	0.264	0.022
6	0.209	0.034
8	0.188	0.085
24	0.140	0.062

FAE_t/FAE₀ = Fracción de actividad extraída en el tiempo t dividida por la fracción de actividad extraída en el tiempo 0 (Valor medio de al menos 2 experimentos).

ESM = Error estándar del correspondiente valor medio

TABLA 3.40

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular EVSA-T

<i>Tiempo (h)</i>	<i>FAE_t/FAE₀</i>	<i>ESM</i>
0	1.000	0.040
0.0833	0.976	0.032
0.25	0.802	0.016
0.5	0.697	0.024
0.75	0.624	0.042
1	0.474	0.065
1.5	0.430	0.016
2	0.373	0.013
4	0.301	0.048
6	0.256	0.052
8	0.135	0.055
24	0.135	0.034

FAE_t/FAE₀ = Fracción de actividad extraída en el tiempo t dividida por la fracción de actividad extraída en el tiempo 0 (Valor medio de al menos 2 experimentos).

ESM = Error estándar del correspondiente valor medio

TABLA 3.41

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular RT-112

<i>Tiempo (h)</i>	<i>FAE_t/FAE₀</i>	<i>ESM</i>
0	1.000	0.051
0.0833	0.839	0.025
0.25	0.680	0.036
0.5	0.564	0.054
0.75	0.416	0.016
1	0.306	0.039
1.25	0.293	0.025
1.5	0.284	0.034
2	0.273	0.018
4	0.283	0.046
6	0.271	0.052
8	0.230	0.038
24	0.219	0.031

FAE_t/FAE₀ = Fracción de actividad extraída en el tiempo *t* dividida por la fracción de actividad extraída en el tiempo 0 (Valor medio de al menos 2 experimentos).

ESM = Error estándar del correspondiente valor medio.

Hemos representado gráficamente (figuras 3.29 a 3.34) los datos incluidos en las anteriores tablas y de su análisis es fácil deducir que el proceso de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación ocurre con rapidez. En efecto, la mayor parte de este proceso se realiza en las cuatro primeras horas que siguen a la irradiación. Las figuras anteriormente mencionadas incluyen un línea de puntos que representa la suma del daño residual (rupturas dobles de cadena de DNA no reparadas tras 24 horas de incubación) y el daño producido por la manipulación, lisis y fuerza eléctrica que hemos evaluado sobre células no irradiadas. Sustrayendo este valor de cada uno de los puntos experimentales es posible calcular la velocidad de reagrupamiento de las cadenas de DNA (Frankenberg-Schwager, 1992). Procediendo de esta forma y volviendo a referir todos los valores experimentales al valor correspondiente al tiempo 0 horas de reagrupamiento, hemos calculado la por nosotros mismos denominada Fracción de Reagrupamiento, FR, (apartado 2.8.3). Los datos resultantes de estos cálculos se han recogido en las tablas 3.42 a 3.47.

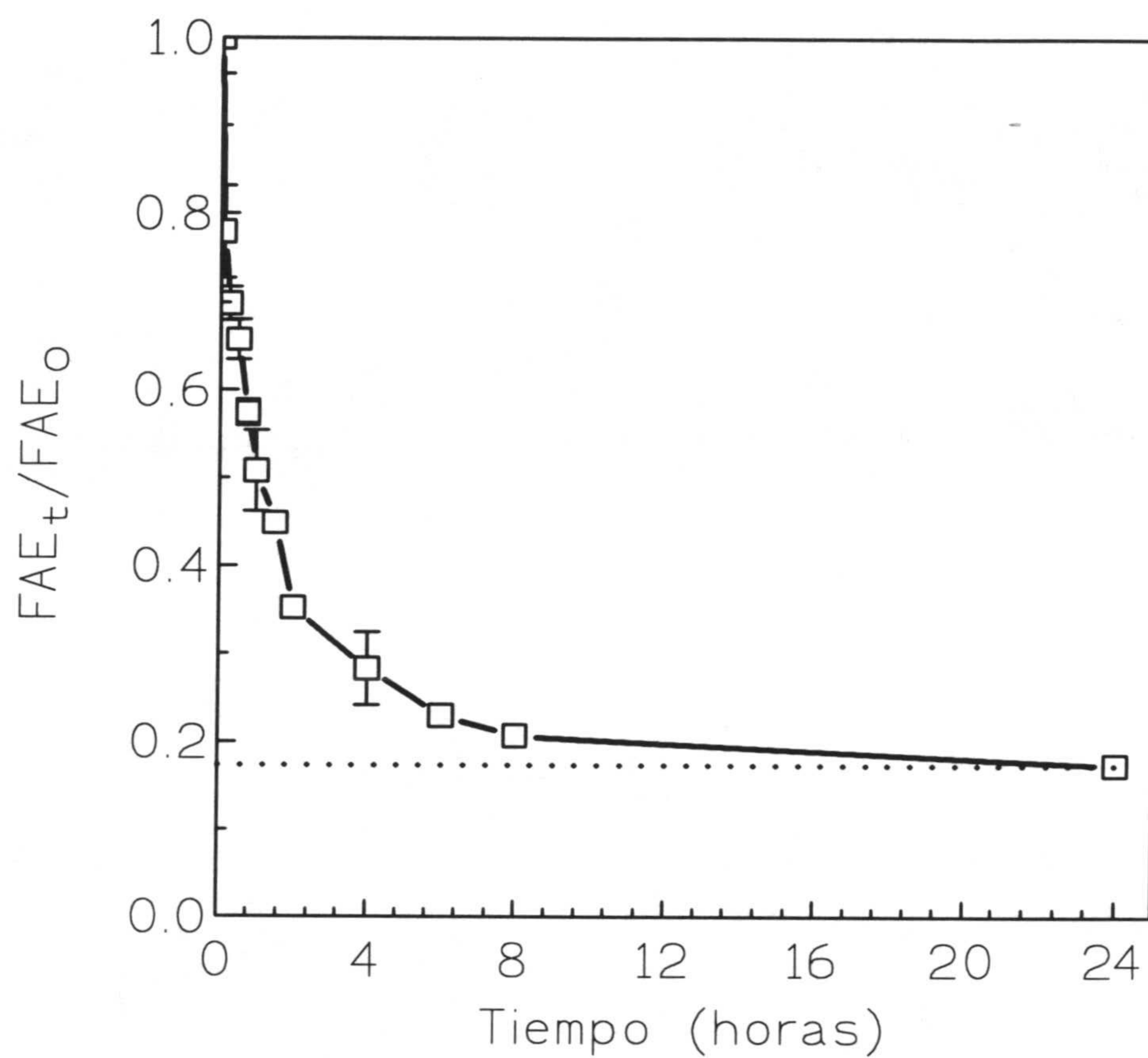


Figura 3.29 Cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA en función del tiempo de incubación postirradiación. Línea celular MCF-7 BUS

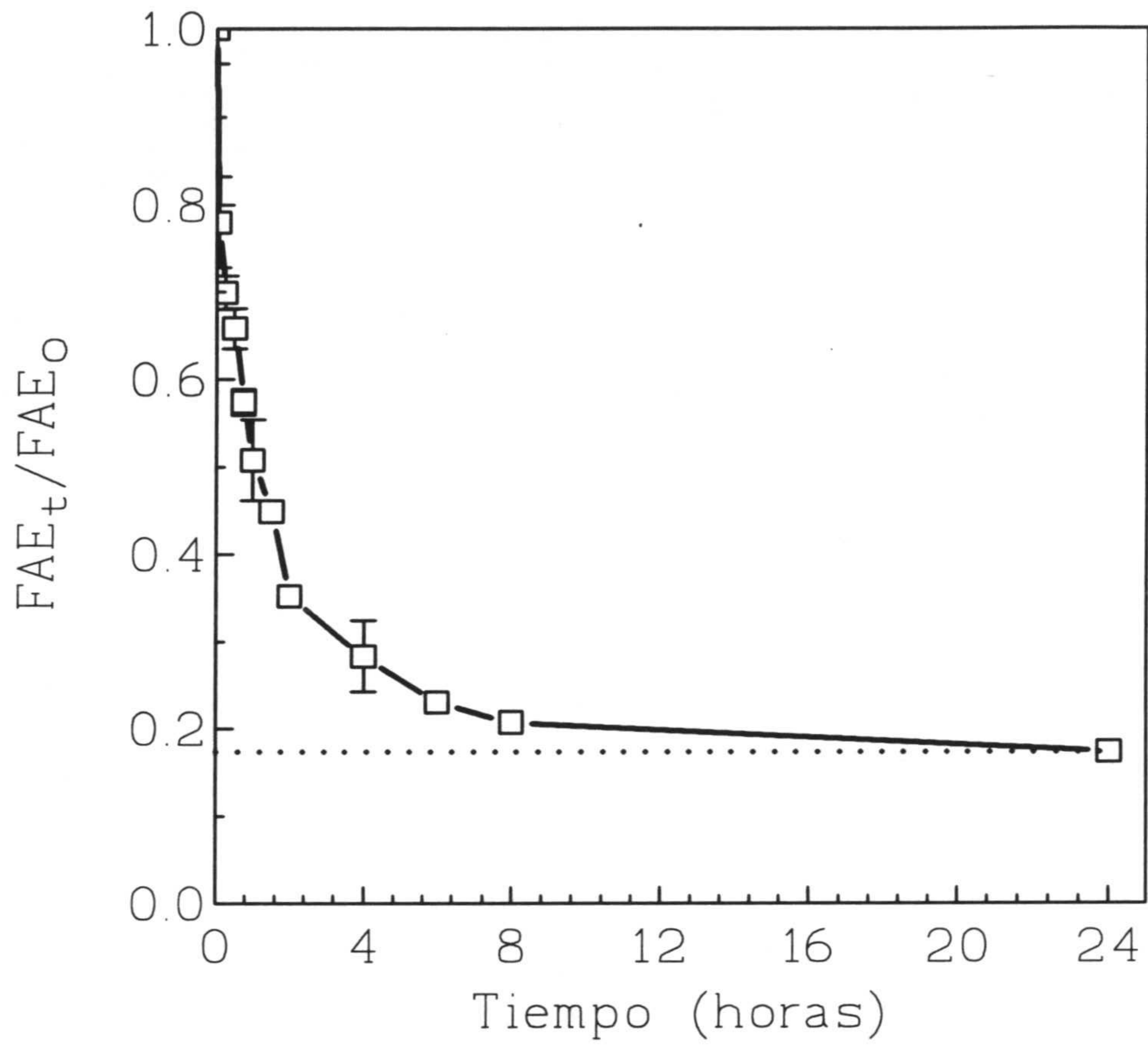


Figura 3.30 Cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA en función del tiempo de incubación postirradiación. Línea celular MCF-7 BB

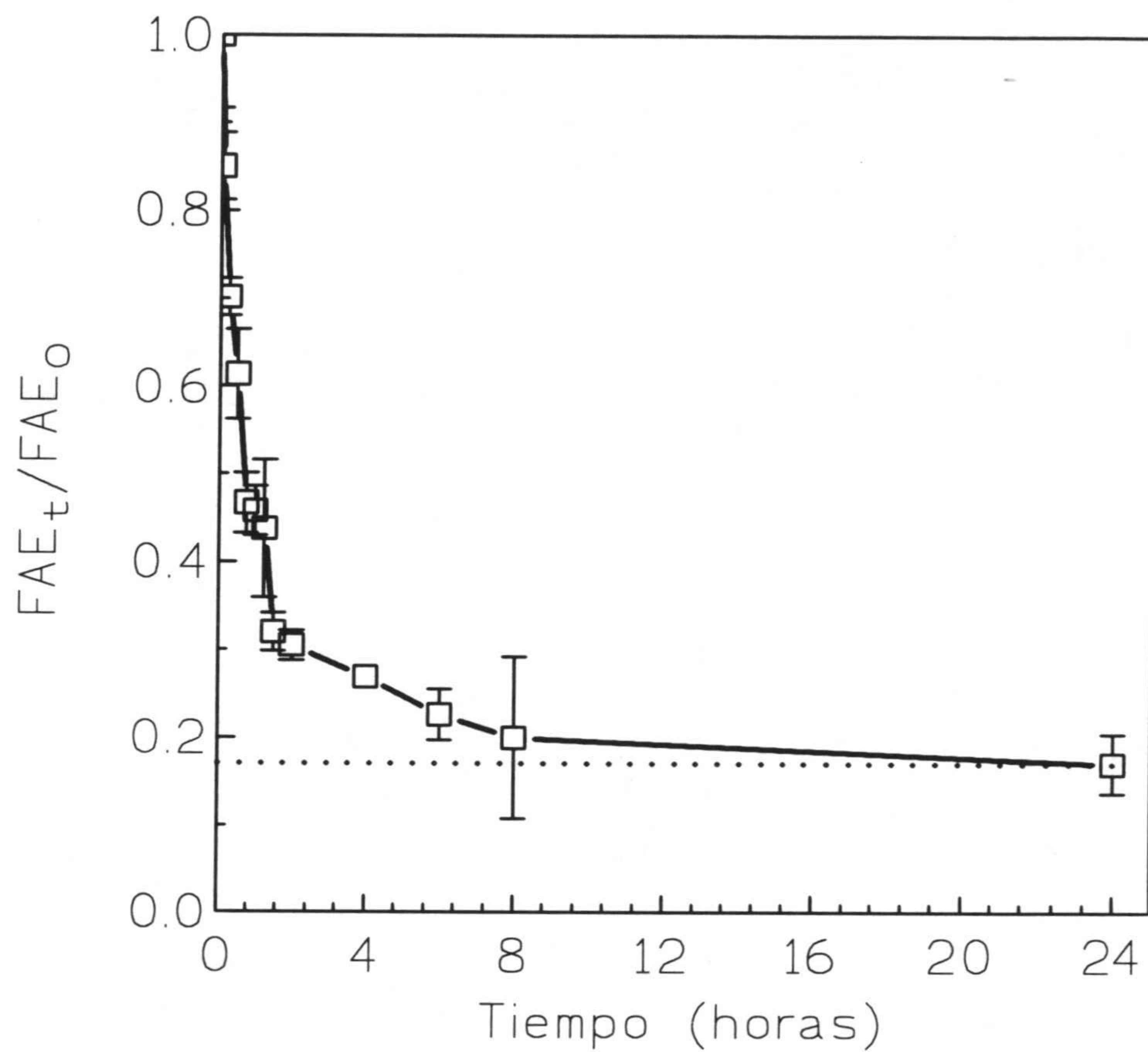


Figura 3.31 Cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA en función del tiempo de incubación postirradiación. Línea celular T47D-B1

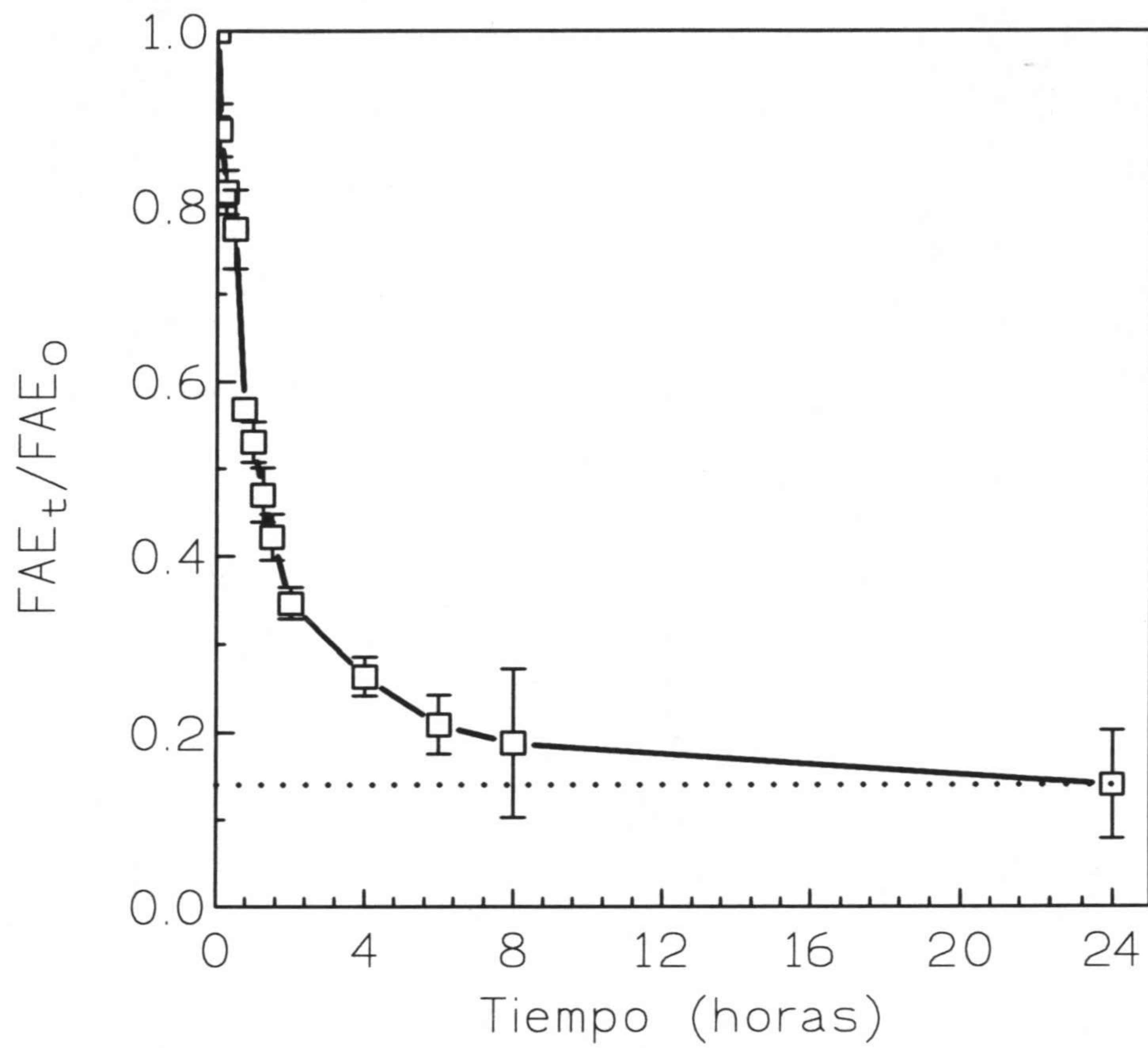


Figura 3.32 *Cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA en función del tiempo de incubación postirradiación. Línea celular T47D-B8*

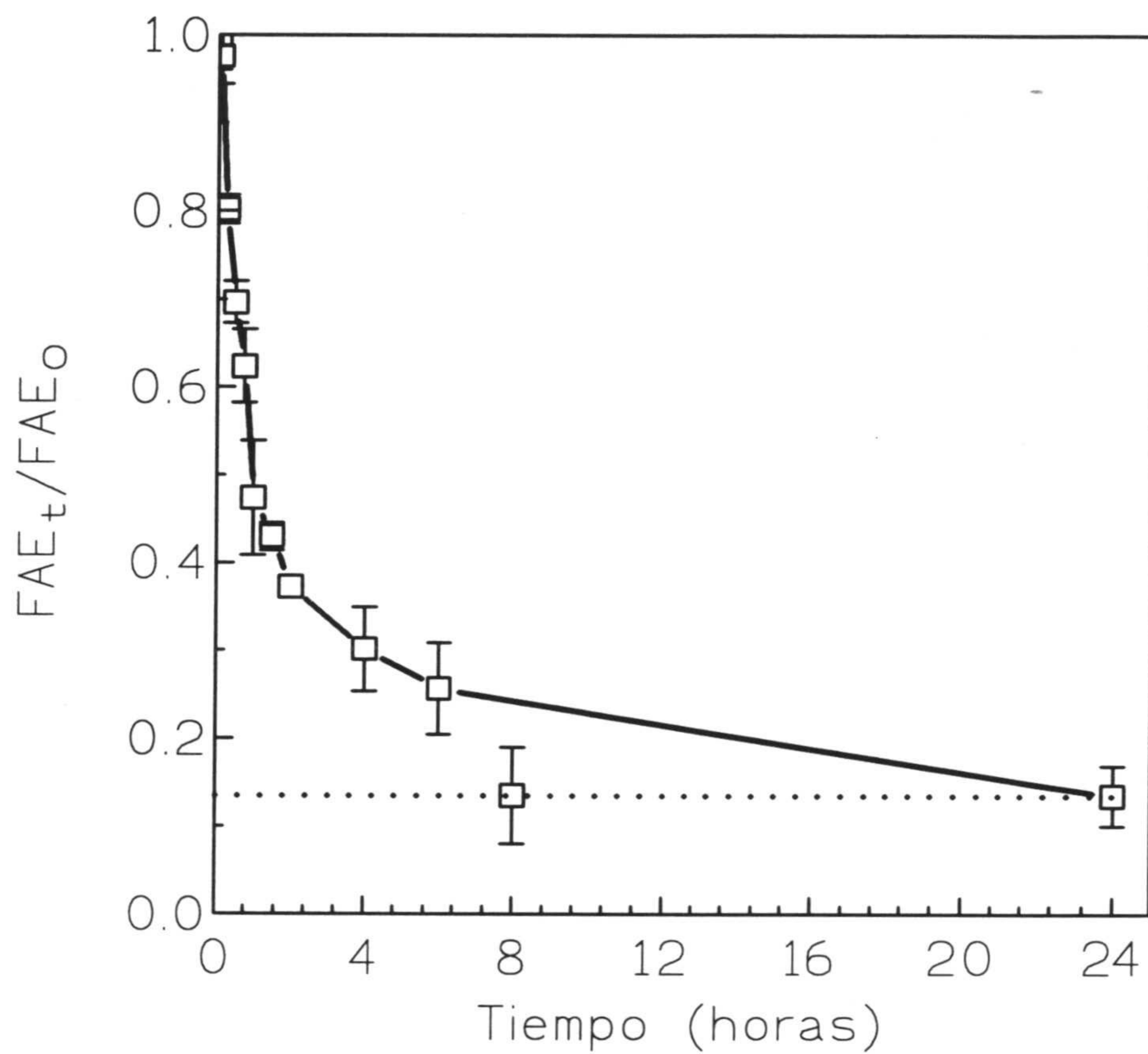


Figura 3.33 Cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA en función del tiempo de incubación postirradiación. Línea celular EVSA-T

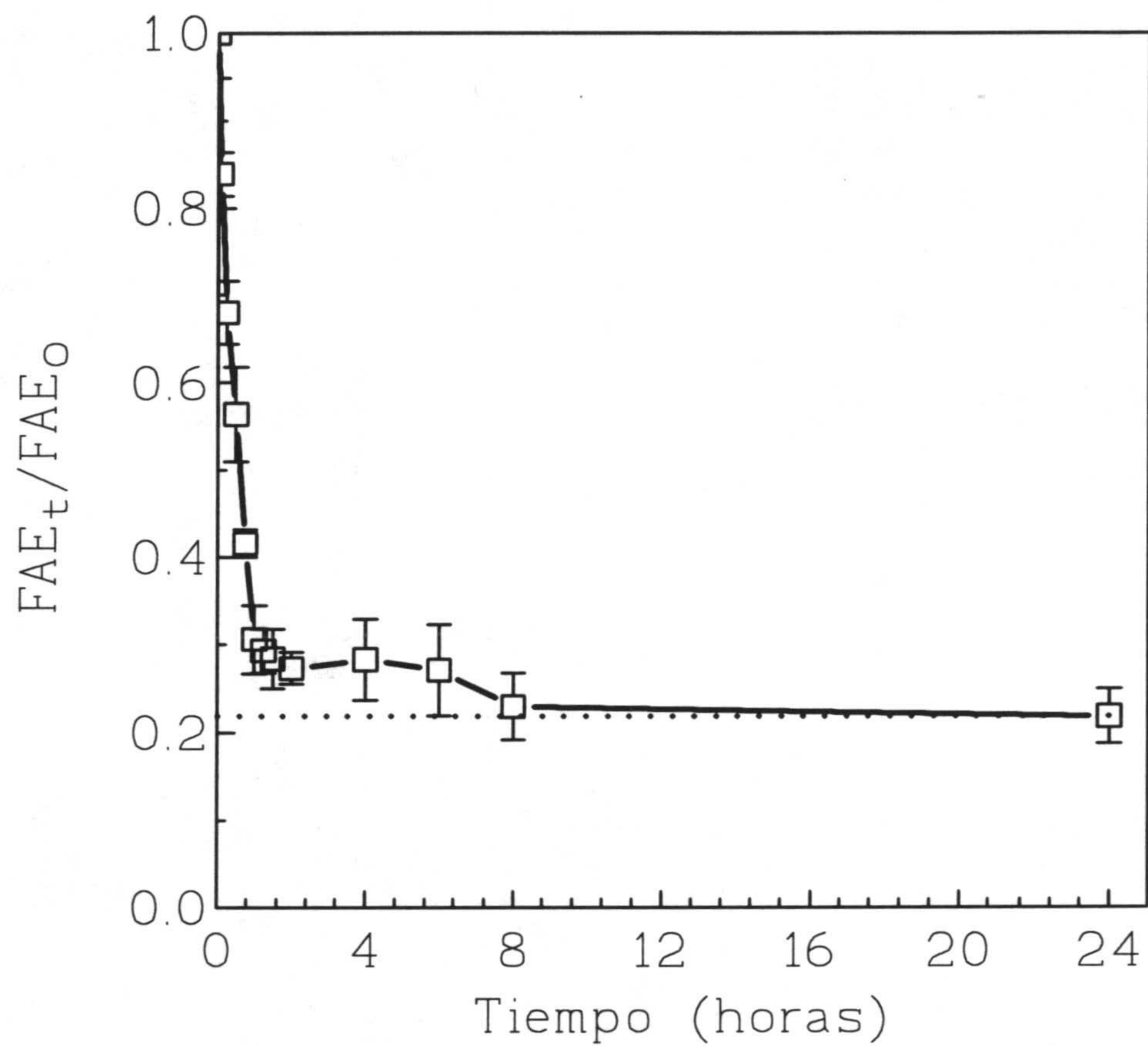


Figura 3.34 *Cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA en función del tiempo de incubación postirradiación. Línea celular RT-112*

TABLA 3.42

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular MCF-7 BUS

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Ln [FR]</i>
0	0
0.0833	-0.230
0.25	-0.393
0.5	-0.626
0.75	-0.746
1	-0.795
1.25	-0.901
1.5	-1.050
2	-1.440
4	-1.776
6	-1.999
8	-2.265

Ln [FR] = logaritmo natural de la fracción de reagrupamiento de RDC.

TABLA 3.43

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea celular MCF-7 BB

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Ln [FR]</i>
0	0
0.0833	-0.278
0.25	-0.452
0.5	-0.535
0.75	-0.724
1	-0.906
1.5	-1.099
2	-1.532
4	-2.015
6	-2.678
8	-3.209

Ln [FR] = logaritmo natural de la fracción de reagrupamiento de RDC.

TABLA 3.44

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular T47D-B1

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Ln [FR]</i>
0	0
0.0833	-0.199
0.25	-0.446
0.5	-0.626
0.75	-1.028
1	-1.058
1.25	-1.133
1.5	-1.711
2	-1.815
4	-2.136
6	-2.715
8	-3.330

Ln [FR] = logaritmo natural de la fracción de reagrupamiento de RDC.

TABLA 3.45

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular T47D-B8

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Ln [FR]</i>
0	0
0.0833	0.141
0.25	-0.241
0.5	-0.304
0.75	-0.695
1	-0.789
1.25	-0.957
1.5	-1.115
2	-1.427
4	-1.938
6	-2.526
8	-2.882

Ln [FR] = logaritmo natural de la fracción de reagrupamiento de RDC.

TABLA 3.46

CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular EVSA-T

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Ln [FR]</i>
0	0
0.0833	-0.028
0.25	-0.259
0.5	-0.430
0.75	-0.571
1	-0.936
1.5	-1.075
2	-1.291
4	-1.651
6	-1.961

Ln [FR] = logaritmo natural de la fracción de reagrupamiento de RDC.

TABLA 3.47

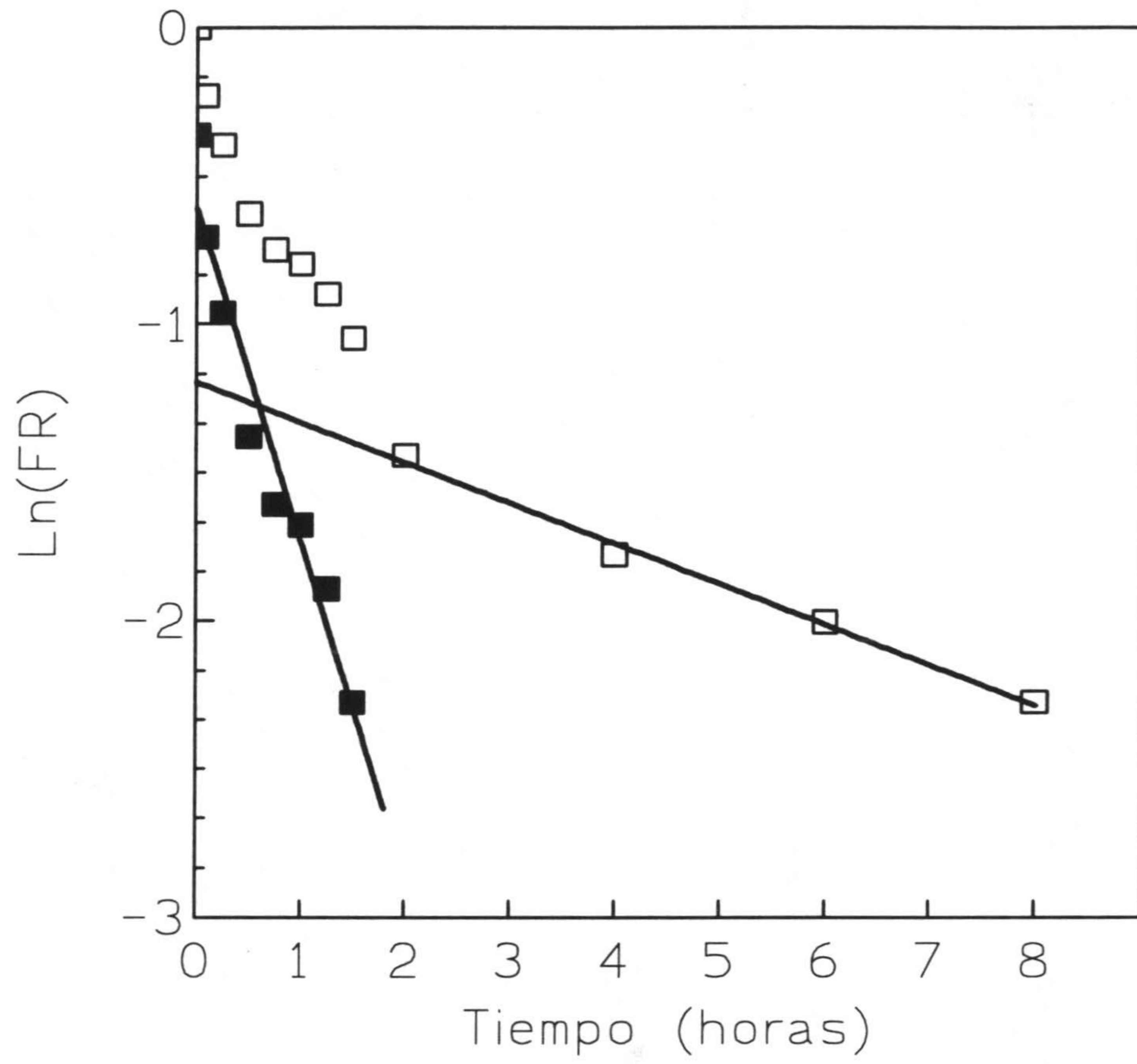
CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

Línea Celular RT-112

<i>Tiempo (h)</i>	<i>Ln [FR]</i>
0	0
0.0833	-0.231
0.25	-0.527
0.5	-0.818
0.75	-1.378
1	-2.191
1.25	-2.358
1.5	-2.488
2	-2.677

Ln [FR] = logaritmo natural de la fracción de reagrupamiento de RDC.

Los valores de los logaritmos neperianos de la fracción de reagrupamiento se han representado gráficamente (figuras 3.35 a 3.40) y es inmediata la observación de que el proceso no se ajusta a una función monoexponencial simple. De acuerdo con los supuestos teóricos de Frankenberg-Schwager (Frankenberg-Schwager, 1992), el proceso de reagrupamiento de RDC puede ser considerado como la resultante de la combinación de dos procesos que se desarrollan ligados de manera monoexponencial al tiempo (cinética de primer orden). Las figuras 3.35 a 3.40 incluyen las representaciones gráficas de ambas funciones monoexponenciales. Los parámetros obtenidos del ajuste de los puntos experimentales al modelo matemático desarrollado en el apartado 2.3:8, utilizando el procedimiento de mínimos cuadrados se ofrecen en las tablas 3.48 y 3.49.



*Figura 3.35 Velocidad del proceso de reagrupamiento de cadenas de DNA.
Modelo de Frankenberg-Schwager. Línea celular MCF-7 BUS*

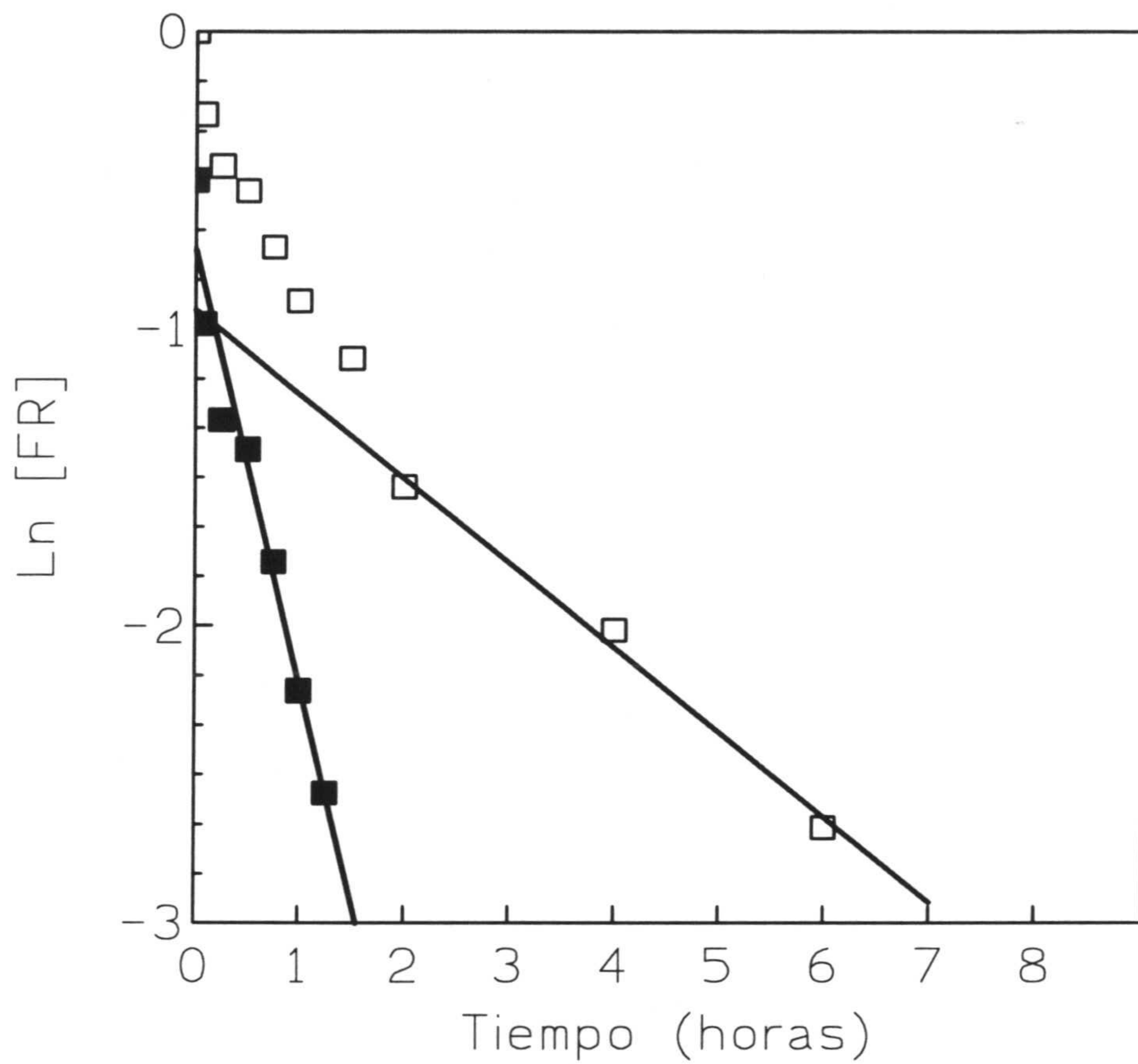


Figura 3.36 Velocidad del proceso de reagrupamiento de cadenas de DNA.
 Modelo de Frankenberg-Schwager. Línea celular MCF-7 BB

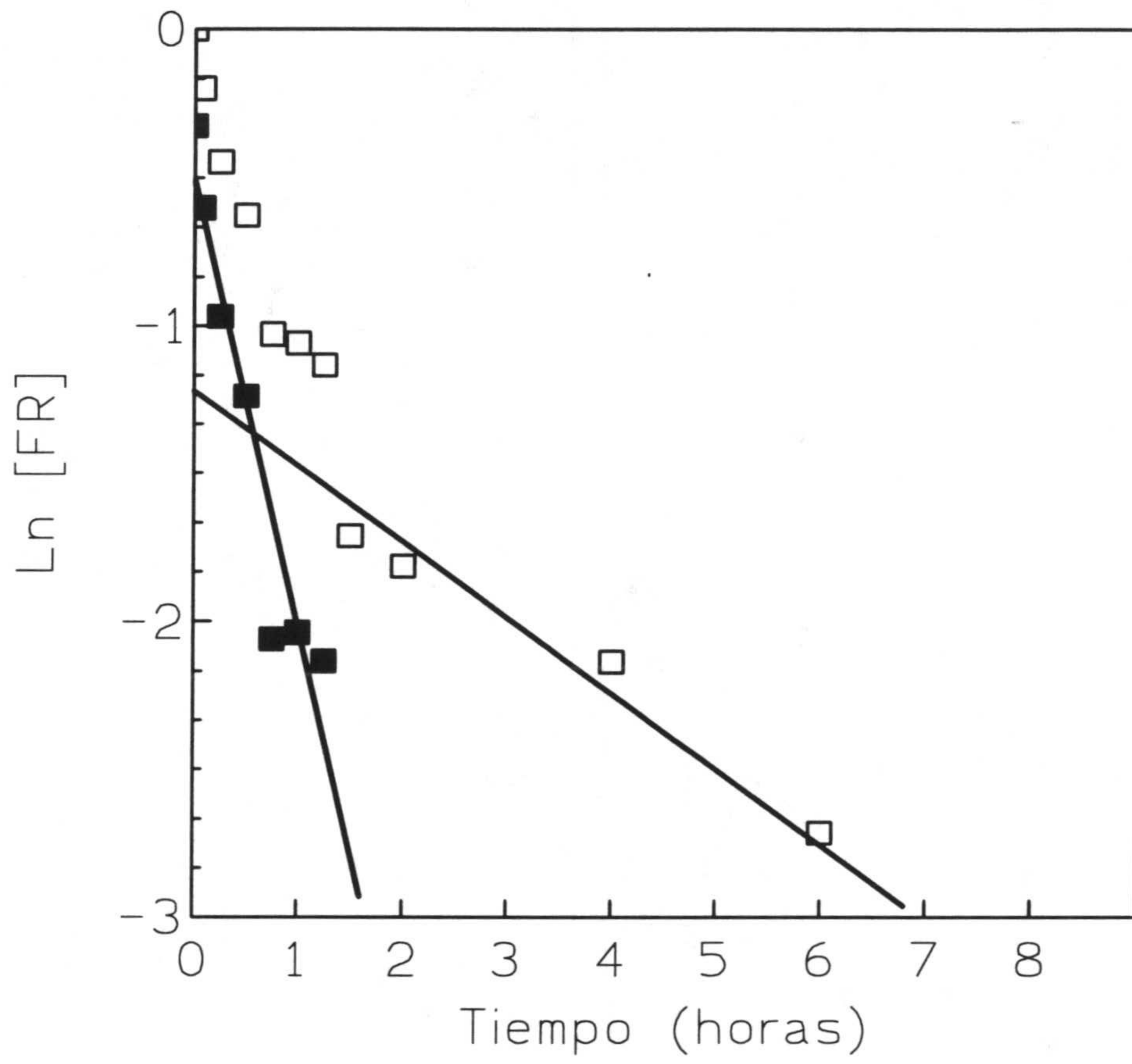
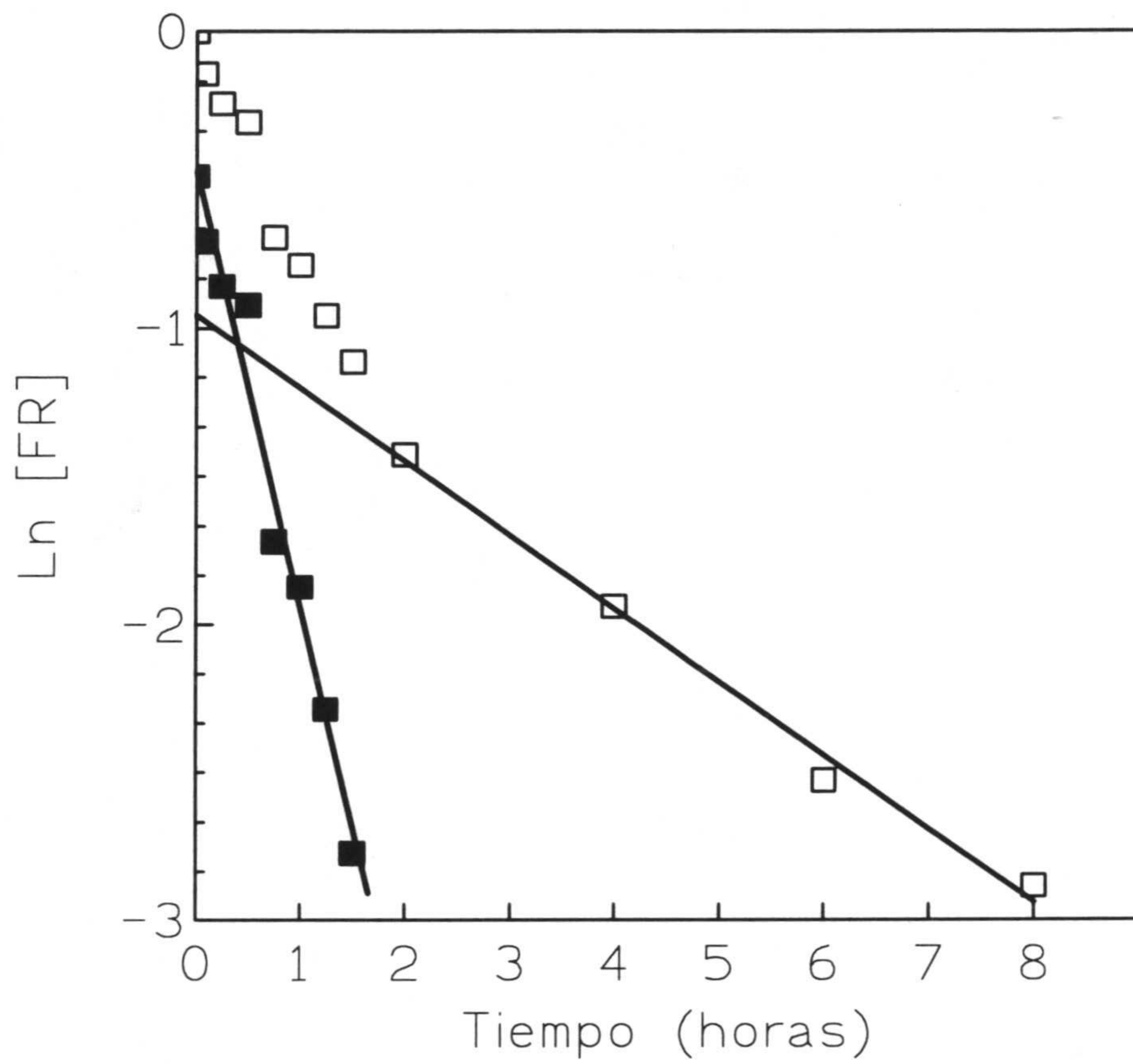


Figura 3.37 Velocidad del proceso de reagrupamiento de cadenas de DNA.
 Modelo de Frankenberg-Schwager. Línea celular T47D-B1



*Figura 3.38 Velocidad del proceso de reagrupamiento de cadenas de DNA.
Modelo de Frankenberg-Schwager. Línea celular T47D-B8*

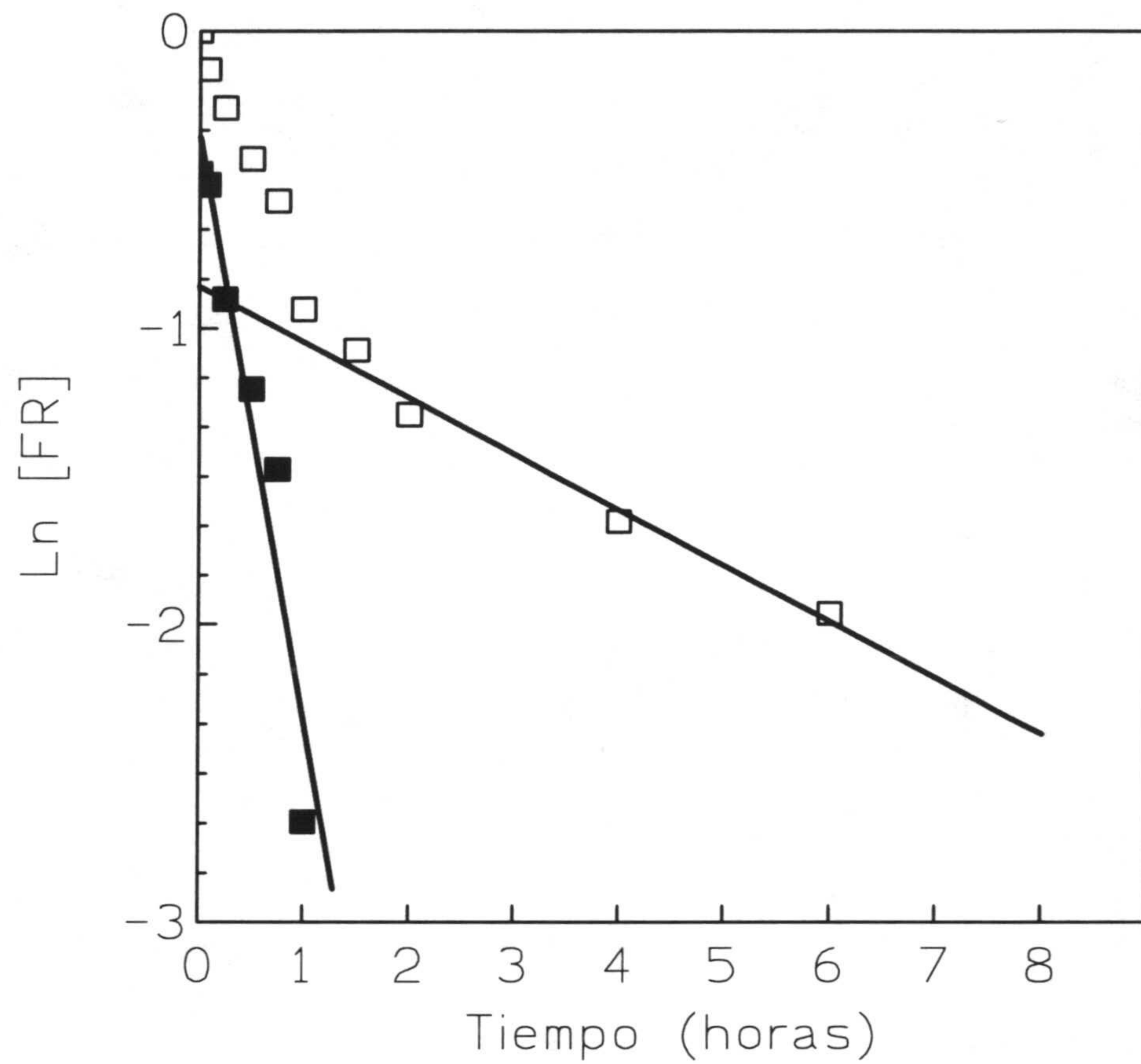


Figura 3.39 Velocidad del proceso de reagrupamiento de cadenas de DNA.
 Modelo de Frankenberg-Schwager. Línea celular EVSA-T

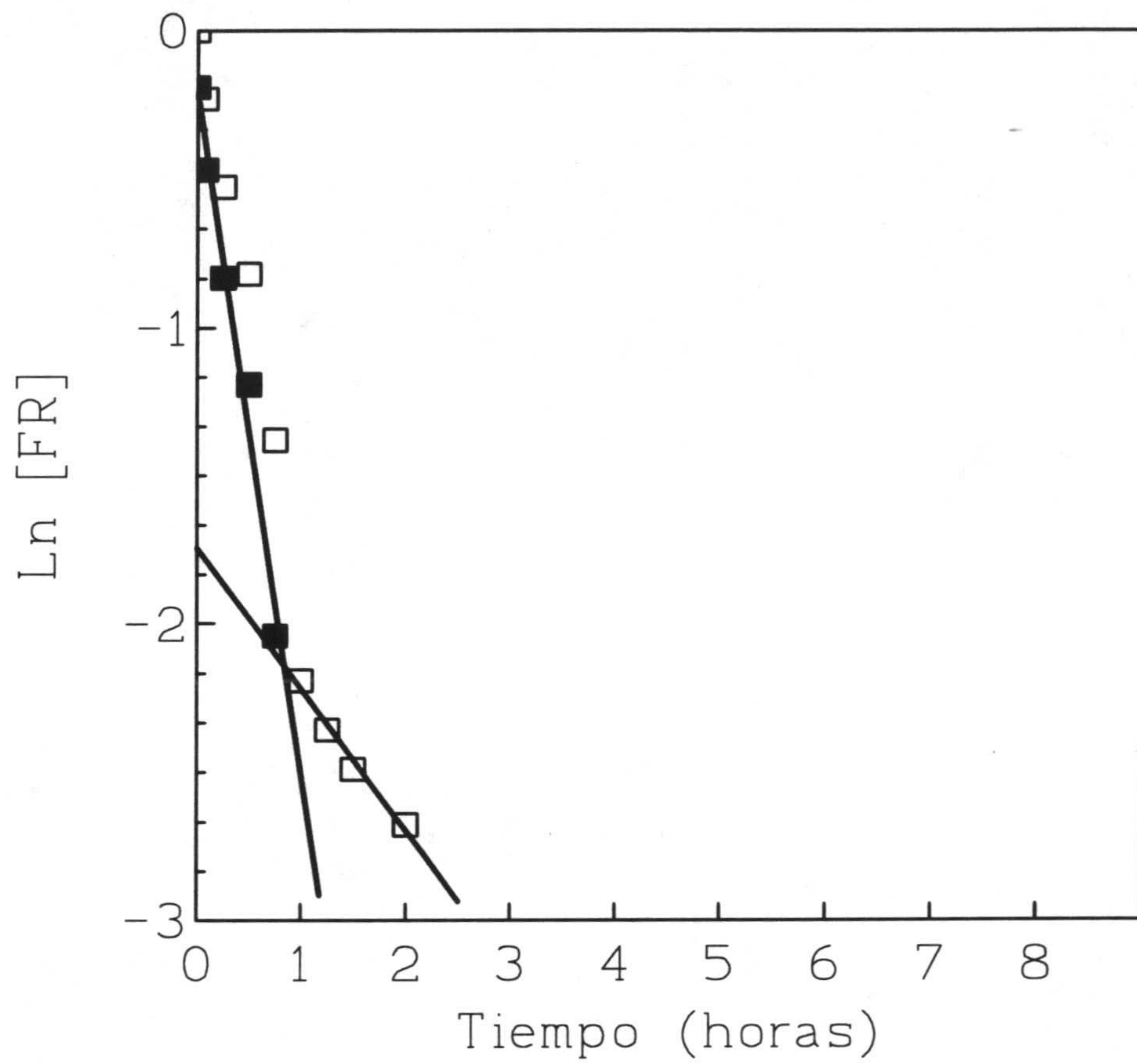


Figura 3.40 Velocidad del proceso de reagrupamiento de cadenas de DNA.
 Modelo de Frankenberg-Schwager. Línea celular RT-112

TABLA 3.48

PARAMETROS DE CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

(Componente Rápido)

<i>Línea Celular</i>	f_1	k_1	$t_{1/2}$
<i>MCF-7 BUS</i>	0.70	-1.13 ± 0.11	36.9 ± 3.2
<i>MCF-7 BB</i>	0.61	-1.28 ± 0.14	32.6 ± 3.3
<i>T47D-B1</i>	0.72	-1.51 ± 0.21	27.5 ± 3.3
<i>T47D-B8</i>	0.62	-1.48 ± 0.10	28.1 ± 1.7
<i>EVSA-T</i>	0.62	-1.87 ± 0.18	22.3 ± 2.0
<i>RT-112</i>	0.83	-2.31 ± 0.20	18.0 ± 1.4

f_1 = Fracción de RDC iniciales producidas sobre el DNA
velozmente reagrupadas (componente rápido del proceso cinético).

k_1 = Constante de velocidad de reagrupamiento.

$t_{1/2}$ = tiempo medio de reagrupamiento.

TABLA 3.49

PARAMETROS DE CINETICA DE REAGRUPAMIENTO DE RDC

(Componente Lento)

<i>Línea Celular</i>	f_2	k_2	$t_{1/2}$
<i>MCF-7 BUS</i>	0.30	-0.13 ± 0.01	5.1 ± 0.2
<i>MCF-7 BB</i>	0.39	-0.28 ± 0.01	2.4 ± 0.1
<i>T47D-B1</i>	0.28	-0.25 ± 0.02	2.8 ± 0.1
<i>T47D-B8</i>	0.38	-0.25 ± 0.02	2.8 ± 0.1
<i>EVSA-T</i>	0.38	-0.17 ± 0.01	4.1 ± 0.1
<i>RT-112</i>	0.17	-0.47 ± 0.05	1.5 ± 0.2

f_2 = Fracción de RDC iniciales producidas sobre el DNA tardíamente reagrupadas (componente lento del proceso cinético).

k_2 = Constante de velocidad de reagrupamiento.

$t_{1/2}$ = tiempo medio de reagrupamiento.

3.5.1 Relaciones entre parámetros celulares de radiosensibilidad y parámetros de cinética de reagrupamiento de RDC.

Para investigar si entre los parámetros celulares de radiosensibilidad y los parámetros de reagrupamiento de cadenas de DNA rotas por la radiación existen relaciones de asociación, hemos realizado un estudio de correlación entre éstos y aquellos parámetros. Los resultados numéricos del referido estudio, que figuran en las tablas 3.50 y 3.51, se muestran gráficamente en las figuras 3.41 a 3.44.

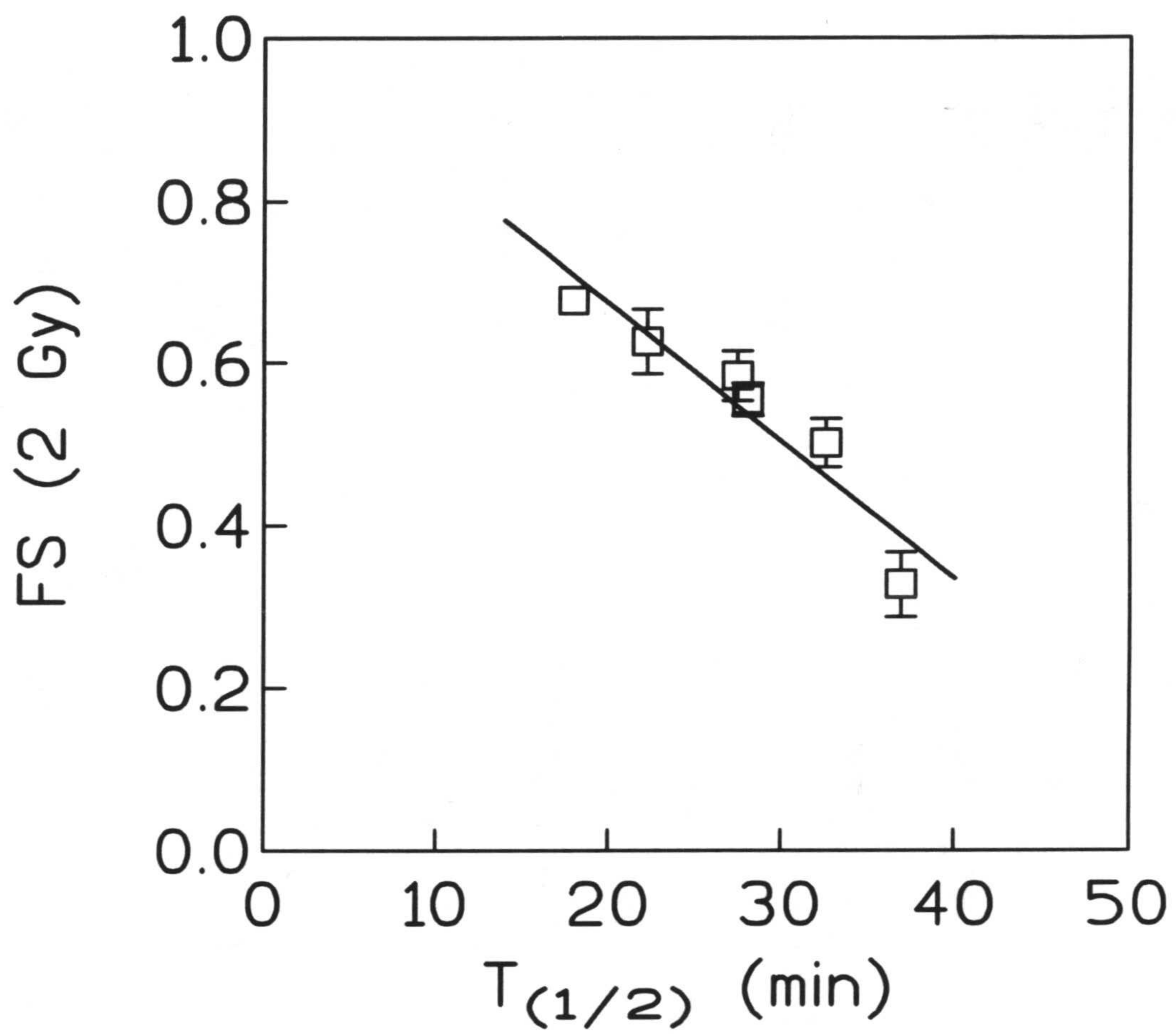


Figura 3.41 Relación entre la fracción de supervivencia a 2 Gy y el componente rápido de la cinética de reagrupamiento de RDC.

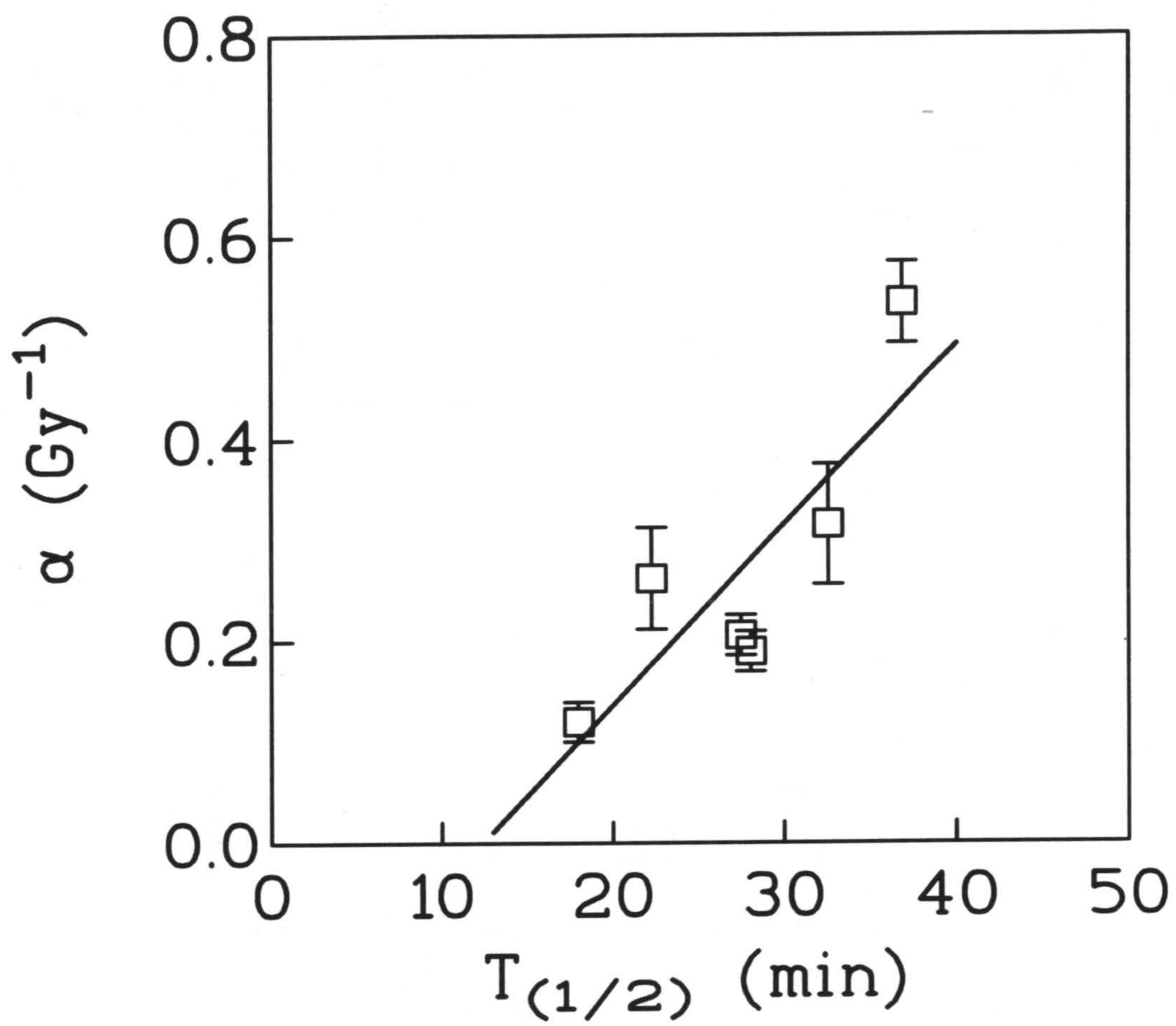


Figura 3.42 Relación entre el coeficiente α y el componente rápido de la cinética de reagrupamiento de RDC.

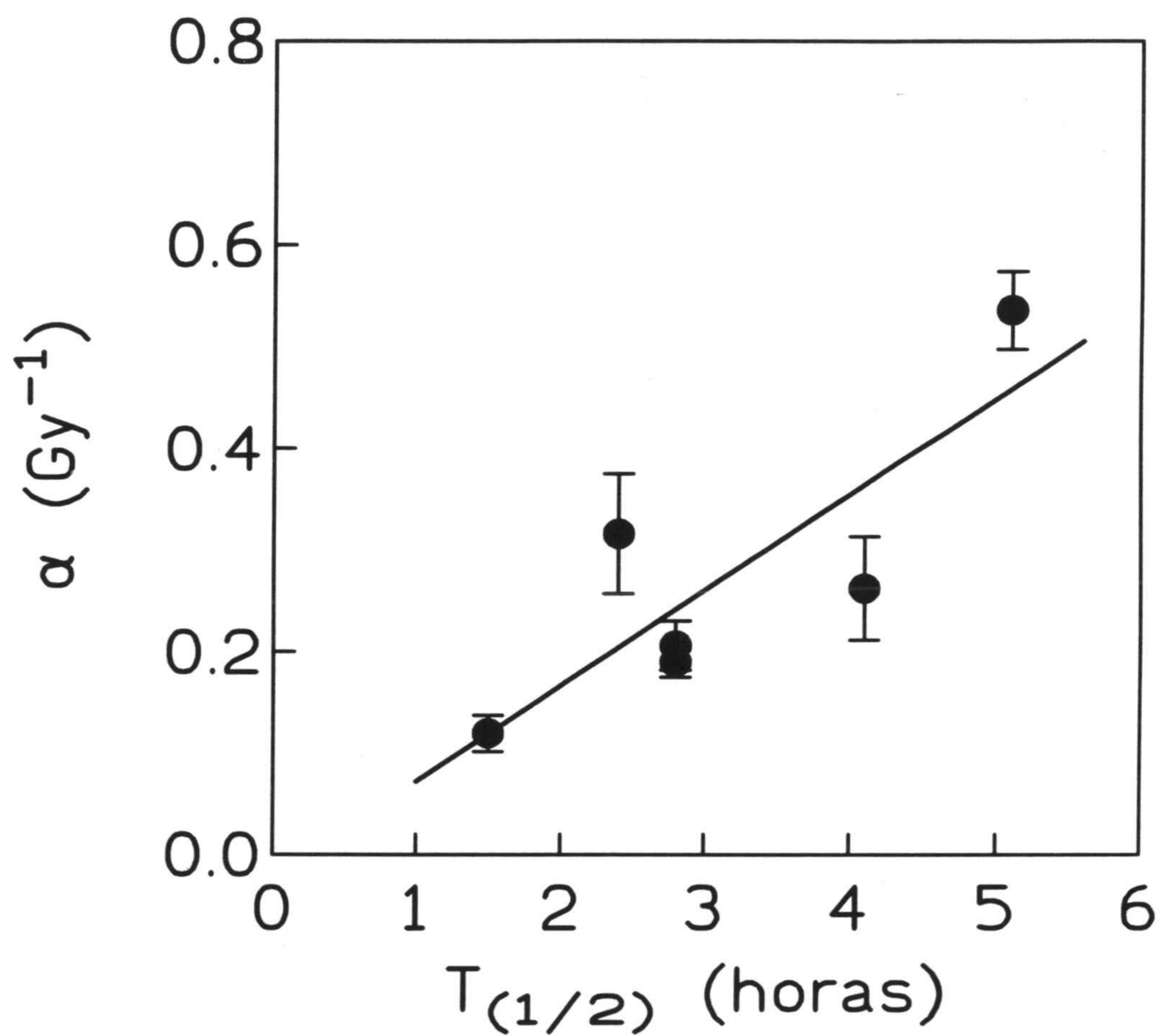


Figura 3.43 Relación entre el coeficiente α y el componente lento de la cinética de reagrupamiento de RDC.

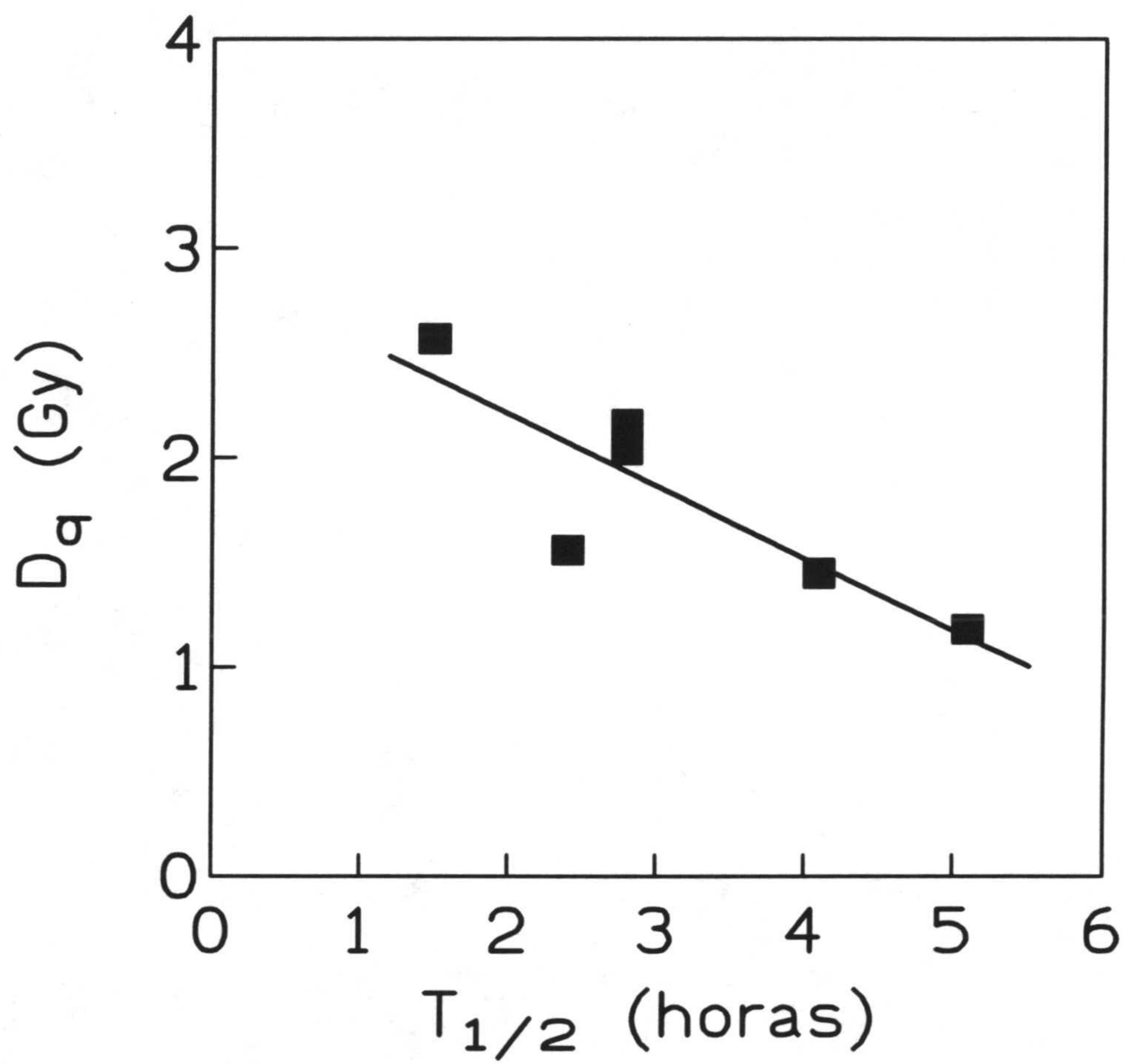


Figura 3.44 Relación entre dosis quasi-umbral y el componente lento de la cinética de reagrupamiento de RDC.

TABLA 3.50

**RELACIONES ENTRE PARAMETROS CELULARES
Y DE REAGRUPAMIENTO DE RDC (COMPONENTE RAPIDO)**

	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
$t_{1/2}/FS2$	-0.017 ± 0.003	1.1 ± 0.1	-0.944	0.005
$t_{1/2}/\alpha$	0.018 ± 0.006	-0.2 ± 0.2	0.838	0.037
$t_{1/2}/\beta$	---	---	-0.378	0.460
$t_{1/2}/D_0$	---	---	-0.381	0.456
$t_{1/2}/D_q$	---	---	-0.700	0.122
$t_{1/2}/n$	---	---	-0.515	0.295

P: pendiente de la relación

I: intersección de la recta para $X = 0$ (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido

TABLA 3.51

**RELACIONES ENTRE PARAMETROS CELULARES
Y DE REAGRUPAMIENTO DE RDC (COMPONENTE LENTO)**

	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
$t_{1/2}/FS2$	---	---	-0.701	0.121
$t_{1/2}/\alpha$	0.09 ± 0.03	0.02 ± 0.11	0.830	0.041
$t_{1/2}/\beta$	---	---	-0.705	0.118
$t_{1/2}/D_0$	---	---	-0.106	0.842
$t_{1/2}/D_q$	-0.34 ± 0.10	2.90 ± 0.35	-0.854	0.030
$t_{1/2}/n$	---	---	-0.708	0.116

P: pendiente de la relación

I: intersección de la recta para $X = 0$ (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido

3.5.2 Relación entre distintos parámetros moleculares de radiosensibilidad

Finalmente, hemos sometido a comparación estadística los parámetros moleculares derivados del estudio de estimación cuantitativa del daño inicial radioinducido (RDC) con los obtenidos a partir del estudio de la cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA. Dichas relaciones estadísticas figuran en la tabla 3.52. Este análisis nos ha permitido demostrar la existencia de una estrecha correlación entre el nivel de daño molecular inicialmente inducido por la radiación y el tiempo de semirreagrupamiento calculado para el componente rápido del proceso cinético (figura 3.45).

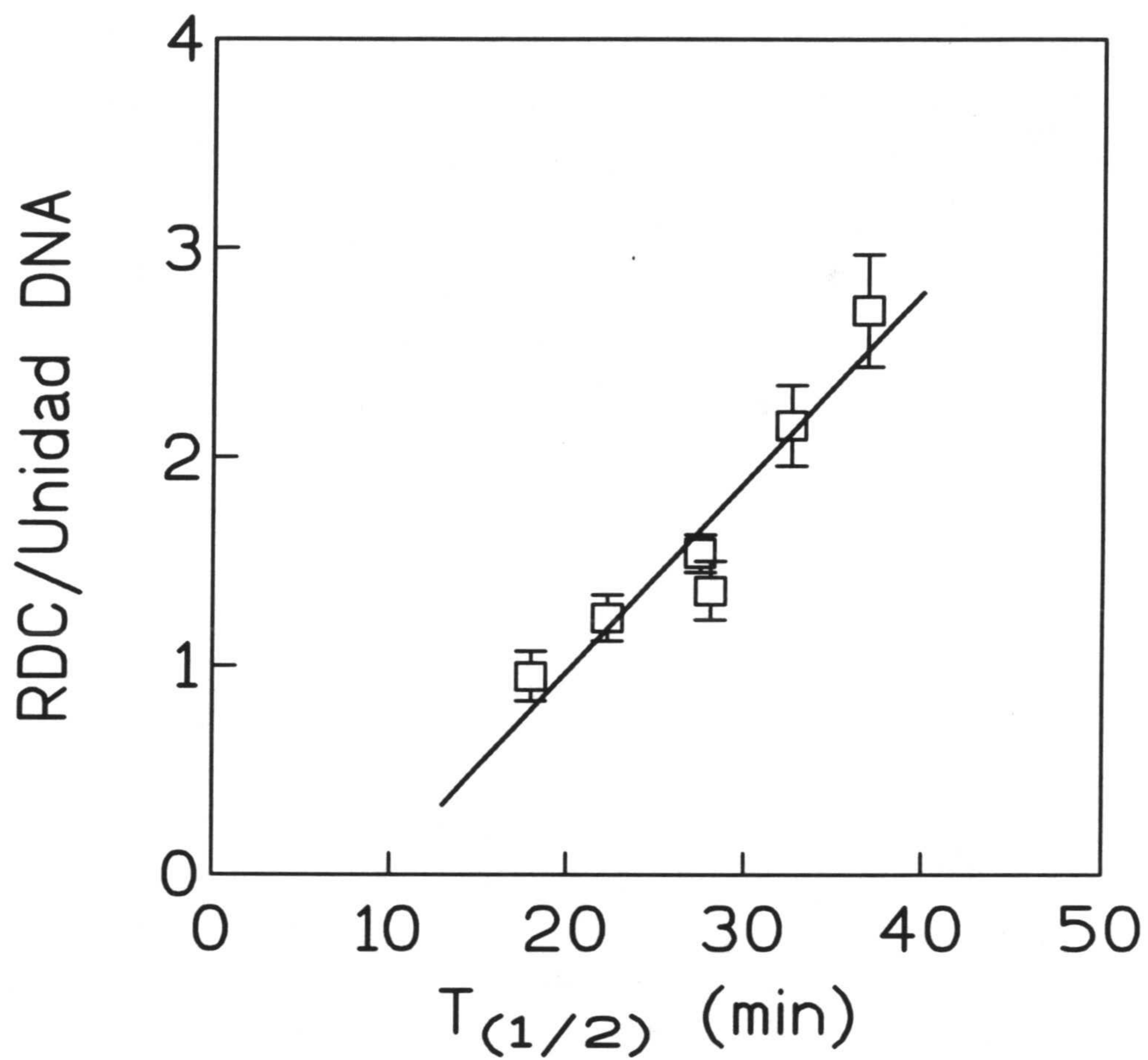


Figura 3.45 Relación entre el n^o de rupturas dobles de cadena por unidad de DNA y el componente rápido de la cinética de reagrupamiento de este proceso.

TABLA 3.52

RELACIONES ENTRE PARAMETROS MOLECULARES DE RADIOSENSIBILIDAD

	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
$t_{1/2}(r)/RDC$	0.091	-0.085 ± 0.41	0.952	0.004
$t_{1/2}(l)/RDC$	---	---	0.695	0.125

P: pendiente de la relación

I: intersección de la recta para $X = 0$ (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido

3.6. DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO

Para evaluar el daño molecular que continúa siendo detectable tras permitir, durante un periodo de tiempo suficiente, el desarrollo de los procesos de reparación, hemos realizado dos tipos de experimentos diferentes:

a) Cuantificación del número de cadenas de DNA rotas por la radiación que permanecen sin reagrupar tras 24 horas de incubación postirradiación (dosis única de 45 Gy, alta tasa de dosis (9.5 Gy/min), temperatura de irradiación 0 °C, temperatura de reparación 37 °C).

b) Irradiación a baja tasa de dosis (2 Cgy/min) (temperatura de irradiación 37 °C, dosis total comprendida entre 0 y 120 Gy y tiempo adicional permitido para la reparación de 4 horas a 37 °C) (apartado 2.10).

Los resultados obtenidos en ambos tipos de experimentos se muestran, utilizando como variable la fracción de actividad extraída del pozo, FAE, en las tablas 3.53 a 3.57.

TABLA 3.53

DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO

(Alta Tasa de Dosis)

<i>Línea Celular</i>	<i>FAE</i>	<i>ESM</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	<i>5.7</i>	<i>0.8</i>
<i>MCF-7 BB</i>	<i>7.3</i>	<i>1.4</i>
<i>T47D-B1</i>	<i>10.5</i>	<i>2.1</i>
<i>T47D-B8</i>	<i>8.1</i>	<i>4.6</i>
<i>EVSA-T</i>	<i>7.2</i>	<i>3.3</i>
<i>RT-112</i>	<i>10.2</i>	<i>3.0</i>

FAE = valor medio de la fracción de actividad extraída del pozo.

ESM = error estándar del valor medio.

TABLA 3.54

DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO

(Baja Tasa de Dosis)

Línea Celular: MCF-7 BUS

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FAR</i>	<i>ESM</i>
<i>0</i>	<i>1.00</i>	<i>0.01</i>
<i>12.5</i>	<i>0.97</i>	<i>0.03</i>
<i>16</i>	<i>0.97</i>	<i>0.03</i>
<i>20.5</i>	<i>0.99</i>	<i>0.03</i>
<i>25</i>	<i>0.95</i>	<i>0.04</i>
<i>30</i>	<i>0.97</i>	<i>0.04</i>
<i>45</i>	<i>0.98</i>	<i>0.02</i>
<i>52</i>	<i>0.97</i>	<i>0.03</i>
<i>57</i>	<i>0.95</i>	<i>0.03</i>
<i>61</i>	<i>0.97</i>	<i>0.02</i>
<i>90</i>	<i>0.88</i>	<i>0.01</i>
<i>120</i>	<i>0.85</i>	<i>0.02</i>

FAR = valor medio de la fracción de actividad retenida en el pozo.

ESM = error del valor medio.

TABLA 3.55

DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO

(Baja Tasa de Dosis)

Línea Celular: MCF-7 BB

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FAR</i>	<i>ESM</i>
0	1.00	0.03
12.5	0.98	0.04
16	0.94	0.04
20.5	1.00	0.03
25	0.97	0.04
30	0.99	0.03
45	0.96	0.04
52	0.95	0.05
57	0.96	0.03
61	0.94	0.03
90	0.95	0.02
120	0.95	0.02

FAR = valor medio de la fracción de actividad retenida en el pozo.

ESM = error del valor medio

TABLA 3.56

DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO

(Baja Tasa Dosis)

Línea celular: T47D-B1

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FAR</i>	<i>ESM</i>
<i>0</i>	<i>1.00</i>	<i>0.02</i>
<i>13</i>	<i>0.99</i>	<i>0.01</i>
<i>22</i>	<i>0.96</i>	<i>0.01</i>
<i>30</i>	<i>1.01</i>	<i>0.01</i>
<i>44</i>	<i>1.03</i>	<i>0.02</i>
<i>55</i>	<i>0.99</i>	<i>0.02</i>
<i>62</i>	<i>1.07</i>	<i>0.01</i>
<i>90</i>	<i>1.01</i>	<i>0.01</i>
<i>120</i>	<i>0.99</i>	<i>0.02</i>

FAR = valor medio de la fracción de actividad retenida en el pozo.

ESM = error del valor medio

TABLA 3.57

DAÑO RESIDUAL RADIOINDUCIDO

(Baja Tasa de Dosis)

Línea Celular: T47D-B8

<i>Dosis (Gy)</i>	<i>FAR</i>	<i>ESM</i>
<i>0</i>	<i>1.00</i>	<i>0.02</i>
<i>13</i>	<i>0.98</i>	<i>0.01</i>
<i>25</i>	<i>0.98</i>	<i>0.01</i>
<i>30</i>	<i>0.93</i>	<i>0.04</i>
<i>45</i>	<i>0.99</i>	<i>0.02</i>
<i>52</i>	<i>1.00</i>	<i>0.02</i>
<i>57</i>	<i>0.93</i>	<i>0.01</i>
<i>61</i>	<i>1.00</i>	<i>0.01</i>
<i>90</i>	<i>0.98</i>	<i>0.02</i>
<i>120</i>	<i>0.95</i>	<i>0.01</i>

FAR = valor medio de la fracción de actividad retenida en el pozo.

ESM = error del valor medio

Los datos de FAR en función de la dosis de radiación administrada, se han ajustado utilizando el procedimiento de ajuste por mínimos cuadrados a una función lineal (Ruiz de Almodóvar, 1994). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.58

TABLA 3.58

DAÑO RESIDUAL EN FUNCION DE LA DOSIS

(Baja Tasa de Dosis)

<i>Línea celular</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	<i>-1.17E-3</i>	<i>1.01</i>	<i>0.892</i>	<i><0.0001</i>
<i>MCF-7 BB</i>	<i>-3.94E-4</i>	<i>0.98</i>	<i>-0.590</i>	<i>0.0397</i>
<i>T47D-B1</i>	<i>---</i>	<i>--</i>	<i>0.209</i>	<i>0.589</i>
<i>T47D-B8</i>	<i>---</i>	<i>--</i>	<i>-0.257</i>	<i>0.473</i>

P: pendiente de la relación

I: intersección de la recta para X = 0 (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

p: significación estadística del coeficiente de correlación obtenido.

3.6.1 Relaciones entre parámetros celulares de radiosensibilidad y daño molecular residual.

Para conocer si la estimación del daño molecular residual, o irreparable, correlaciona con algunos de los parámetros derivados del ensayo clonogénico como test de radiosensibilidad celular, hemos procedido, como en anteriores ocasiones, a realizar un estudio de correlación entre unos y otros parámetros.

Los resultados del referido estudio se ofrecen en la tabla 3.59 y han sido representados gráficamente en las figuras 3.46 a 3.49.

TABLA 3.59

**RELACION ENTRE PARAMETROS CELULARES Y MOLECULARES
DE RADIOSENSIBILIDAD**

(Daño Residual)

	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>DR/FS2</i>	0.05 ± 0.02	0.14 ± 0.2	0.750	0.086
<i>DR/α</i>	-0.06 ± 0.02	0.81 ± 0.2	-0.839	0.037
<i>DR/β</i>	4.3E-3	-6.18E-3	0.766	0.075
<i>DR/D₀</i>	---	---	-0.144	0.786
<i>DR/D_q</i>	0.24 ± 0.07	-0.14 ± 0.6	0.866	0.025
<i>DR/n</i>	---	---	0.736	0.095
<i>DR/t_(1/2)^r</i>	---	---	-0.661	0.153
<i>DR/t_(1/2)^l</i>	---	---	-0.800	0.056
<i>DR/RDC</i>	---	---	-0.743	0.091

P: pendiente de la relación

I: intersección de la recta para X = 0 (intersección en el origen)

r: coeficiente de correlación lineal

*p: significación estadística del coeficiente de correlación
obtenido*

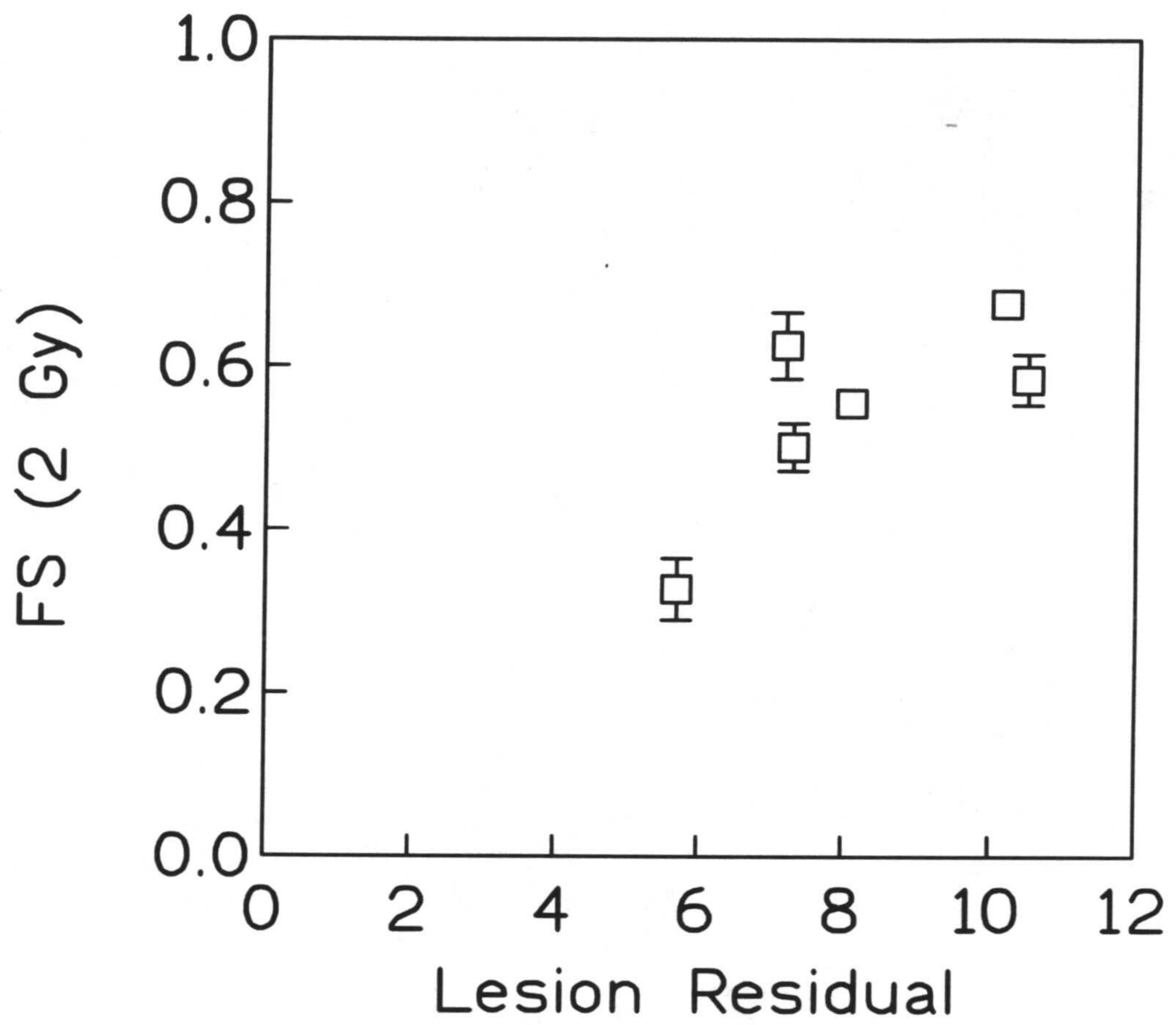
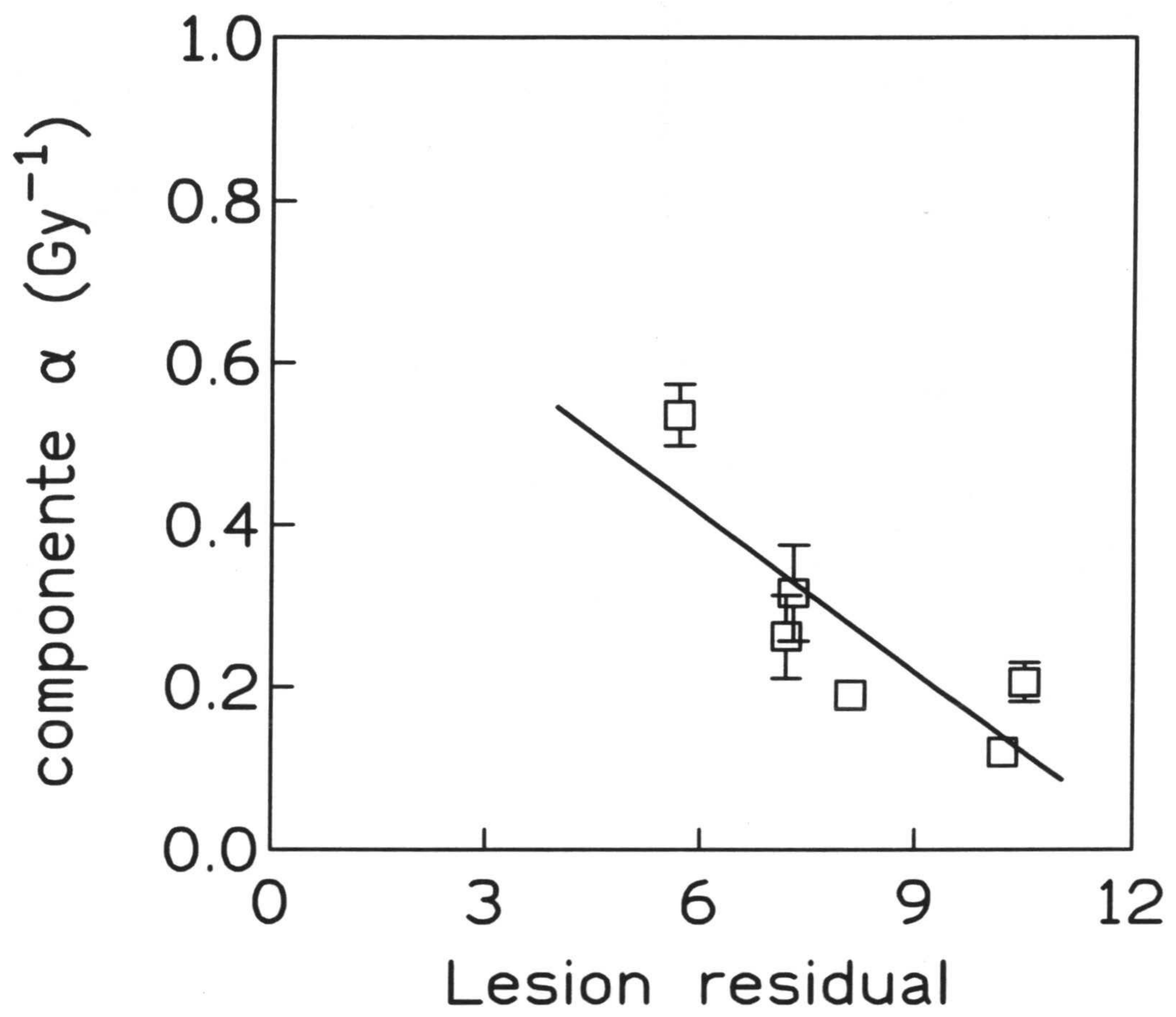


Figura 3.46 Relación entre daño residual (DR) y fracción de supervivencia a 2 Gy (FS2)



3.47 *Relación entre daño residual (DR) y coeficiente α de la curva de supervivencia celular*

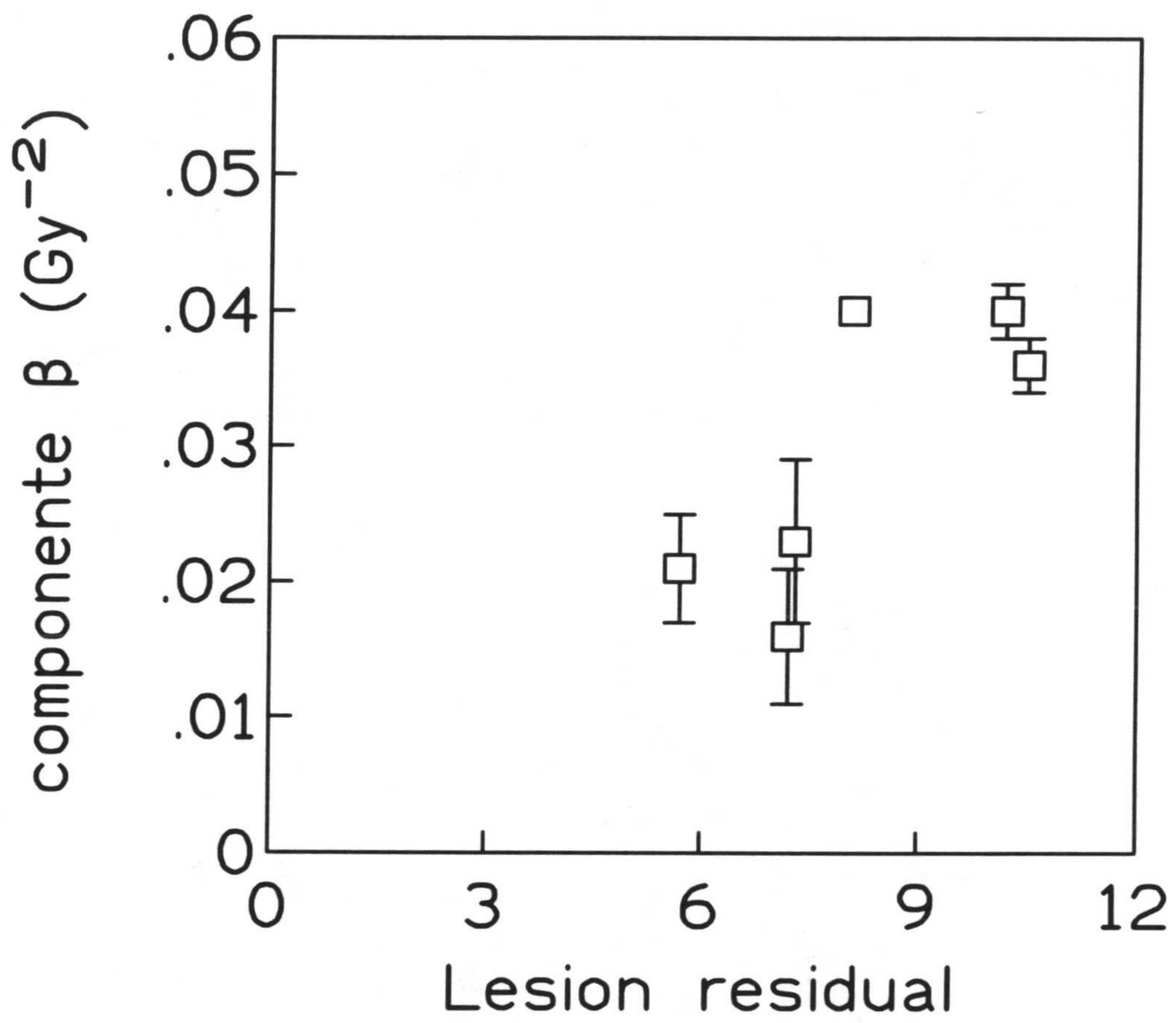


Figura 3.48 Relación entre daño residual (DR) y el coeficiente β de la curva de supervivencia celular

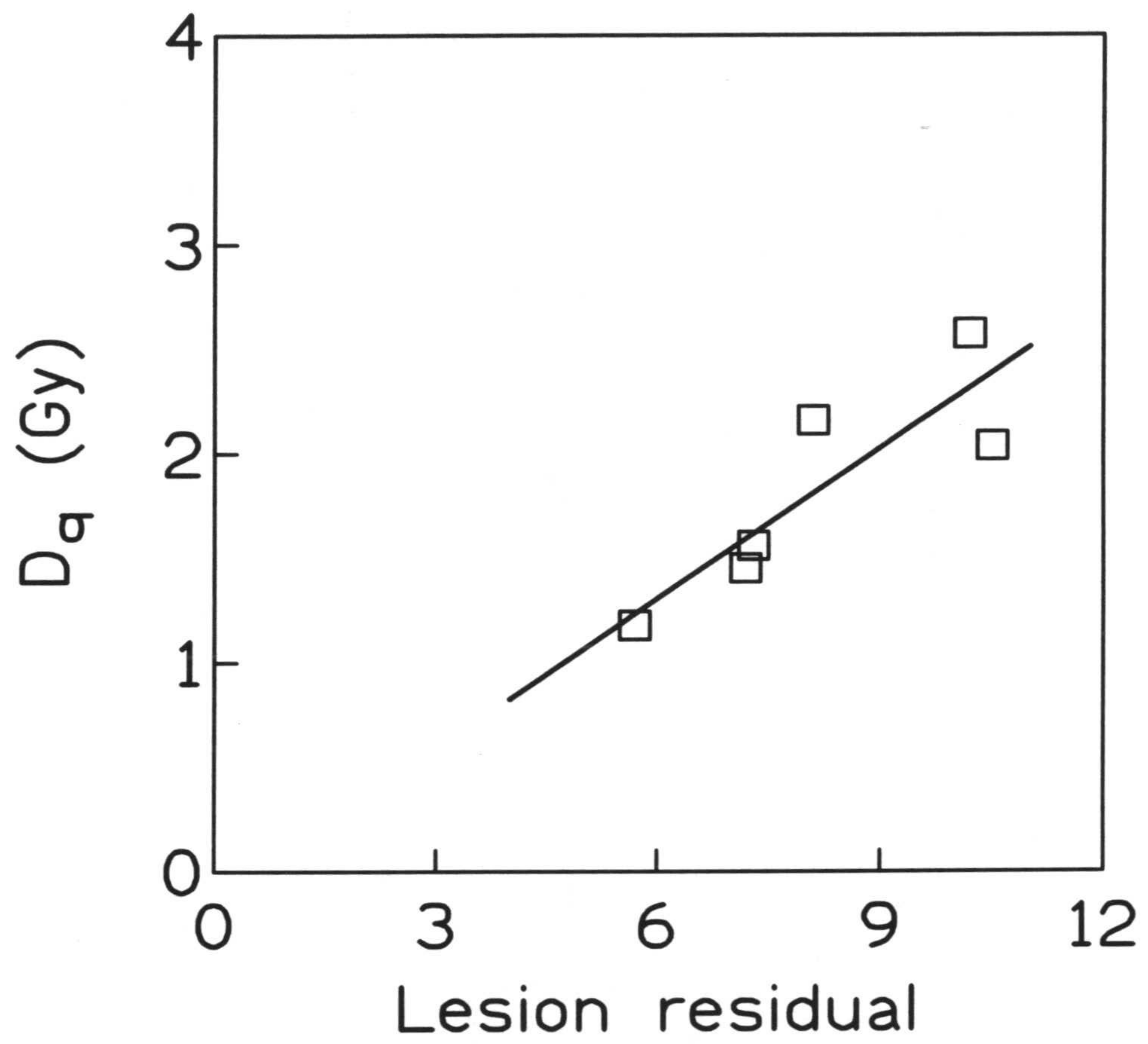


Figura 3.49 Relación entre daño residual (DR) y dosis quasi umbral (D_q)

3.7. DISTRIBUCION DE LOS ELEMENTOS CELULARES EN LAS DISTINTAS FASES DEL CICLO MITOTICO

Los resultados derivados del estudio de distribución de los elementos celulares a lo largo del ciclo celular, se muestran en la tabla 3.60.

TABLA 3.60

DISTRIBUCION EN FASES DEL CICLO CELULAR

<i>Línea Celular</i>	<i>G1</i>	<i>S</i>	<i>G2/M</i>
<i>MCF-7 BUS</i>	69.0 ± 2.6	19.2 ± 2.1	11.9 ± 1.4
<i>MCF-7 BB</i>	66.2 ± 3.4	22.3 ± 1.8	11.5 ± 1.6
<i>T47D-B1</i>	80.7 ± 1.3	14.0 ± 2.2	6.4 ± 0.6
<i>T47D-B8</i>	71.1 ± 2.3	16.0 ± 0.9	12.9 ± 1.7
<i>EVSA-T</i>	45.2 ± 2.1	38.9 ± 1.6	15.5 ± 1.8
<i>RT-112</i>	49.9 ± 1.0	33.4 ± 2.2	16.7 ± 1.7

G1 = fase presintética

S = fase de síntesis de DNA

G2 = fase premitótica

M = fase de mitosis

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.- DISCUSION

4.1. CARACTERIZACION DE LAS LINEAS CELULARES UTILIZADAS

Los estudios sobre cinética de crecimiento celular, en condiciones de cultivo estándar, han sido realizados utilizando como punto final la determinación del número de células en cultivo, en función del tiempo, mediante el test de SRB (sulfo-rodamina B).

El ensayo SRB fue inicialmente descrito por Skehan y col (Skehan, 1990), analizado extensamente por Rubinstein y col (Rubinstein, 1990) y, en la actualidad, se considera como el ensayo tipo para estudiar la actividad cito-reductora de fármacos antineoplásicos en ensayos predictivos de quimiosensibilidad.

En condiciones de pH ácido, la SRB se une a los aminoácidos básicos de las proteínas de las células fijadas con ácido tri-cloro acético, proporcionando un índice que resulta proporcional al contenido proteico de las células estudiadas. Esta proporcionalidad se rige, según el trabajo de Skehan y nuestros propios resultados, para valores del número de células comprendidos dentro del intervalo $10^3 - 3 \cdot 10^5$.

Como paso previo a los estudios de cinética de crecimiento celular, tuvimos que demostrar que entre el número de células puestas en los discos de cultivo y la intensidad de coloración obtenida existía una relación lineal. Los resultados correspondientes a la investigación de linealidad se han recogido en el apartado 3.1.1 (Tabla 3.7) y son claramente demostrativos de este hecho. En efecto, los coeficientes de correlación encontrados, superiores en todos los casos a 0.991, permiten calcular un valor para p, significación estadística del coeficiente de correlación frente a cero, que es siempre menor que 0.001.

Por otra parte, las diferentes líneas celulares han ofrecido una respuesta característica, que ha podido ser evaluada en términos de la pendiente de la relación lineal obtenida, parámetro que refleja la variación de la densidad óptica (DO) por célula. Los valores de pendiente obtenidos oscilan entre $1.15 \cdot 10^6$ y $2.02 \cdot 10^6$ unidades de DO por célula. Tomando en consideración estos valores y las correspondientes desviaciones estándar estimadas, es fácil demostrar (datos no incluidos) que existen diferencias significativas entre las distintas relaciones de linealidad. La conclusión es obvia: cada línea celular necesita, por tanto, su propia recta de calibración.

Probablemente, la existencia de diferencias cuantitativas en el contenido proteico por célula o diferencias cualitativas relativas a la composición en aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares, expliquen los distintos tipos de respuesta observados para las distintas líneas celulares utilizadas en nuestro trabajo. Este es un hecho que han descrito también por otros investigadores (Skehan, 1990) y que puede fácilmente resolverse utilizando rectas de calibración propias para cada tipo celular.

La máxima sensibilidad del ensayo colorimétrico se obtiene cuando la lectura de densidad óptica se realiza a 564 nm. Sin embargo, como la linealidad de la lectura densitométrica es correcta para un intervalo reducido de valores de DO (0 - 1.8 unidades de DO), es necesario realizar, a veces, la cuantificación del número de células utilizando longitudes de onda distintas. En general, valores de longitud de onda comprendidos entre 490 nm y 530 nm son útiles para la mayor parte de las líneas celulares ensayadas. Esta modificación de la longitud de onda de lectura permite ampliar el intervalo entre los valores mínimo y máximo del número de células a cuantificar. En nuestro trabajo, hemos utilizado sistemáticamente 492 nm como valor de la longitud de onda. En el trabajo original de Skehan se demostró que el ensayo de SRB permitía cuantificar, con errores aceptables, densidades celulares superiores a 2.500 células por pozo. Otros ensayos, por el contrario, han mostrado límites inferiores de resolución comprendidos entre 5.000 y 10.000 elementos celulares por

pozo (Flores, 1978; Bradford, 1976; Scudiero, 1988; Alley, 1988).

El parámetro que mejor define el crecimiento celular es el tiempo de duplicación de las células (T_D), que debe ser calculado durante la fase exponencial de crecimiento. Los valores encontrados por nosotros (Tabla 3.8) oscilan entre 29.3 ± 2.8 y 43.4 ± 2.9 horas y coinciden con los descritos anteriormente para las líneas celulares ensayadas, bien por nosotros mismos, bien en otros laboratorios (Villalobos, 1987; Olea, 1987; Gorgojo, 1988; Soto, 1986; Steel, 1967).

No hemos podido demostrar la existencia de ningún tipo de relación entre tiempo de duplicación y distribución celular en las distintas fases del ciclo mitótico. Realmente, la inexistencia de dicha relación no debe resultar sorprendente puesto que el valor de T_D está fuertemente influenciado por la fracción de crecimiento de las células en cultivo (Mendelsohn, 1962) y por el factor de pérdida celular (Steel, 1967).

Los valores obtenidos para el tiempo de duplicación de las células en cultivo, la concentración intracelular de receptores de estrógenos y progesterona (Tabla 3.9), la respuesta proliferativa celular al estradiol (Tabla 3.10) así como los datos relativos a la distribución de los elementos celulares en el ciclo mitótico (Tabla 3.60), nos han permitido demostrar, por otra parte, que los clones de las líneas celulares MCF-7 (MCF-7 BUS y MCF-7 BB) y T47D (T47D-B1 y T47D-B8) poseen características proliferativas e indicadores de hormonodependencia diferentes. Por tanto, a efectos de investigación de radiosensibilidad, tanto a nivel celular como molecular, tales líneas pueden ser consideradas como modelos tumorales diferentes.

4.2. CURVAS DE SUPERVIVENCIA CELULAR

4.2.1 Parámetros de radiosensibilidad

Es opinión general hoy que, entre los parámetros experimentales de radiosensibilidad, el más importante desde el punto de vista clínico y el que ajusta con mayor claridad con la respuesta celular a la radiación es la denominada fracción de supervivencia a 2 Gy (Fertil, 1981; Deacon, 1984). Dicho parámetro ha sido considerado por nosotros como representativo de la Radiosensibilidad Celular Intrínseca. De acuerdo con este concepto, la respuesta a la radiación de las células utilizadas en este trabajo ha podido ser clasificada, en términos de mayor a menor radiosensibilidad, en la forma siguiente:

MCF-7 BUS > MCF-7 BB > T47D-B8 > T47D-B1 > EVSA-T > RT-112

Las diferencias encontradas entre el modelo tumoral más radiosensible (MCF-7 BUS, FS2 = 32.7%) y el más radiorresistente (RT-112, FS2 = 67.7%), son demostrativas de las diferencias de radiosensibilidad normalmente encontradas entre células procedentes de tumores humanos. Los diferentes clones de MCF-7 presentaron, también, claras diferencias en el valor correspondiente a FS2, mientras que los clones de T47D ensayados difirieron poco en su radiosensibilidad celular intrínseca. Variaciones de la radiosensibilidad celular, observadas tras clonar una línea celular determinada, han sido descritas con anterioridad (Hill, 1979; de Wingaert, 1981; Brouwner, 1983; Leith, 1982; Welch, 1983, Weichselbaum, 1988; McMillan, 1991; Yang, 1991).

Según Yang y col (Yang, 1991), la magnitud de las diferencias observadas en la radiosensibilidad de distintos clones celulares correlaciona con los cambios encontrados para el valor del coeficiente α del modelo lineal cuadrático. Esta hipótesis ha podido confirmarse analizando los resultados obtenidos en nuestro trabajo. En efecto, entre los coeficientes α encontrados para los clones BUS y BB de la línea celular MCF-7 (0.536 y 0.316) y los valores de supervivencia a 2 Gy encontrados para uno y otro clon hemos encontrado una

relación de correspondencia inversa. Por el contrario, entre los dos clones de la línea T47D ensayados no hemos encontrado diferencias significativas entre los valores de uno y otro parámetro.

El hallazgo "in vitro" de la existencia de diferencias claras en los parámetros de radiosensibilidad (FS_2 y α , esencialmente) entre distintos clones obtenidos a partir del mismo modelo tumoral, puede ser objeto de extrapolación a estudios "in vivo". Así, podría ser lógico pensar que si, al final de la irradiación de un paciente con cáncer, quedan células clonogénicas tumorales supervivientes, éstas deben pertenecer, probablemente, pertenecer a clones celulares radiorresistentes. De esta manera, la irradiación fraccionada de tumores heterogéneamente clonogénicos puede conducir a la aparición del fenotipo radiorresistente en el tumor recidivado. Este fenómeno ha sido sugerido para algunos tumores humanos (Weichselbaum, 1988), aunque existen escasas evidencias que permitan confirmar su virtualidad clínica. Es probable, por ello, que las diferencias en radiosensibilidad existentes para los distintos clones celulares de un mismo tumor no sean suficientes para inducir estados definidos de radiorresistencia en clínica humana. Yang y col. (1991) han publicado, en este sentido, los datos de FS_2 para los clones más sensible y más resistente encontrados tras clonar la línea celular de glioma humano IN859. El cociente entre los valores de FS_2 de uno y otro clon fué 1.73. Los resultados obtenidos por nosotros para los clones BB y BUS (cociente entre las fracciones de supervivencia a 2 Gy igual a 1.53) está dentro del orden de magnitud descrito para el citado cociente por tales autores.

Utilizando los datos experimentales obtenidos en los ensayos de clonogenicidad celular (supervivencia celular en función de la dosis de radiación administrada), hemos analizado, por otra parte, la virtualidad de dos modelos matemáticos para deducir los parámetros indicativos de la radiosensibilidad celular. Los resultados de tales cálculos figuran en las Tablas 3.17 y 3.18.

Para determinar cuál de los dos modelos citados ajusta con mayor precisión con las curvas de supervivencia celular experimental, hemos calculado los errores relativos de los valores de supervivencia estimados matemáticamente y hemos comparado éstos con los resultados experimentales de supervivencia obtenidos en función de la dosis. Las figuras 4.1 y 4.2 ofrecen de manera gráfica estos resultados. De su lectura es fácil concluir que el modelo lineal-cuadrático (L-Q) ajusta mejor que el modelo de blancos múltiples (MB) con los datos experimentales. En efecto, los errores relativos encontrados para bajos valores de la dosis (2 y 3 Gy), no superan la cifra del 3% de error cuando la aproximación se hace utilizando el modelo lineal-cuadrático. Sin embargo, para este mismo intervalo de dosis, el error relativo resultante de la aplicación del modelo de múltiples blancos oscila entre el 10 y 16%. El error máximo encontrado ha sido del 43% para 6 Gy usando el modelo de múltiples blancos y de 26% para 12 Gy cuando los datos experimentales se ajustaron al formulismo L-Q.

Datos relativos a los parámetros α y β derivados del ajuste al modelo lineal cuadrático, así como valores distintos para la fracción de supervivencia celular, tras la administración de dosis de 2 Gy, pueden ser encontrados en la literatura especializada. Entre ellos, como más significativos, destacan los valores ofrecidos por Fertil y Malaise (Fertil, 1981), Deacon y col. (Deacon, 1984), Steel y col. (Steel, 1989), McMillan y col. (McMillan, 1990) Yang y col. (Yang, 1991) y Peacock y col. (Peacock, 1992). Utilizando los valores medios de los coeficientes α y β , el valor medio de la supervivencia a 2 Gy y los correspondientes valores de la desviación típica, hemos comparado nuestros resultados con los obtenidos por otros autores (test estadístico de diferencias entre medias). Los resultados obtenidos (Tabla 4.1) permiten afirmar que, salvo excepciones, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Las excepciones mencionadas han sido especificadas en la Tabla 4.1 y en relación con ello conviene hacer notar que la razón de tales diferencias radica, probablemente, en la

inclusión, en el grupo de líneas celulares estudiadas por Deacon y Steel, de tipos celulares altamente radiosensibles (linfoma, neuroblastoma, mieloma, carcinoma de pulmón de células pequeñas y meduloblastoma, Grupos A y B de la clasificación de Deacon). Cuando tales modelos tumorales se excluyen del cálculo no es posible demostrar diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores. Por todo ello, podemos concluir que las líneas celulares utilizadas en este trabajo presentan un rango de radiosensibilidad intermedia y podrían ser incluidas dentro del grupo C de la clasificación de Deacon (Deacon, 1984).

En la esfera clínica, utilizando la noción de probabilidad de respuesta al tratamiento con irradiación y utilizando la representación de Fertil y Malaise (Fertil, 1981), es posible demostrar que para conseguir una probabilidad de control 90% es necesario administrar una dosis de radiación media comprendida entre 50 y 70 Gy. Este dato concuerda bien con la experiencia adquirida en el tratamiento, con radioterapia radical o adyuvante, de los pacientes afectos de cáncer de mama, cáncer de vías aerodigestivas superiores y otras localizaciones tumorales, en situación de riesgo de enfermedad clínica o subclínica loco-regional, respectivamente.

TABLA 4.1

COMPARACION DE RESULTADOS TRAS EL ENSAYO CLONOGENICO

	<i>alfa</i>	<i>beta</i>	<i>FS2</i>
<i>NR/Fertil, 1981</i>	--	--	$p < 0.20$
<i>NR/Deacon, 1984</i>	--	--	$p < 0.01$
<i>NR/Deacon, 1984(*)</i>	--	--	$p < 0.10$
<i>NR/Steel, 1989</i>	$p < 0.025$	$p < 0.35$	$p < 0.025$
<i>NR/Steel, 1989(**)</i>	$p < 0.35$	$p < 0.25$	$p < 0.30$
<i>NR/McMillan, 1990</i>	$p < 0.25$	$p < 0.15$	$p < 0.25$
<i>NR/Yang, 1991</i>	$p < 0.35$	$p < 0.15$	$p < 0.20$
<i>NR/Peacock, 1992</i>	$p < 0.20$	$p < 0.25$	$p < 0.25$

NR: resultados obtenidos en el presente trabajo

() Comparación de nuestros resultados con los incluidos en el grupo C de la clasificación propuesta por Deacon (1984).*

*(**) Comparación de nuestros resultados con los de Steel (1989) excluyendo las líneas celulares altamente radiosensibles descritas por éste (FS2/10%).*

4.2.2 Relaciones entre los parámetros extraídos de la curva de supervivencia

Las Tablas 3.19 y 3.20 ofrecen el análisis estadístico de las relaciones observadas entre la fracción de supervivencia a 2 Gy y cada uno de los parámetros de supervivencia celular extraídos del ajuste de los datos de supervivencia a los modelos L-Q y MB. El examen de dichas Tablas permite concluir que la FS2 correlaciona estrechamente con el coeficiente α de la curva de supervivencia sin que con los restantes parámetros se hay podido demostrar la existencia de una relación significativa.

Si bien es cierto que, en estudios de supervivencia celular, la utilización de distintos modelos teóricos puede conducir a la aparición de aproximaciones entre los datos experimentales de supervivencia y los ofrecidos por las ecuaciones matemáticas que rigen tales modelos y que estas aproximaciones pueden ser estadísticamente correctas, es cierto también que unos y otros (datos experimentales y estimaciones teóricas) difieren entre sí tanto desde el punto de vista conceptual como desde el propio ajuste matemático. Nuestros resultados nos han permitido demostrar, en efecto, que el modelo L-Q parece superior al de múltiples blancos en lo relativo al ajuste matemático de los datos experimentales con los teóricamente obtenidos (apartado 4.2). Por otra parte, el hecho de la que fracción de supervivencia celular a 2 Gy se correlacione exclusivamente con el componente α del modelo L-Q, hace pensar en la importancia de este parámetro como indicador de radiosensibilidad celular y/o de radiorrespuesta tumoral, toda vez que 2 Gy es el tamaño de fracción de dosis habitualmente utilizado en radioterapia clínica. Que la importancia clínica del coeficiente α haya conducido a los investigadores a preguntarse sobre la naturaleza del componente exponencial inicial de la curva de supervivencia celular a la radiación, no debe resultar, por ello, sorprendente.

A partir de los trabajos iniciales de Fertil y Deacon se conoce la existencia de un cierto nivel de relación positiva entre la pendiente inicial de la curva de supervivencia de las células tumorales sometidas a irradiación (ensayo clonogénico) y la probabilidad de curación

de los correspondientes tumores humanos (Deacon y col, 1984). La demostración, además, de que las diferencias encontradas entre los valores de FS2 se asocian con diferencias, también claras, de los correspondientes valores de α , ha dado origen a una nueva línea de pensamiento mediante la cual se intentan explicar las diferencias en radiosensibilidad celular sobre la base de la magnitud del daño irreparable producido por la radiación, daño que puede estar representado, de alguna manera, por el valor del coeficiente α .

La diferencia fundamental entre los dos modelos matemáticos utilizados utilizado para interpretar nuestros datos experimentales estriba, precisamente, en la existencia en el modelo L-Q de un componente inicial, lineal en la representación semilogarítmica, que puede ser interpretado (Steel, 1989a; Steel 1989b):

a) como elemento indicativo de lesión de un blanco crítico (teoría del blanco). En esta hipótesis, de acuerdo con la teoría del modelo de múltiples blancos, el hombro de la curva de supervivencia sería expresión del número de blancos que deben ser inactivados para ocasionar la muerte celular. La pendiente inicial podría, entonces, ser explicada por i) la existencia de un único blanco crítico cuya inactivación conduciría a la muerte celular, ii) la inhomogénea sensibilidad del genoma a la radiación. Puede ser posible, efectivamente, que el daño producido sobre ciertas partes críticas del genoma tenga un efecto mucho más severo sobre la viabilidad celular que el producido en otros lugares. Diferencias en el grado de compactación de la cromatina (Chiu y col., 1986; Bohr y col., 1987) podrían explicar, en este sentido, la existencia de distintos niveles de sensibilidad a la inducción de lesiones sobre el DNA celular o distinta probabilidad de reparación de las mismas, situaciones que, desde un punto de vista matemático pueden describirse mediante un modelo multicompartimental uno de cuyos componentes podría ser o podría ser aproximadamente lineal.

b) como exponente de la distribución de la energía liberada tras la interacción de la radiación con las células. Los estudios microdosimétricos relativos a la interacción de fotones

de radiación electromagnética con las células han permitido poner de manifiesto que la distribución de las ionizaciones radioinducidas no es homogénea a lo largo de las "trazas" de los electrones secundarios o rayos delta resultantes de la cesión inicial de energía. En efecto, al final de la trayectoria de los electrones se producen acontecimientos ionizantes múltiples (10 o más ionizaciones) que pueden distribuirse sobre estructuras biológicas de diámetro aproximado igual a 5 nm. Tales "racimos" de ionizaciones podrían desencadenar la muerte de la célula (Goodhead y col., 1983) si se producen sobre el DNA. Como quiera, por otra parte, que el diámetro de la doble hélice de DNA es del orden de 2 nm, este proceso de ionización múltiple puede originar un número variable de lesiones en fragmentos de DNA de longitud equivalente a 10-15 pares de bases (longitud de una espira de DNA igual a 3.4 nm). El fenómeno así producido ha sido denominado "local multiple damaged sites", LMDS (Ward, 1986). Algunas de estas lesiones locales múltiples podrían ser no-reparables y, por ello, tendrían alta probabilidad de inducir la muerte celular. Las lesiones descritas se originarían tras un solo impacto y su relación con la dosis de radiación, en la representación semilogarítmica, daría lugar al componente lineal de la curva de supervivencia. Junto a tales lesiones, ionizaciones distantes entre sí darían origen a lesiones aisladas que pueden ser reparadas más fácilmente por las células. Altas dosis de radiación dadas a alta velocidad podrían originar gran número de lesiones con lo que la probabilidad de que dos, o más, lesiones se produzcan suficientemente próximas entre sí como para permitir la interacción entre ellas sería mayor. La naturaleza de este fenómeno de interacción no es bien conocida pero permite explicar el componente curvilíneo de la relación supervivencia celular / dosis. Las ideas recogidas aquí han sido expuestas por Steel (Steel, 1991), utilizando el concepto de "severidad de lesión" bajo el que se incluyen dos nociones distintas:

i) el tipo y la multiplicidad del daño inducido en regiones locales del DNA puede variar ampliamente entre distintas células;

ii) la localización del daño dentro del genoma puede determinar la probabilidad de muerte celular.

El concepto de severidad de las lesiones radioinducidas incluye tanto el tamaño físico de la lesión como su probabilidad de reparación (Peacock y col. 1992b). No todas las lesiones severas radioinducidas son, por ello, letales. Algunas estarán localizadas en regiones no relevantes del genoma y no tendrán influencia sobre la viabilidad celular. Otras, tras el desarrollo de los procesos celulares de reparación, pasarían a una situación de relativa tolerancia por las células. En función de todo ello parece claro que el componente lineal de la curva de supervivencia celular puede, pues, ser expresión gráfica del proceso de inducción de lesiones severas sobre el DNA y es probable que dichas lesiones estén originadas por racimos de ionizaciones producidos al final de las "trazas" de los electrones secundarios o rayos delta que den origen a múltiples rupturas simples y dobles de la cadena del DNA situadas en inmediata proximidad unas de otras (Peacock y col. 1992b).

El componente α de las curvas de supervivencia determina, por tanto, la radiosensibilidad celular a bajos niveles de dosis (2 Gy por ejemplo). Este hecho explica la relación estadísticamente significativa entre FS2 y α encontrada recientemente por Peacock y col. (Peacock, 1992a) y confirmada en nuestro trabajo (Tabla 3.19, apartado 3.3).

4.3. ESTIMACION DEL NUMERO INICIAL DE LESIONES RADIOINDUCIDAS

4.3.1 Particularidades de la técnica PFGE

El procedimiento convencional de electroforesis en gel aplicado a la separación de fragmentos de DNA está limitado por el tamaño de la molécula. Utilizando esta técnica no resulta, por ello, posible separar fragmentos de DNA superiores a 50 Kpb (kilo pares de bases). Por otra parte, la medida del daño inducido sobre el DNA resulta difícil de valorar puesto que la molécula, una vez purificada, es decir separada de su microambiente cromatínico / cromosómico protector, es un enorme polímero que se rompe fácilmente en solución. De hecho, el cromosoma humano más pequeño tiene un tamaño superior a 10^8

pares de bases, su tamaño que se reduce, tras su purificación a 10^5 pares de bases, aproximadamente. Estos datos dan idea de la enorme fragilidad de la molécula de DNA y de la dificultad de investigar por procedimientos convencionales el efecto producido por la radiación (Ahn, 1991) sobre la misma.

El desarrollo tecnológico ha facilitado, sin embargo, la separación de moléculas de mayor tamaño. La instrumentación desarrollada por Schwartz y Cantor (Schwartz, 1984) permitió, en un primer momento, resolver moléculas de hasta 2 Mpb (mega pares de bases) y a partir de este trabajo metodológico inicial ha sido posible aumentar la capacidad de resolución de los instrumentos para electroforesis de DNA. Probablemente, la técnica hoy día más utilizada para el estudio de las rupturas dobles de cadena de DNA (rdc) sea la electroforesis de campo pulsado (PFGE) (Blöcher, 1989; Stamato, 1990; Ager, 1990; Iliakis, 1991a). Esta metodología se basa en el cambio de sentido de la fuerza de un campo eléctrico cuya dirección se alterna de manera regular (pulso) a lo largo del tiempo total de electroforesis. La alternancia del campo fuerza a las moléculas de DNA a sucesivos estados de relajación y reorientación, con lo que se consigue separar moléculas de hasta 12 Mpb. Al mismo tiempo, se evitan las rupturas espontáneas del DNA durante el proceso de lisis celular y ulterior purificación puesto que las células, una vez irradiadas o antes de la irradiación, se embeben en un gel de agarosa, que es sólido a temperatura ambiente (plug). La lisis celular se realiza posteriormente adicionando al plug la correspondiente solución tampón. De esta manera, se evitan el movimiento y la fragmentación espontánea del DNA.

*La migración de las moléculas de DNA en el gel de agarosa es tamaño-dependiente (véase figura 2.2). Ello permite, utilizando marcadores de tamaño de DNA (cromosomas de *S. pombe* y *S. cerevisiae*) el conocimiento del tamaño del fragmento de DNA separado en función de su posición en el gel. Largos tiempos de recorrido e intervalos de pulso también largos (nosotros hemos utilizado 96 horas y 60 minutos, respectivamente) y baja intensidad de corriente (, 0.03 mA) pueden considerarse como condiciones óptimas para la separación*

(Whitaker, 1991). Mediante este procedimiento ha sido posible observar diferencias entre la cantidad de DNA extraída del pozo tras irradiación celular a baja dosis (1 Gy) y la fracción de DNA que migra del pozo cuando no se someten las células a irradiación (posición control, véase figura 2.3). En las condiciones descritas, la relación entre tamaño de la molécula de DNA y distancia a la que ésta migra en el gel se ajusta muy bien a una relación lineal. Nosotros hemos ajustado, efectivamente, los puntos experimentales obtenidos a una relación lineal y los coeficientes de correlación encontrados han sido siempre superiores a 0.975 (datos no incluidos). Sin embargo, cuando las condiciones de electroforesis cambian es posible que la relación entre tamaño y distancia se ajuste mejor a otro tipo de función. Por ejemplo, Ahn y col (Ahn, 1991) y Elia y Nichols (Elia, 1993) consideran que esta relación está definida por una función log-lineal. Se conoce, asimismo, que en condiciones distintas de la utilizadas en este trabajo la capacidad de resolución de la electroforesis en agarosa se modifica, apareciendo "bandas de compresión" para tamaños de DNA mayores que 6 Mb (Elia, 1993) o inferiores a 2 Mb (Vollrath, 1987).

4.3.2 Relación entre cantidad de DNA extraída y dosis de radiación administrada

De acuerdo con la metodología utilizada y las consideraciones precedentemente expuestas, debe quedar claro que la capacidad de separación de moléculas de DNA rotas en sus dos cadenas por la radiación queda limitada al intervalo comprendido entre 8 Mpb y 0.2 Mpb cuando se utiliza la técnica de PFGE. Moléculas intactas de DNA así como fragmentos de mayor tamaño que 8 Mpb permanecen dentro del pozo (fracción no extraída). Esto significa que la PFGE sólo puede resolver moléculas de DNA de tamaño inferior al 4% del tamaño del cromosoma humano medio.

Pues bien, los resultados obtenidos en los experimentos de inducción de daño sobre el genoma celular (ruptura doble de cadena de DNA) nos han permitido demostrar que:

- i) la cantidad de DNA extraída del pozo es dependiente de la dosis de radiación administrada a las células.

ii) para una dosis de 5 Gy, la fracción de DNA extraída del pozo supera con claridad el valor correspondiente a la cantidad de DNA extraída de los pozos cuyo contenido celular no fué irradiado. Como puede comprobarse en las Tablas 3.21 a 3.26, los valores de la fracción de actividad extraída del pozo para dosis de 5 Gy oscilan en nuestros experimentos entre 4.7 ± 6 ($M \pm ESM$) y 11.5 ± 2.5 . De acuerdo con datos previos, hemos considerado el valor de 1 Gy como la cantidad menor de dosis para la que es posible demostrar diferencias significativas en la fracción de DNA extraído para células irradiadas y no irradiadas, respectivamente (Whitaker, 1991).

iii) La relación entre cantidad de DNA extraída (o retenida) del pozo (en el pozo) y dosis de radiación no se ajusta a una función lineal. En efecto, las gráficas de las figuras 3.14 a 3.19 ponen de manifiesto que, a una primera fase (Dosis < 30 Gy) en la que la relación entre lesión inducida y dosis administrada se aproxima a una línea recta, sigue una segunda fase de disminución progresiva de la cantidad de DNA extraída por unidad de dosis. Este fenómeno da origen al aplanamiento de la gráfica y ha sido encontrado por distintos autores (Iliakis, 1991b; Whitaker, 1992a; Kysela, 1993a; Warters, 1992; Kysela, 1993b; Ruiz de Almodóvar, 1993a, 1993b; Nevaldine, 1993; Tobi, 1993; Whitaker, 1994; Ruiz de Almodóvar, 1994a; Ruiz de Almodóvar, 1994b; Ruiz de Almodóvar, 1994c).

4.3.3. Método semicuantitativo para el cálculo de rdc de DNA

Se cree que el número de rdc de DNA producidas por la radiación está relacionado con la fracción de DNA cuyo tamaño es inferior al que marca el límite superior de separación de fragmentos (8 Mpb) en las condiciones de la PFGE (Blöcher, 1990). Esta suposición ha sido confirmada por Iliakis y col. (Iliakis, 1991) y Whitaker y col. (Whitaker, 1992), utilizando células marcadas con ^{125}I -UdR y dejando que se acumule un número suficiente de desintegraciones de los átomos de ^{125}I , se ha descrito que, por término medio, cada desintegración de ^{125}I produce una rdc (Krish, 1977; Iliakis, 1991a). De esta forma, se

ha podido demostrar que la fracción de actividad extraída del pozo es proporcional al número de rdc al menos en la porción lineal de la curva que relaciona FAE con dosis. Basándose en estos hechos, Iliakis ha utilizado el parámetro FAE como una estimación directa del daño producido sobre la molécula de DNA (Iliakis, 1991b). Blöcher ha desarrollado, por su parte, una teoría que describe la relación existente entre FAE y rdc para un rango amplio de dosis y ha demostrado que a una relación lineal entre ruptura doble y dosis se asocia una función no lineal entre FAE y dosis (Blöcher, 1990).

Tratando los resultados obtenidos en este trabajo en la forma indicada por Iliakis, hemos calculado la fracción de actividad extraída por unidad de dosis a partir de las pendientes indicativas de la lesión molecular inducida sobre cada una de las líneas celulares utilizadas. Tales datos figuran en la Tabla 3.27. Su análisis permite demostrar que la FAE por unidad de dosis depende de la línea celular estudiada y su valor oscila entre 1.21 y 1.98% por Gy. Teniendo en cuenta el valor medio de la pendiente y el error estándar que afecta a su estimación, es posible comparar las distintas pendientes de inducción de daño obtenidas. Hemos demostrado, así, que entre los valores de inducción de daño por unidad de dosis sólo existen diferencias significativas si se comparan dos de las líneas celulares (T47D-B1 y RT-112) con los restantes. En estas dos líneas celulares la pendiente de inducción de daño ha resultado ser superior a la encontrada en demás. Para comprobar si los parámetros indicativos de inducción de daño y de radiosensibilidad celular están relacionados entre sí, hemos realizado un estudio de correlación entre la pendiente de la curva de inducción de rdc y la fracción de supervivencia a 2 Gy (apartado 3.4.2). El resultado de este análisis ($r = 0.658$, $p = 0.227$) nos ha permitido demostrar la dependencia de uno y otro parámetro. Es decir, a mayor lesión inicial radioinducida -estimada como FAE- no se asocia una supervivencia celular inferior. La figura 4.3 muestra con claridad este resultado.

4.3.4 Método cuantitativo para el cálculo de rdc de DNA. Relación entre dosis de radiación y número de rdc de DNA

En el apartado 2.8.2 del capítulo de Material y Métodos se han descrito las bases teóricas en las que se fundamenta la transformación matemática de la función de distribución de los fragmentos de DNA generados por irradiación de las células. Los resultados obtenidos aparecen recogidos en el apartado 3.4.3 del capítulo de Resultados.

Pues bien, las figuras 3.20 a 3.25, correspondientes a cada una de las líneas celulares estudiadas, permiten asegurar que entre dosis de radiación y número de rupturas dobles de cadena de DNA producidas existe una relación lineal. Dicho de otra forma, la eficacia del proceso de inducción de rupturas dobles de cadena de DNA por unidad de dosis es una constante tanto si se administran altas como bajas dosis de radiación. Este hecho ha sido descrito con anterioridad en experimentos realizados, en presencia o ausencia de oxígeno, con la línea celular RT-112 (Ruiz de Almodóvar, 1993a; Ruiz de Almodóvar, 1994a). Los coeficientes de correlación obtenidos, oscilantes entre 0.890 y 0.986, y el valor de la significación estadística del ajuste, que fue en todos los casos inferior a 0.0001, permiten afirmar que la correlación encontrada es altamente significativa.

La relación entre rdc y dosis ha sido estudiada con anterioridad usando como técnica para la estimación del daño molecular radioinducido la filtración por elución neutra (Bradley, 1979). Alguno de los estudios realizados, particularmente los publicados por Radford (Radford, 1985; Radford, 1986; Prise, 1987; Wlodek, 1987), han mostrado la existencia de una relación curvilínea entre el número de rupturas dobles de cadena de DNA y la dosis. Este fenómeno ha sido interpretado como demostrativo de la existencia de dos mecanismos distintos que influyen sobre la respuesta celular a la radiación y que determinarían sucesivamente la porción inicial curvilínea y la porción final recta de la relación rdc/dosis.

Radford ha criticado trabajos previos al suyo (Lehmann, 1970; Woods, 1981; van der

Schans, 1982; Blöcher, 1982) en los que la relación rdc/dosis resultó ser lineal, argumentando la existencia de defectos metodológicos en los experimentos (pocos puntos experimentales o incluso ninguno en la región de baja dosis). Por otra parte, los resultados de Radford demuestran también que la presencia en el medio de cultivo de agentes radioprotectores aumenta de manera dramática el componente no lineal de la curva de supervivencia. Radford ofrece dos interpretaciones distintas para sus resultados:

i) la forma de la relación rdc/dosis puede deberse al consumo, a bajos niveles de dosis, de las moléculas que intervienen en los procesos de reparación de las lesiones radioinducidas. Por ello, incrementos sucesivos de la dosis serían más eficaces en la producción de rdc, originándose así un incremento progresivo de la pendiente de la curva rdc/dosis;

ii) de acuerdo con la hipótesis de la doble interacción necesaria para producir una rdc, la probabilidad de inducción de la citada lesión crece en forma cuadrática con la dosis.

Wlodek y col. (Wlodek, 1987) atribuyen, en cambio, el aspecto curvilíneo de las curvas dosis-respuesta a la existencia de diferencias en la organización de la cromatina celular.

La hipótesis relativa a la vigencia de un modelo cuadrático o lineal cuadrático para explicar la inducción de rdc por radiación, dentro del rango de dosis utilizado en estudios de supervivencia celular, (hipótesis subyacente a los trabajos de Radford y Wlodek) no concuerda, sin embargo, con las observaciones previas realizadas usando distintos sistemas celulares eucarióticos, de las que ha surgido la idea de la existencia de una relación lineal entre ambas magnitudes (Blöcher, 1982; Frankenberg-Schwager, 1981; Frankenberg, 1981; Sabora, 1991). Trabajos posteriores a los publicados por Radford, utilizando líneas celulares

tumorales humanas, han apoyado la hipótesis de linealidad en la relación rdc/dosis. Así, por ejemplo, los resultados publicados por McMillan y col. (McMillan, 1990), apuntan hacia la existencia de una relación lineal. Por otra parte Kelland y col. (Kelland, 1988) encuentran que la relación entre rdc y dosis puede ser dependiente de la línea celular utilizada. Así, los datos correspondientes a células radiosensibles se aproximan a una relación lineal mientras que las células radiorresistentes parecen ajustarse mejor a una relación curvilínea.

Probablemente, modificaciones experimentales de la metodología propias de cada autor expliquen las diferencias encontradas en el estudio de la relación red/dosis. En este sentido, Okayasu y col. (Okayasu, 1989) han descrito los resultados obtenidos modificando las condiciones que rigen los experimentos de filtración por elución alcalina y han demostrado que los valores obtenidos para la fracción de DNA eluida dependen fuertemente de dichas condiciones (tipo y concentración de detergente para lisar las células, por ejemplo). Estos resultados parecen reforzar la idea sostenida por Ahnström e Iliakis (Ahnström, 1985; Iliakis, 1988a) en virtud de la cuál la forma curvilínea de la relación dosis / supervivencia podría derivar de un simple artefacto de la técnica. Por esta razón, los datos procedentes de elución alcalina deben interpretarse con precaución, sobre todo si se intentan utilizar para realizar aproximaciones mecanicistas al conocimiento de la acción de la radiación a nivel molecular.

Ward ha revisado recientemente los mecanismos de lesión molecular radioinducida sobre el DNA (Ward, 1990). La producción de rupturas simples de cadena (rsc) se inicia con la formación un radical activo en el azúcar de un nucleótido, tras la pérdida de un átomo de hidrógeno (bien por ionización directa o por separación del mismo a través de una reacción con el grupo OH). El radical producido sobre la desoxirribosa reaccionaría con el oxígeno originando así un radical peróxido y subsecuentemente una ruptura simple de cadena (von Sonntag, 1987). Aunque el mecanismo completo de formación de rupturas dobles de cadena no es bien conocido, se han propuesto dos posibles rutas. Ambas coinciden en la

formación inicial de rsc por el mecanismo anteriormente explicado y difieren en la explicación de la forma en la que se produce la segunda rsc. Según la teoría de Siddiqi y Bothe (Siddiqi, 1987), tras producirse la ruptura simple de cadena inicial se pone en marcha una secuencia de reacciones sucesivas con radicales libres que terminaría por producir la ruptura de la segunda cadena. Ward, a diferencia de lo anterior, piensa que la ruptura doble de cadena surge como consecuencia del ataque múltiple y simultáneo de radicales libres sobre ambas cadenas de una manera simultánea (Ward, 1985) e introduce el concepto de lesión local múltiple (LMDS) como explicación para la formación de rupturas dobles de cadena. Tomando, por ello, en consideración:

- a) el papel del oxígeno molecular como fijador del daño radioinducido,*
- b) la concentración de grupos tioles y su intervención en la reparación química de las lesiones producidas,*
- c) las constantes de velocidad calculadas para las distintas reacciones producidas entre radicales libres,*
- d) la velocidad teórica calculada para que el consumo de grupos tioles se ponga de manifiesto en forma de modificación de la pendiente de la curva rdc/dosis,*

Ward ha concluido que el daño inicial producido por la radiación, tanto si se trata de rsc como rdc, debe estar directamente relacionado con la dosis (relación lineal). Por esta razón, el número de lesiones producidas por unidad de dosis debe ser constante.

Nuestros resultados demuestran, en los seis modelos tumorales estudiados, la existencia de una relación claramente lineal entre el número de rdc y la dosis administrada, confirman la teoría de Ward y autorizan a establecer desde un punto de vista experimental

una importante conclusión en Radiobiología: "La cantidad de lesiones moleculares producidas por unidad de dosis de radiación sobre el DNA celular es constante".

4.3.5 Relación entre número de rdc de DNA y radiosensibilidad celular

Demostrado que el número de rupturas dobles de cadena de DNA (pendiente de la línea de relación rdc/dosis) difiere de unas líneas celulares a otras, el problema radica, ahora, en determinar si el efecto de la radiación sobre las células, a nivel molecular, es igualmente característico de cada línea celular.

La exposición de las células a la radiación ionizante origina una serie de efectos biológicos que pueden ser evaluados a dos niveles diferentes: i) a nivel de la célula, tomando en consideración la muerte celular radioinducida y ii) a nivel de la molécula supuestamente "blanco" de la acción de la radiación, estudiando el DNA, las lesiones producidas por la radiación sobre el mismo.

En el campo de las lesiones moleculares radioinducidas se han realizado considerables esfuerzos para identificar las consecuencias celulares que derivan de cada uno de los tipos de lesión radioinducida sobre el DNA. Entre dichas lesiones, la ruptura doble de cadena de DNA ha recibido especial atención puesto que el mantenimiento de la información genética y de la capacidad proliferativa celular, requieren tanto de la integridad del DNA como del desarrollo del proceso de replicación del mismo. En relación con ello cabe señalar hoy que: i) la inducción de aberraciones cromosómicas y la muerte celular diferida (resultante de ciertos tipos de aberración: anillos y dicéntricos, esencialmente) pueden producirse como consecuencia de rupturas de la doble hélice del DNA (Freifelder, 1965; Frankenberg, 1981; Painter, 1980; Bender, 1974; Ho, 1975; Resnick, 1976a, 1976b; Taylor, 1978; Bryant, 1984; Obe, 1992); ii) determinadas rdc no reparadas por sistemas celulares apropiados conducen, de hecho, a la muerte celular (Blöcher, 1982; Ward, 1990; Ritter, 1977).

La cuestión, por lo tanto, es: ¿diferencias en la magnitud del daño inicial radioinducido se asocian a distintos niveles de supervivencia celular?.

La revisión bibliográfica de los trabajos relacionados con este tema permite poner de manifiesto la existencia de un cierto grado de controversia en torno al papel que juega el daño inicial como determinante de la radiosensibilidad celular. En un intento de sistematización de los datos existentes en la literatura hemos agrupado éstos tomando como referencia el modelo tumoral sometido a estudio. Distinguiremos así:

i) Líneas celulares tumorales humanas: Kelland y col. (Kelland, 1988), estudiando 5 líneas celulares de carcinoma de cervix humano de diferente radiosensibilidad, han demostrado que el daño inicial producido por la radiación correlaciona con la radiosensibilidad celular intrínseca. Células más radiosensibles presentan mayor número de rdc de DNA medidas por filtración mediante elución neutra. Sin embargo, esta proporcionalidad parece depender del nivel de dosis administrado. Se han encontrado, en efecto, diferencias en la magnitud de las lesiones radioinducidas entre líneas celulares de distinta radiosensibilidad, cuando la dosis es del orden de 10 Gy, hecho que no ocurre para dosis de 30 o 40 Gy. La discordancia ha sido atribuida a artefactos técnicos (fenómenos de saturación del filtro por pequeños fragmentos de DNA).

A la misma conclusión y utilizando idéntica metodología, han llegado Peacock y col (Peacock, 1989) comparando dos líneas celulares tumorales humanas de diferente radiosensibilidad, la RT-112 de cáncer de vejiga, radiorresistente, y la HX-142 procedente de un neuroblastoma, radiosensible.

McMillan y col. (McMillan, 1990), estudiando 9 líneas celulares tumorales humanas procedentes de tipos distintos de tumor cuyo rango de radiosensibilidad (FS2) osciló entre 0.13 y 0.62, han encontrado cierto nivel de relación entre lesión molecular (medida por

filtración mediante elución alcalina) y radiosensibilidad, aunque esta relación no pudo ser ajustada a un modelo matemático simple. La tesis de McMillan es que el daño inicial radioinducido debe ser considerado como determinante de la radiosensibilidad celular, si bien otros factores como la capacidad de reparación celular de las lesiones radioinducidas y la tolerancia al daño residual deben ser, igualmente, tenidos en cuenta.

Recientemente, Whitaker y col. (Whitaker, 1994) han estudiado 9 líneas celulares procedentes de distintos tipos de tumores humanos. Los datos de FS2 cubrieron el intervalo de 0.08 a 0.62. La inducción de daño fue estudiada mediante electroforesis de campo pulsado encontrándose diferencias en la pendiente de las curvas dosis/respuesta (valores de la pendiente comprendidos entre 1.30 y 2.42 FAE/Gy). De los resultados obtenidos Whitaker ha concluido que entre la pendiente inicial de la curva de inducción de daño y la radiosensibilidad celular intrínseca estimada a partir de FS2 existe una relación estadísticamente significativa.

ii) Modelos celulares compuestos por una línea celular original y, derivada de ella, otra(s) modificada(s): Para tratar de esclarecer los mecanismos moleculares de la radiosensibilidad celular intrínseca se han utilizado modelos en los que, a partir de determinadas líneas celulares, se han seleccionado mutantes o "clones" de diferente radiosensibilidad. Por ejemplo, McMillan y col. (McMillan, 1991), utilizando la línea celular de carcinoma de vejiga humano MGH-U1 y su correspondiente mutada S40b, han obtenido para FS2 valores respectivos del orden de 0.72 y 0.32,. Sin embargo, el estudio de la lesión molecular inicialmente inducida por la radiación puso de manifiesto que ambas sublíneas sufren idéntico nivel de rdc por unidad de dosis. La paradoja se ha resuelto admitiendo que la radiosensibilidad pueda estar asociada a otros factores (parámetro α de la curva de supervivencia ajustada al modelo L-Q, según los autores).

Green y col. (Green, 1992), utilizando dos sublíneas celulares (EM9 y NM2)

procedentes de la CHO-AA8 (Chinese Hamster Ovary), caracterizadas por una acusada sensibilidad a la radiación ionizante, han conseguido demostrar que las diferencias en radiosensibilidad observadas para cada uno de los clones derivados de la línea parental responden a bases moleculares distintas. En una de ellas (NM2), las diferencias en radiosensibilidad se han atribuido a diferencias en la fidelidad del proceso de reparación de las lesiones radioinducidas. Este hecho puede estar relacionado con la disminución del tiempo de "parada" en G1 (retraso mitótico) que se produce normalmente tras irradiación. De esta forma, si el tiempo permitido para la reparación es corto, el daño puede ser más fácilmente "fijado". Para la otra línea celular (EM9), las diferencias en radiosensibilidad detectadas correlacionan, en cambio, con diferencias en el nivel de daño inicial radioinducido. La correspondencia, pues, entre lesión inicial y radiosensibilidad parece clara en este trabajo.

La cuestión es, no obstante, polémica. En efecto, Kysela y col. (Kysela, 1993b), han publicado los resultados de su estudio sobre la línea celular V79B (Chinese Hamster Ovary) y su mutante radiosensible XR-V15B y han demostrado que las diferencias en radiosensibilidad entre células tipo salvaje y mutadas no correlacionan con diferencias en el nivel de daño inicial radioinducido.

Por otro lado, Alaoui-Jamali y col (Alaoui-Jamali, 1992) han estudiado la línea celular MCF-7 y la sublínea MCF-7 ADR^R, resistente a la adriamicina, derivada de ella. Ambos tipos de células, que expresan el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos (MDR) y manifiestan una expresión ampliada de GSH-S-transferasa y GSH-peroxidasa mostraron diferencias en su radiosensibilidad (1.48 y 1.3 frente a 1.39 y 7 para D_0 y n , respectivamente) y los valores de supervivencia celular obtenidos correlacionaron estadísticamente con el nivel de rupturas simples y dobles de cadena de DNA inducidas.

Finalmente, Iliakis y col. (Iliakis, 1990) han publicado los resultados obtenidos tras

realizar experimentos de radiosensibilidad celular y molecular sobre una línea celular de embrión de rata (REC) inmortalizada por infección con el retrovirus pMV6 c-myc. Comparando las respuestas obtenidas con los resultados procedentes de la línea celular 3.7, obtenida a partir de REC mediante transfección con los oncogenes c-H-ras y v-myc, los autores han objetivado claras diferencias en los parámetros de radiosensibilidad celular, diferencias que no han podido ser atribuidas a un mayor nivel de daño inicial radioinducido en la línea celular sensible.

En la misma línea, Cheong col. (Cheong, 1992) han investigado sobre radiosensibilidad celular e inducción y reparación de rdc de DNA, en células V79. Comparando los resultados obtenidos con los observados al irradiar, en idénticas condiciones (fase de confluencia), los clones mutantes radiosensibles irs-1, irs-2 e irs-3 (Cheong, 1992), encontraron notables diferencias entre los parámetros de radiosensibilidad celular, que no pudieron ser explicadas tampoco por cambios en el nivel del daño inicial radioinducido.

iii) Células irradiadas en condiciones normales frente a células irradiadas en presencia de modificadores de la respuesta: En su trabajo inicial Radford, (Radford, 1985) estudió los cambios en radiosensibilidad ofrecidos por células L de ratón irradiadas en diferentes condiciones experimentales: control, hipertermia, hipoxia, hipoxia y misomidazole, congelación, euoxia y cisteamina e hipoxia y cisteamina. Sus resultados demuestran que las diferencias en radiosensibilidad encontradas se asocian claramente con diferencias en el nivel de daño inicial (rdc) radioinducido. Posteriormente, el mismo autor (Radford, 1986), utilizando 4 líneas celulares distintas y modificando las condiciones experimentales del ensayo clonogénico y del método de estudio de la lesión inicial radioinducida, concluyó sobre la importancia de la lesión inicial como determinante de la muerte celular.

Sapora y col. (Sapora, 1991) utilizando la línea celular V79 y distintas condiciones experimentales (euoxia/anoxia, presencia/ausencia de DMSO), han demostrado que el número

inicial de rupturas dobles de cadena no predice con exactitud la muerte celular aunque en ausencia de di-metil-sulfóxido (DMSO), los parámetros de supervivencia (en condiciones de presencia o ausencia de oxígeno) correlacionan estadísticamente con los datos moleculares.

De modo semejante, Whitaker y col. (Whitaker, 1992), estudiando la línea celular de cáncer de vejiga humano, RT-112, en condiciones experimentales de presencia/ausencia de oxígeno y misonidazole, han demostrado con claridad la existencia de una relación inversa entre supervivencia celular y daño inicial radioinducido. Y análogamente también, Prise y col. (Prise, 1992), utilizando la línea celular V79 han estudiado el efecto del oxígeno y de la depleción de glutathion (tratando los cultivos celulares con BSO) sobre la supervivencia y han conseguido poner de manifiesto que los resultados obtenidos en el ensayo clonogénico correlacionan con la magnitud del daño inicial (rdc) radioinducido.

iv) Células procedentes de pacientes afectos de diversas enfermedades: Entre los modelos celulares más frecuentemente utilizados para investigar las bases moleculares de la radiosensibilidad se incluyen los derivados de individuos con enfermedades, o síndromes particulares, que se asocian con una especial radiosensibilidad. Entre estos modelos, el mejor estudiado es, probablemente, el constituido por fibroblastos procedentes de pacientes afectos de ataxia-telangiectasia (AT). Los estudios comparativos de radiosensibilidad celular y molecular entre fibroblastos AT y fibroblastos de personas sanas han permitido demostrar, en este sentido, la existencia de diferencias importantes en la supervivencia celular asociadas con niveles de daño inicial radioinducido muy próximos entre sí (Bridges, 1982; Cox, 1982; Lehmann, 1982; Peacock, 1989).

El número de modelos celulares susceptibles de inclusión en este subgrupo se ha expandido considerablemente. En virtud de los estudios realizados conocemos hoy que células obtenidas de pacientes con Corea de Huntington (Arlett, 1979), Síndrome de Nijmegen Breakage (Taalman, 1983), Retinoblastoma hereditario (Arlett, 1979), Homocistinuria

(Sinelshchikova, 1987), Anemia de Fanconi (Arlett, 1979), Síndrome de Cockayne (Deschavanne, 1984), Síndrome de Gardner (Little, 1980) y Enfermedad de Alzheimer (Tobi, 1993) poseen una mayor radiosensibilidad que células procedentes del mismo tejido de sujetos sanos. La base molecular de tales diferencias no está, sin embargo, completamente aclarada.

4.3.6 Búsqueda de una relación general entre nivel de daño inicial radioinducido y radiosensibilidad celular.

Considerando exclusivamente las diferencias en radiosensibilidad que presentan las líneas celulares procedentes de tumores humanos (subgrupo i de la clasificación anterior) y desde un punto de vista teórico Ward (Ward, 1990), ha postulado que no deben existir variaciones en la inducción de rupturas dobles de cadena de DNA, por unidad de dosis, cualquiera que sea el tipo celular estudiado, siempre y cuando el nivel de oxigenación de las células sometidas a estudio sea constante. Ward atribuye las diferencias en radiosensibilidad objetivadas, bien a una distinta capacidad de reparación de las lesiones radioinducidas, bien a la mayor o menor fidelidad con la que este proceso se realice.

Recientemente, Peacock y col. (Peacock, 1992a) han resumido las experiencias del grupo del Institute of Cancer Research analizando la relación supervivencia celular / dosis de radiación en 11 líneas celulares tumorales humanas, 2 líneas de fibroblastos humanos y 2 líneas celulares tumorales de ratón. Los autores proponen inicialmente dos hipótesis para justificar las diferencias observadas en la radiosensibilidad celular:

Hipótesis I: las células sensibles presentan deficiencias en los sistemas de reparación. Algunas lesiones inducidas por la radiación, que podrían ser reparadas en células más resistentes, no lo son. Si la recuperación celular (recovery) es un reflejo de la reparación molecular (repair), es claro que, en estas condiciones, serían elevados los valores del coeficiente α y bajos valores del coeficiente β .

Hipótesis II: *Las células sensibles presentan un número mayor de lesiones por unidad de dosis (Gy) que las células resistentes. El daño inicial (es decir, el daño previo a la actuación de procesos enzimáticos de reparación) es mayor en células sensibles a la radiación. La frecuencia de lesiones no reparables y reparables será grande en ambas pero los coeficientes α y β de las células radiosensibles serán mayores.*

Tras el análisis de los datos procedentes de experimentos de irradiación aguda (coeficientes α y β del modelo L-Q), de irradiación a baja tasa de dosis (coeficiente α) y de fraccionamiento de la dosis (coeficiente β), los autores concluyen que la segunda hipótesis concuerda mejor con los resultados experimentales y por tanto la alta radiosensibilidad de ciertas líneas celulares tumorales humanas debe asociarse con niveles de daño inicial radioinducido más elevado (Peacock, 1992a).

En líneas celulares tumorales humanas, parece real, por tanto, la existencia de una ley general que relaciona radiosensibilidad celular y magnitud del daño inicial radioinducido. En efecto, todos los trabajos publicados hasta la fecha demuestran que la radiosensibilidad celular es una función de proporcionalidad inversa respecto del número de rupturas dobles de cadena de DNA inducidas por unidad de dosis. Por el contrario, cuando se analizan los resultados obtenidos en otros modelos tumorales, la base molecular de la radiosensibilidad celular pierde consistencia.

4.3.7 Confirmación experimental de la relación Supervivencia Celular / Daño Inicial Radioinducido

Nuestros resultados nos han permitido demostrar que existe una estrecha relación de dependencia entre el número inicial de rdc de DNA producidas por unidad de dosis de radiación y por unidad de DNA (Tabla 3.35) y el valor de la fracción de supervivencia a 2 Gy (Tabla 3.35) apoyando así las hipótesis publicadas por diversos autores. En particular la hipótesis II de Peacock ha quedado, a nuestro juicio, ciertamente confirmada.

Haciendo uso del modelo matemático previamente descrito para el cálculo de rdc, examinamos la cantidad de DNA extraído del pozo y analizamos la distribución de frecuencias de tamaño de los fragmentos de DNA a lo largo de la línea del gel (figura 4.7), los resultados obtenidos cambian considerablemente. Así, en la figura 4.8 se muestra la relación existente entre daño inicial radioinducido expresado como $rdc / Gy / 200 \text{ Mpb}$ y radiosensibilidad celular intrínseca, expresada como $FS2$, y la figura 4.9 representa la relación encontrada entre el coeficiente α y el número de $rdc / Gy / 200 \text{ Mpb}$ para cada una de las líneas celulares estudiadas. Comoquiera que el coeficiente α es un buen exponente de la probabilidad de inducción de lesión letal (irreparable), la relación entre α y número de $rdc / Gy / 200 \text{ Mpb}$ sugiere que las lesiones letales pueden constituir una fracción constante de las lesiones iniciales radioinducidas.

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los hallazgos de Whitaker y col. (Whitaker, 1994) es clara la aparición de ciertas discordancias. En efecto, para Whitaker la FAE es un parámetro que correlaciona estadísticamente con la radiosensibilidad celular ($FS2$), mientras que para nosotros tal relación es inexistente. Es probable que la razón que justifique tal diferencia sea el rango de radiosensibilidad de las células sometidas a estudio. En nuestro trabajo este intervalo ha sido $32 \leq SF2 \leq 68$, mientras que el intervalo de radiosensibilidad celular estudiado por Whitaker fué $8 \leq SF2 \leq 62$, y es probable, también, que la pendiente de la curva de extracción de DNA permita distinguir, unas de otras, células con diferente grado de radiosensibilidad. En cualquier caso, la distinción entre líneas celulares con rangos de radiosensibilidad muy próximos entre sí quizás precise de un tratamiento adecuado de los datos procedentes de la PFGE.

Finalmente, nuestros resultados (figuras 4.8 y 4.9) nos autorizan a concluir que las células procedentes de tumores humanos de distinta radiosensibilidad (distinto valor de $FS2$) sufren diferente número inicial de rupturas dobles de cadena de DNA por unidad de dosis de radiación y por unidad de DNA. Las células más radiosensibles son aquéllas en las que es

mayor el daño radioinducido. Lo contrario también es cierto, es decir, la mayor radiorresistencia celular implica un menor daño inicial radioinducido. Expresión de todo ello es el componente α de la curva de supervivencia, parámetro indicativo de la magnitud del daño irreparable, cuya relación con el número de rdc de DNA es de carácter lineal.

4.4. EL REAGRUPAMIENTO DE RUPTURAS DOBLES DE CADENA DE DNA COMO DETERMINANTE DE RADIOSENSIBILIDAD

4.4.1 Generalidades

Los experimentos de cinética de reagrupamiento de los fragmentos de DNA producidos tras irradiación celular han sido estudiados ajustando los datos experimentales a un modelo matemático definido por una función monoexponencial única -modelo monofásico- (Bradley, 1979; Bryant, 1980; Thames, 1989) o, más frecuentemente, una combinación de dos funciones monoexponenciales -modelo bifásico- indicativa del desarrollo simultáneo de dos procesos de reagrupamiento diferentes, rápido uno, más lento el otro (Cole, 1980; Coquerelle, 1981; van der Schans, 1983; Bryant, 1984; Radford, 1987; Iliakis, 1990; Frankenberg-Schwager, 1990; Stamato, 1993).

Frankenberg-Schwager y col. (Frankenberg.Schwager, 1992), estudiando la relación existente entre supervivencia celular y cinética de reagrupamiento de las rdc de DNA en células de levadura, han demostrado que la aproximación de los datos experimentales a los modelos monofásico o bifásico es dosis dependiente. A dosis altas los puntos experimentales se aproximan al modelo monofásico, como consecuencia del cuál en el proceso de reagrupamiento de rdc predominaría el componente lento. Por el contrario, cuando la irradiación se realiza a dosis moderadas o bajas es posible comprobar la existencia de dos componentes bien diferenciados entre sí. El nivel de la dosis administrada determina, por tanto, el predominio de un proceso sobre el otro. Los referidos autores han demostrado,

también, que las constantes de velocidad que caracterizan a cada uno de los componentes del proceso de reparación son independientes de la dosis. Frankenberg considera, por ello, que el proceso de reagrupamiento de rdc de DNA está definido por dos componentes cinéticos de primer orden (no-saturables) cuya importancia relativa depende de la dosis de radiación administrada (véase apartado 2.8.3).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo (figuras 3.35 a 3.40) parecen demostrar que el proceso de reagrupamiento de rdc de DNA en células tumorales humanas se ajusta a un modelo cinético bifásico. Hallazgos similares han permitido a Dikomey y Franzke (Dikomey, 1988) proponer una clasificación de las rupturas de cadena de DNA según su cinética de reagrupamiento. Aunque la clasificación de Dikomey no es directamente aplicable a nuestros resultados, puesto que la electroforesis de campo pulsado, en las condiciones experimentales descritas, sólo permite distinguir las rdc producidas por la radiación (Dikomey cuantifica, en cambio, tanto las rupturas simples como las rupturas dobles), nos ha parecido particularmente atractiva la idea de separar las rdc en distintas categorías y clasificar éstas según la mayor o menor velocidad del proceso de reagrupamiento. Podríamos distinguir así tres tipos diferentes de rdc

- Tipo I:** Lesiones de la doble hélice del DNA que pueden fácilmente ser reagrupadas (proceso cinético rápido).
- Tipo II:** Rupturas dobles de cadena de DNA que se reagrupan a menor velocidad (proceso cinético lento).
- Tipo III:** Rupturas dobles de cadena de difícil reparación por los sistemas enzimáticos celulares.

Desde esta perspectiva, podría ser posible realizar una interpretación causal de los mecanismos de producción de las rdc. En efecto, recordando los mecanismos de producción de rdc de DNA previamente expuestos en el apartado 4.3.4:

1) las rupturas tipo I de la clasificación cinética anterior podrían asociarse con el mecanismo de acción indirecta de la radiación (ataque inicial del radical OH a una de las cadenas de la doble hélice, ruptura de esta cadena, transferencia del radical a la cadena opuesta y consiguiente ruptura de la misma, (Siddiqi, 1987);

2) las rupturas tipo II de la citada clasificación podrían asociarse con la denominada lesión local múltiple (LMDS) producida directamente por la radiación sobre ambas cadenas de DNA (Ward, 1990).

3) las rupturas dobles de cadena de DNA clasificadas como tipo III podrían corresponder, en esta óptica, tanto a las lesiones calificadas por Steel como "altamente severas", que constituyen una porción de las LMDS, como a lesiones de menor gravedad inicial que en el curso de los procesos metabólicos que siguen a la irradiación resultan "fijadas" por interacción con otras de similares características (Steel, 1991).

Una interpretación distinta a la anterior acerca de los mecanismos de lesión molecular radioinducida podría ser la que sostiene que el reagrupamiento rápido de rdc (tipo I) se llevaría a cabo por la acción de ciertas enzimas (DNA ligasa, la exonucleasa y la DNA polimerasa) (Radford, 1987; Hittelman, 1982; Boothman, 1989) mientras que el proceso de reagrupamiento lento (tipo II), que puede ser bloqueado utilizando inhibidores de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Iliakis, 1988a), sugeriría la intervención de genes específicos cuya expresión (Boothman, 1989, Haimovitz-Friedman, 1991) liberaría productos susceptibles de iniciar la reparación de lesiones complejas del DNA a través del estímulo autocrino / paracrino característico del proceso de reparación de lesiones potencialmente letales. Esta

hipótesis explicaría la mayor o menor velocidad con la que se lleva a cabo el reagrupamiento de las rdc .

El análisis de los datos cinéticos de reagrupamiento de rdc de DNA pone de manifiesto, en último lugar, que la mayor parte de las lesiones producidas se reparan en el curso de las primeras horas que siguen a la irradiación. La fracción de lesiones no reparadas (en los experimentos de PFGE se identifican como lesiones tipo III), así como algunas lesiones que resultan "fijadas" durante el proceso de reparación podrían dar origen a la muerte de la célula. El resto de lesiones no reparadas o erróneamente reparadas se supone que pueden ser "toleradas" por la célula, bien porque afecten a partes no esenciales del genoma, o bien porque el nivel de daño residual inducido sea compatible con la capacidad de formación de colonias (Peacock, 1992b).

4.4.2 Parámetros característicos del proceso de reagrupamiento

Los parámetros que caracterizan el proceso de reagrupamiento de rdc de DNA se han recogido en las Tablas 3.48 y 3.49. El análisis de dichas Tablas muestra que las distintas líneas celulares ensayadas presentan diferencias claras en la velocidad de reagrupamiento de las rupturas. En efecto, los valores de k_1 y k_2 y, por extensión los valores de los tiempos medios correspondientes a los procesos de reagrupamiento rápido $(t_{1/2})_r$, y lento, $(t_{1/2})_l$, muestran diferencias que alcanzan el límite de la significación estadística cuando se comparan entre sí unos valores con otros (datos no mostrados). No obstante, las diferencias observadas en la proporción relativa de rdc reagrupadas de modo rápido y lento (valores de los coeficientes f_1 y f_2 , respectivamente) parecen independientes de la línea celular estudiada.

Los anteriores hallazgos nos permiten concluir, por tanto, que existen diferencias en la velocidad del proceso de reagrupamiento de rdc atribuibles a características intrínsecas de las líneas celulares tumorales ensayadas.

4.4.3 Probabilidad de que una rdc sea lesión letal

Utilizando los valores de daño inducido por unidad de dosis de radiación y por unidad de DNA sobre cada uno de los modelos tumorales utilizados en este trabajo (Tabla 3.34), ha sido posible calcular el promedio de rdc producidas por célula tras irradiar los cultivos con una dosis unitaria (1 Gy). El cálculo es sencillo:

$$\text{rdc / célula} = \text{rdc / 200 Mpb} \cdot N^{\circ} \text{ de cromosomas}$$

Aceptando, ahora, como aproximación, que todos los modelos tumorales estudiados tengan igual número de cromosomas (46) es evidente que 1 Gy de radiación produce entre 40 y 125 rupturas dobles de cadena de DNA. Estos datos coinciden plenamente con los descritos por otros autores (Barendsen, 1992).

Por otra parte, la frecuencia media de lesiones letales por célula y por unidad de dosis puede ser calculada a partir del modelo lineal-cuadrático, utilizando la expresión:

$$F(D) = -\text{Ln}(FS) = \alpha D + \beta D^2$$

ecuación que, una vez conocidos los valores de α y β (Tabla 3.17), posibilita el cálculo del valor promedio de lesiones letales por célula para cada una de las líneas celulares utilizadas.

La Tabla 4.2 recoge los resultados de ambos cálculos. La relación entre promedio de lesiones letales por célula y número de lesiones (rdc) inducidas por una cierta dosis de radiación, nos permite conocer, por ello, la probabilidad de que una determinada lesión pueda ser letal.

TABLA 4.2**DAÑO INICIAL Y LESION LETAL**

<i>Línea celular</i>	<i>rdc/célula</i>	<i>LL/célula</i>	P_{LL}
<i>MCF-7 BUS</i>	124	0.56	$4.5 \cdot 10^{-3}$
<i>MCF-7 BB</i>	94	0.34	$3.4 \cdot 10^{-3}$
<i>T47D-B1</i>	71	0.24	$3.4 \cdot 10^{-3}$
<i>T47D-B8</i>	63	0.23	$3.7 \cdot 10^{-3}$
<i>EVSA-T</i>	57	0.28	$4.9 \cdot 10^{-3}$
<i>RT-112</i>	43	0.16	$3.7 \cdot 10^{-3}$

LL = promedio de lesiones letales por célula

P_{LL} = *probabilidad de lesión letal*

Los datos recogidos en la Tabla 4.2 demuestran con claridad que la mayor parte de las lesiones iniciales inducidas por la radiación pueden ser correctamente reparadas (o al menos toleradas) por las células. La probabilidad de que una rdc se convierta en lesión letal oscila entre 3 y 5 por cada 1000 rdc producidas. Estos datos apoyan la hipótesis de que la rdc de DNA es una lesión subletal (Paretzke, 1987; Charlton, 1989; Barendsen, 1992; Barendsen, 1993) y que la eficacia de los procesos de reparación a nivel molecular es elevada. Comoquiera, por otra parte, que las células difieren entre sí en la capacidad de reagrupamiento de rdc, parece importante estudiar si las diferencias encontradas correlacionan de alguna forma con los parámetros indicativos de radiosensibilidad celular intrínseca.

4.4.4 Relación entre parámetros de cinética de reagrupamiento de rdc de DNA y parámetros de radiosensibilidad celular

Los datos existentes en la literatura acerca de la relación entre radiosensibilidad intrínseca y cinética de reagrupamiento de rdc de DNA nos han permitido sistematizar la información disponible en la forma siguiente:

i) Líneas celulares tumorales humanas: los dos primeros trabajos en los que se analiza este problema haciendo uso de líneas celulares establecidas procedentes de procesos neoplásicos humanos datan de 1988 (Kelland, 1988; Schwartz, 1988). Ambos trabajos desarrollaron una metodología común (filtración tras elución neutra) para el estudio de la inducción y el reagrupamiento de rdc de DNA y los resultados obtenidos son también coincidentes: la mayor supervivencia celular (células más radiorresistentes) se encontró asociada a una más alta velocidad de reagrupamiento de las rdc. Sin embargo, como los tiempos permitidos para que tuviese lugar el proceso de reagrupamiento estuvieron comprendidos entre 0.5 y 2 horas como máximo, fué imposible demostrar para el proceso de reagrupamiento el carácter bifásico y confirió cierta imprecisión a los datos relativos a la velocidad de reagrupamiento. En cualquier caso, los resultados obtenidos parecen

consistentes y dejan clara la existencia de una cierta relación de dependencia entre velocidad de reagrupamiento de rdc y radiosensibilidad celular. A un resultado similar han llegado Giaccia y col (Giaccia, 1992) estudiando 5 líneas celulares tumorales humanas procedentes de neoplasias de vías aerodigestivas superiores y una de fibroblastos humanos normales. La existencia de una relación de proporcionalidad entre radiosensibilidad celular (estimada en base a los valores de D_0 y FS2) y velocidad del proceso de reagrupamiento (medida como porcentaje de DNA reagrupado tras una hora de incubación) parece, por tanto, evidente.

Recientemente, Whitaker y col. (Whitaker, 1994) han analizado el proceso de reagrupamiento de rdc de DNA en células tumorales humanas y han demostrado que las curvas experimentales se ajustan a un modelo bifásico. Los autores encuentran valores para el tiempo medio del proceso de reagrupamiento rápido comprendidos entre 18 y 60 minutos, mientras que los correspondientes al componente lento oscilan entre 38 y 445 minutos. El procedimiento experimental llevado a cabo por Whitaker se inicia con la irradiación de las células a la temperatura de 37 °C, con lo que se permite que tenga lugar la reparación durante el tiempo de irradiación. Ahora bien, como el porcentaje de rdc de DNA reagrupadas durante este tiempo puede ser importante (Ruiz de Almodóvar, 1994b), los valores correspondientes al tiempo medio del componente rápido pueden resultar afectados de cierto error. Ello explicaría, tal vez, por qué Whitaker y col. no han encontrado relación estadísticamente significativa entre radiosensibilidad celular intrínseca (FS2) y tiempo medio del proceso rápido de reagrupamiento, relación que sí estadísticamente significativa cuando se comparan entre sí los valores correspondientes a los tiempos medios del proceso lento de reagrupamiento y los parámetros de radiosensibilidad celular (FS2).

ii) Modelos celulares compuestos por una línea celular original y, derivada de ella, otra(s) modificada(s): El interés despertado por los estudios relativos al esclarecimiento de las bases moleculares de la radiosensibilidad celular ha llevado a diversos autores a relacionar la capacidad de reagrupamiento de rdc de DNA y la velocidad de este proceso con

los parámetros que caracterizan la radiosensibilidad celular. Para ello, en numerosas ocasiones se ha elegido como modelo de estudio el constituido por células de mamífero (tumoraes o no) cuya sensibilidad, tanto celular como molecular, se ha comparado con la que se observa en células clonadas a partir de las originales. Dentro de este grupo de trabajos se incluyen los relativos al estudio de células CHO y sus mutantes *xrs1* y *xrs5* (Dahm-Daphi, 1993; Iliakis, 1992). Aunque en los estudios realizados parece demostrarse la existencia de diferencias en el nivel de rdc reagrupadas al cabo de cierto tiempo de reparación (Dahm-Daphi, 1993), o en la velocidad del proceso de reagrupamiento se lleva a cabo (Iliakis, 1992), el análisis de los resultados ha llevado a considerar como factor determinante de las diferencias en radiosensibilidad la diferente estructura de la cromatina (Dahm-Daphi, 1993) o la distinta magnitud del daño residual, dependiente a su vez de la dosis administrada (Iliakis, 1992).

Utilizando células V79 y sus mutantes XR-V9B (Zdzienicka, 1992) o XR-V15B (Kysela, 1993b) se ha demostrado, por otra parte, que la magnitud del daño residual (rdc no reagrupadas) tras cierto tiempo de incubación (Zdzienicka, 1992; Kysela, 1993b), así como la menor proporción de rdc reagrupadas por el componente rápido del proceso cinético (Kysela, 1993b), pueden resultar elementos determinantes de las diferencias observadas en la radiosensibilidad celular entre la línea original y las líneas mutadas. Estos hallazgos no han podido ser confirmados, sin embargo, por Cheong y col. (Cheong, 1992). Utilizando células V79 y sus mutantes *irs-1*, *irs-2* e *irs-3*, Cheong ha podido demostrar la similitud de las cinéticas de reagrupamiento de rdc existente entre las células originales y las mutadas, sin que haya sido posible explicar los cambios en radiosensibilidad celular observados en función del tiempo de "parada" en la fase G2 del ciclo mitótico. Los autores no excluyen la posibilidad de que la mayor radiosensibilidad se asocie con alguna deficiencia genética desconocida que afecte a los mecanismos de reparación del DNA y por tanto a la fidelidad con la que este proceso se lleva a cabo (Debenham, 1988). Este mismo argumento ha sido utilizado por McMillan y col (McMillan, 1990), quienes utilizando una línea celular

procedente de un carcinoma de vejiga humano (MGH-U1), y derivada de ella, la mutante radiosensible S40b, han postulado que las diferencias en radiosensibilidad deben estar determinadas por diferencias en la capacidad de reparación de las lesiones moleculares radioinducidas. Utilizando este mismo modelo tumoral, Powell y col. (Powell, 1992) han demostrado que las diferencias en radiosensibilidad tienen como base diferencias en la fidelidad con la que el proceso de reparación se lleva a cabo.

Por último, Iliakis y col (Iliakis, 1990), estudiando la línea celular de embrión de rata REC y comparando ésta con la REC transformada por los oncogenes H-ras y v-myc (REC 3.7), línea altamente resistente a la radiación ionizante, han sugerido como explicación para las diferencias en radiosensibilidad, la disminución de la "fijación" de las lesiones potencialmente letales durante el retraso mitótico de las células (parada en G1 o G2, inducida por la radiación). Cheong y col. (Cheong, 1993), profundizando en el estudio realizado por Iliakis y col. (Iliakis, 1990) sobre el mismo modelo celular, han demostrado que las células REC 3.7 desarrollan radiorresistencia a lo largo de la fase S del ciclo mitótico y continúan siendo significativamente radiorresistentes en la última fase del ciclo celular.

iii) Células procedentes de pacientes afectados de diversas enfermedades: Existe un grupo de enfermedades en las que, por razones no bien conocidas, junto con la sintomatología clínica dominante que afecta al paciente, aparecen determinados trastornos que inciden sobre la radiosensibilidad celular. Una relación de tales enfermedades se ha recogido en el punto iv del apartado 4.3.5. En general, la base molecular de la radiosensibilidad ha sido esclarecida y en la mayor parte de las ocasiones ésta se ha relacionado con algún defecto en la capacidad de reparación de las lesiones que se producen en el genoma celular. Excelentes revisiones de este problema han sido realizadas por Bohr y col. (Bohr, 1987) y Ross y col. (Ross, 1992), entre otros.

Consecuencia de las investigaciones realizadas son las siguientes hipótesis:

1) la base molecular de la radiosensibilidad incrementada en las células AT parece estar en relación con: a) la falta de fidelidad en el proceso de reagrupamiento de rdc (Debenhan, 1987; Peacock, 1989); b) el mayor nivel de lesiones residuales medidas tras irradiación a baja tasa de dosis (Blöcher, 1991).

2) Los estudios realizados sobre células procedentes de pacientes afectados de la enfermedad de Alzheimer, por el contrario, no han permitido demostrar con claridad cual es la razón por la que estas células tienen incrementada su sensibilidad a las radiaciones ionizantes. En efecto, tanto el nivel de daño inicial radioinducido como la capacidad de reparación de rdc en estas células, no han detectado diferencias que correlacionen con la sensibilidad. Se piensa, por ello (Tobi, 1993), que la reparación equivocada o la no reparación de algunas rdc críticas pueden constituir la base de tales diferencias.

3) Distintas líneas celulares derivadas de pacientes afectados de leucemia han sido estudiadas por Evans y col. (Evans, 1993) habiéndose podido demostrar, en estas células, la existencia de un defecto en la capacidad de reagrupamiento de rdc de DNA inducidas por la radiación. El reagrupamiento de rdc de DNA puede estar relacionado con los procesos de recombinación. Evidencias que parecen confirmar esta relación han surgido del estudio de los resultados experimentales obtenidos de líneas celulares deficientes en recombinación, líneas que a menudo presentan un defecto en el reagrupamiento de rdc (Ho, 1975; Budd, 1982; Resnick, 1976). En este sentido, Hannan y col. (Hannan, 1991) han demostrado, sobre fibroblastos procedentes de pacientes afectados de linfoma no-Hodgkin, la mayor sensibilidad de estas células a la radiación ionizante sobre todo cuando la irradiación se realiza a baja tasa de dosis y Fitzgerald y col (1990) han descrito un aumento significativo de la radiorresistencia celular como consecuencia de la expresión de determinados oncogenes transfectados en células de mamífero irradiadas a baja tasa de dosis. Para Hannan y col.

(Hannan, 1991) resulta atractiva la hipótesis de que la irradiación a baja tasa de dosis pueda inducir la expresión temporal de determinados genes relacionados con la radiorresistencia/reparación del DNA, mecanismo que si fuese defectivo en las células procedentes de pacientes afectos por los desórdenes anteriores, podría explicar la mayor predisposición a padecer enfermedades malignas de los mismos.

4.4.5 ¿Hay una ley general?

Los resultados obtenidos por diversos investigadores en el estudio de la relación existente entre radiosensibilidad celular y cinética de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena de DNA son coincidentes cuando el modelo utilizado ha sido el constituido por líneas celulares tumorales humanas. Nuestros propios resultados confirman estos hallazgos. En efecto, entre la radiosensibilidad celular (expresada en términos de fracción de supervivencia a 2 Gy (FS2) o a través del componente α de la curva de supervivencia) y el tiempo medio del componente rápido del proceso de reagrupamiento hemos demostrado la existencia de un fuerte nivel de correlación (Tabla 3.50 y figuras 3.41 y 3.42). Además, entre los parámetros celulares α y D_q y el tiempo medio del proceso lento de reagrupamiento existe también un relación estadísticamente significativa (figuras 3.43 y 3.44). Finalmente, el nivel de correlación estadística se encuentra próximo a la significación cuando se comparan FS2 y $t_{1/2}$ lento (Núñez, 1994).

Podemos establecer, por lo tanto, de una manera firme, que Radiosensibilidad y Velocidad de Reagrupamiento de rdc son magnitudes inversamente relacionadas entre sí. En efecto, en células tumorales humanas, la mayor sensibilidad a la radiación ionizante se asocia de una manera sistemática con un tiempo medio de semirreagrupamiento de las rdc de DNA más prolongado.

4.5 EL DAÑO RESIDUAL COMO DETERMINANTE DE RADIOSENSIBILIDAD

Para explicar las diferencias en radiosensibilidad encontradas entre tumores humanos, Steel y col. (Steel, 1989c) han propuesto las siguientes hipótesis:

1) La radiación induce dos tipos de lesión: reparable y no reparable. Ambos tipos de lesión son más frecuentes en células tumorales humanas radiosensibles que en células radio-resistentes.

2) A bajos niveles de dosis ($D \leq 2$ Gy) así como cuando se irradia a baja tasa de dosis, la mayoría de las lesiones reparables se reparan adecuadamente. La magnitud de la recuperación celular, medida mediante experimentos de fraccionamiento de la dosis o por clonogenicidad celular tras irradiación a baja tasa de dosis, refleja con exactitud la incidencia de lesiones reparables.

3) La radiosensibilidad a baja dosis está principalmente determinada por la inducción de lesiones no reparables.

La desaparición casi completa del daño inducido por la radiación sobre el DNA celular ha sido documentada en numerosos estudios y, a menudo, se ha encontrado que, tras un cierto intervalo de tiempo de reparación, el daño residual no puede ser detectado por encima del "ruido" de fondo (magnitud de la lesión encontrada en células no sometidas a irradiación). Sin embargo, Cassoni y col. (Cassoni, 1992) han detectado rupturas dobles de cadena de DNA residuales en cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón humano y han descrito una asociación entre radiosensibilidad y mayor nivel de daño residual. Blöcher y col. (Blöcher, 1991), Hannan y col. (Hannan, 1991) y Dahm-Daphi y col. (Dahn-Daphi, 1993) han publicado parecidas conclusiones. Finalmente, utilizando la técnica de electroforesis de campo pulsado resulta posible detectar daño residual tras irradiación a muy baja tasa de

dosis (Ruiz de Almodóvar, 1994b).

Para verificar la hipótesis de que el daño residual medido por PFGE refleja de alguna manera la magnitud de las lesiones irreparables hemos realizado los experimentos descritos en el apartado 3.6. Teniendo en cuenta que el reagrupamiento de rdc de DNA se completa durante las 15 primeras horas siguientes a la irradiación (Dahm-Daphi, 1993), en nuestro trabajo hemos considerado como daño residual el valor de la FAE a las 24 horas de la irradiación.

Procediendo así, no hemos podido demostrar que exista una relación significativa entre el daño residual y la FS2. Tampoco hemos podido demostrar la existencia de diferencias en daño residual entre distintas líneas celulares cuando los experimentos se realizan utilizando irradiación a baja tasa de dosis (Núñez, 1994). Estos resultados concuerdan con estudios previos (Ruiz de Almodóvar, 1994a) realizados por nosotros mismos en la línea celular RT-112, en los cuáles pudimos comprobar que los cambios observados en la supervivencia celular tras irradiación a diferente tasa de dosis, no pueden ser explicados por el nivel final de rdc no reagrupadas. De manera análoga otros autores (Koval, 1988) han concluido que células de distinta radiosensibilidad presentan el mismo nivel de rdc no reagrupadas tras prolongada incubación.

Desde nuestro punto de vista, los resultados descritos, podrían ser reflejo de la falta de sensibilidad de la técnica de PFGE para evaluar daño residual a las dosis utilizadas. En apoyo de esta hipótesis, se puede citar el trabajo de Wurm y col. (Wurm, 1994), que han encontrado cierto nivel de relación entre radiosensibilidad y daño residual cuando las dosis de radiación se sitúan por encima de un determinado valor (claramente superior al utilizado por nosotros). De cualquier forma, la inexistencia de relación entre radiosensibilidad celular y daño residual refleja la incapacidad del método físico de separación de fragmentos de DNA ensayado para distinguir reparación de reparación equivocada (Ruiz de Almodóvar, 1994b).

4.6 VIRTUALIDAD DE LOS PARAMETROS MOLECULARES DE RADIO-SENSIBILIDAD

Los resultados obtenidos en este trabajo nos han permitido demostrar que entre el parámetro celular (FS2) que caracteriza a la radiosensibilidad celular intrínseca y el parámetro molecular que cuantifica la magnitud del daño inicial inducido por la radiación sobre el DNA (Número de rdc de DNA inducidas por unidad de dosis y por unidad de DNA), existe una relación lineal. Por otra parte, también hemos podido demostrar la relación de dependencia existente entre FS2 y tiempo medio del proceso rápido de reagrupamiento de las cadenas de DNA. Parece lógico pensar, por ello, que ambos parámetros moleculares de radiosensibilidad deban estar relacionados entre sí. Para comprobar esta hipótesis hemos realizado los cálculos que se resumen en la Tabla 3.52. El coeficiente de correlación lineal obtenido ($r = 0.952$), así como la significación estadística del mismo ($p = 0.004$), nos permiten afirmar que las células que sufren mayor daño inicial por unidad de dosis (células más sensibles) presentan, también, un tiempo de semirreagrupamiento mayor. Este resultado aparece representado en forma gráfica en la figura 4.7 y nos induce a pensar que tanto la magnitud del daño inicial inducido por la radiación sobre las células como la capacidad celular para reparar ese daño, deben estar determinados por una causa común.

La investigación de los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes a nivel de la estructura de la cromatina ha arrojado alguna luz sobre aspectos que consideramos básicos. En este sentido, Oleinick y col. (Oleinick, 1984) han publicado que la respuesta (inducción y reparación de lesiones) de la molécula de DNA a la radiación gamma del ^{60}Co es dependiente de la conformación de la cromatina. Los resultados obtenidos por estos autores demuestran que:

1) Durante la interfase, las secuencias activas del DNA de células V79-379 (fibroblastos de pulmón de hamster) resultan ser más sensibles que las inactivas en lo que a

la inducción de rupturas simples de cadena de DNA se refiere. Este mismo resultado se ha observado también en la metafase cuando el DNA aparece organizado en forma de cromosomas.

2) La reparación de rupturas de cadena en DNA compacto (secuencias inactivas) es más lenta en células en metafase que en células en interfase.

3) Dentro del periodo correspondiente a la metafase la reparación es más rápida en las regiones activas del DNA que en secuencias inactivas del mismo.

Los hallazgos anteriores permiten suponer la existencia de un cierto nivel de relación entre la magnitud del daño inicial radioinducido y la proporción de genes activos existentes en cada tipo celular. Por esta razón, las células con mayor contenido en secuencias de DNA activas deben ser más propensas a sufrir lesiones moleculares por radiación. Estas diferencias de radiosensibilidad a nivel molecular se detectan incluso cuando la molécula de DNA se organiza en forma de cromosoma, situación en la que se siguen observando regiones de DNA hipersensibles a la radiación.

Es poco probable, sin embargo, que el daño directo producido por la radiación sea responsable de las diferencias encontradas. Como es bien sabido, sólo parte del daño inicial radioinducido -alrededor del 30%- se debe a la acción directa de la radiación. La mayor parte de las lesiones radioinducidas son debidas al ataque de radicales libres, principalmente OH[•] (Roots, 1972). Por ello, parece más probable que las diferencias en radiosensibilidad celular derivadas de lesiones producidas sobre secuencias de DNA activas e inactivas sean debidas a la diferente accesibilidad de los radicales activos a la estructura cromatínica.

La hipótesis de accesibilidad diferencial puede explicar también la mayor rapidez de la reparación del DNA perteneciente a secuencias activas y sugiere que las regiones menos

accesibles de la cromatina pueden ser resultar críticas para la supervivencia de las células irradiadas (Oleinick, 1984). Esta hipótesis puede complicarse aun más si se consideran los distintos tipos de lesión producida por la radiación sobre el DNA. En efecto, parece lógico pensar que lesiones tipo LMDS deben ser producidas por acción directa y deben ser más difícilmente reparables. En cualquier caso, cabe decir que las características conformacionales o estructurales que determinan la accesibilidad de la cromatina, tanto al ataque de los radicales libres como a los sistemas enzimáticos implicados en la reparación celular, aunque no son todavía bien conocidas, parecen estar involucradas en los procesos de lesión y reparación.

Warters y col. (Warters, 1992) sugieren, en este sentido, que la formación de rdc de DNA puede variar en función de los cambios de concentración local alrededor de la cromatina de proteínas nucleares solubles y de compuestos no proteicos dotados de grupos sulfhidrilos, sustancias que, como es sabido, ejercen un efecto protector y pueden influir en la producción de rdc de DNA tanto en cromatina condensada como en cromatina relajada. Los citados autores coinciden con Oleinick en la consideración de la estructura y del grado de compactación de la cromatina nuclear como factores determinantes del daño producido inicialmente sobre las células.

Para estudiar la influencia de la organización del DNA sobre la magnitud del daño inicial radioinducido, Elia y col. (Elia, 1992) han estudiado el proceso de formación de rdc de DNA en células CHO-WBL intactas, en el núcleo aislado de dichas células y en el DNA extraído de las mismas y purificado después mediante un proceso secuencial de proteínas nucleares no-histonas en primer lugar e histonas en segundo término. Los resultados obtenidos por Elia han permitido establecer con claridad el papel protector de la estructura de la cromatina (y sobre todo de las proteínas tipo histonas) en la magnitud de las lesiones inducidas por unidad de dosis de radiación. Parece claro, por otra parte, que este papel protector debe estar basado en la neutralización de los radicales libres producidos por la

acción indirecta. Los autores sugieren que regiones diferentes del DNA pueden ser más o menos susceptibles a rdc de DNA en función de la protección que las proteínas nucleares le proporcionen. La heterogeneidad en la respuesta del DNA a la radiación como consecuencia de diferencias en el microambiente celular o en la organización del genoma celular añade, por todo ello, un elemento de complejidad mayor al problema que estamos estudiando.

De cualquier manera, la hipótesis de que tanto el parámetro que permite evaluar la producción de rdc de DNA por unidad de dosis, como el que mide la capacidad celular para reagrupar las rdc radioinducidas, (diferentes en células tumorales de distintos orígenes) estén relacionados con la estructura y la conformación de la cromatina resulta sumamente atractiva. En nuestra opinión, la búsqueda de algún tipo de relación entre los dos parámetros moleculares que, en principio, determinan la radiosensibilidad celular constituye un objetivo básico de la investigación radiobiológica, sobre el que nos proponemos trabajar en el futuro.

4.7. LOS ENSAYOS BIOLÓGICOS COMO TESTS PREDICTIVOS DE RADIOCURABILIDAD

En la actualidad, se encuentran sometidos a investigación un buen número de ensayos biológicos con la finalidad esencial de establecer sobre bases racionales la respuesta de los tumores humanos a la radiación. De particular interés han resultado ser, hasta ahora, los siguientes: la determinación del grado de oxigenación tumoral (Höckel, 1993; Olive, 1993), el conocimiento del tiempo de duplicación potencial de las células del tumor (Begg, 1990) y la radiosensibilidad celular intrínseca (Peters, 1992; West, 1992). Es probable que alguno de estos ensayos pueda servir, eventualmente, como instrumento útil para predecir adecuadamente la respuesta tumoral al tratamiento. Dispondríamos así de lo que Fletcher (Fletcher, 1989) denomina el "santo grial" de la radioterapia, es decir, de una herramienta de gran utilidad en clínica para la planificación y/o la individualización terapéuticas. Los

estudios experimentales que han demostrado que la FS2 medida "in vitro" puede predecir la respuesta tumoral a la irradiación son numerosos. Algunos de ellos se revisan a continuación.

Rofstad y col (Rofstad, 1989), utilizando como modelo tumoral cinco líneas celulares xenógrafas de melanoma humano han comparado la radiorrespuesta a la irradiación fraccionada "in vivo" con la radiosensibilidad "in vitro". La respuesta del tumor al tratamiento resultó estar directamente relacionada con los parámetros que describen la pendiente inicial de la curva de supervivencia celular "in vitro" (FS2 o α). Posteriormente, Rofstad ha demostrado que la radiocurabilidad tumoral medida como la dosis de radiación necesaria para conseguir el control local del 50% de los tumores tratados, correlaciona estadísticamente con la FS2 medida in vitro sobre tres líneas xenógrafas de melanoma humano (Rofstad, 1991).

Bristow y col. (Bristow, 1990a), utilizando ocho líneas celulares tumorales murinas de distinto tipo histológico, han comparado la radiosensibilidad "in vitro" con la respuesta a la irradiación fraccionada in vivo. El parámetro FS2, que fué un buen discriminante de la radiosensibilidad celular intrínseca, se encontró estrechamente relacionado con la supervivencia celular observada tras 10 fracciones de 2 Gy administradas in vivo (Bristow, 1990b).

West y col. (West, 1993) han publicado, recientemente, un estudio sobre la utilidad del ensayo de clonogenicidad tumoral en la predicción de la respuesta de 88 mujeres afectas de carcinoma de cuello uterino que fueron tratadas con irradiación radical y seguidas con posterioridad durante un período mínimo de dos años. Se incluyeron en el análisis mujeres con tumores en estadios I, II y III. Valores fiables de FS2 se obtuvieron en el 73% de los casos estudiados. Al término del estudio, la FS2 de 53 pacientes que estaban vivas y libres de enfermedad resultó ser significativamente inferior a la observada en las 22 pacientes en

las que el tratamiento no fué eficaz ($p < 0.01$). Por otra parte, las enfermas con tumores radiorresistentes ($FS2 > 0.40$) mostraron, a los tres años de seguimiento, un nivel de supervivencia significativamente menor ($p = 0.002$) que el encontrado para las pacientes afectas de tumores radiosensibles ($FS2 \leq 0.40$). Los resultados publicados recientemente por West y col. demuestran, por tanto, con claridad que la estimación de la radiosensibilidad celular intrínseca de los tumores humanos en la vía preconizada por Courtenay (Courtenay, 1978), puede convertirse en un factor predictivo de radiocurabilidad de considerable importancia clínica.

4.8. ¿PUEDE UN TEST MOLECULAR DE RADIOSENSIBILIDAD SUSTITUIR AL ENSAYO CLONOGÉNICO?

Los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo permiten destacar la importancia de los parámetros de radiosensibilidad celular y su papel como elementos predictivos de la respuesta de los tumores a la irradiación fraccionada. En el curso de su desarrollo creemos que han quedado suficientemente demostrados:

1) la relación fenomenológica existente entre la lesión molecular radioinducida, expresada en forma de número de rupturas dobles de cadena de DNA producidas por unidad de dosis de radiación y por unidad de DNA y los parámetros celulares de radiosensibilidad intrínseca, $FS2$ y α .

2) la asociación estadísticamente significativa existente entre el parámetro $t_{1/2}$ del proceso rápido de reagrupamiento de las cadenas de DNA rotas por la radiación y $FS2$ y α .

3) la relación establecida entre dos parámetros moleculares específicos de radiosensibilidad, el $t_{1/2}$ del proceso rápido de reagrupamiento de rupturas dobles de cadena

y el número de rdc/Gy/200 Mpb.

Parece evidente, por lo tanto, que, en las líneas celulares procedentes de cáncer humano utilizadas en este trabajo, la ruptura doble de cadena de DNA es determinante de la radiosensibilidad celular. Dos diferentes ensayos basados en la lesión molecular pueden ser utilizados con fines predictivos:

a) La inducción de rupturas dobles de cadena de DNA en función de la dosis de radiación administrada;

b) el estudio de la cinética de reagrupamiento de rdc de DNA producidas por una dosis única de radiación.

Las consideraciones anteriores nos han inducido a pensar, por último, que el ensayo molecular puede sustituir al ensayo clonogénico con ciertas ventajas. En este sentido, un examen crítico de la metodología de una y otra técnica permite formular las siguientes reflexiones hipotéticas:

i) probablemente, el paso más complejo para ensayar la radiosensibilidad de las células de los tumores humanos sea la preparación de una suspensión monocelular a partir del espécimen tumoral. Este paso, obligado para ambos procedimientos, parece en principio menos crítico en el ensayo molecular. En efecto, el hecho de que junto a células individualizadas (tras el tratamiento mecánico y enzimático de la pieza tumoral) queden incluidos en la suspensión agregados celulares (circunstancia que es fuente de error en el ensayo clonogénico), carece de importancia en el ensayo molecular puesto que en éste no es necesario contar de manera precisa las células sembradas ni el punto final del ensayo se basa en el número de células supervivientes;

ii) teniendo en cuenta el tiempo necesario para realizar uno y otro ensayo es clara la ventaja del test molecular (4 días frente a 3 semanas);

iii) el test molecular puede realizarse en condiciones no estériles, requisito indispensable cuando la radiosensibilidad celular se ensaya mediante el test de clonogenicidad celular;

iv) como los resultados obtenidos en este trabajo hacen uso de la medida de la actividad de ^{14}C -Timidina incorporada al DNA de las células, es indudable que este procedimiento no es directamente aplicable a piezas tisulares procedentes de tumores humanos. Sin embargo, recientes publicaciones han demostrado la posibilidad de cuantificar la lesión molecular radioinducida sobre el DNA a través de la tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio (Rosemann, 1993; Rosemamm, 1994).

Utilizando un sistema de análisis de imagen hemos estudiado, finalmente, la inducción de rdc de DNA en la línea celular A2780 (Valenzuela, 1994). Los ensayos de clonogenicidad tumoral realizados sobre esta línea celular de cáncer de cérvix humano (figura 4.10) nos han permitido conocer los parámetros de radiosensibilidad celular intrínseca. Dichos parámetros,

$$FS2 = 57.0 \pm 2.4$$

$$\alpha = -0.354 \pm 0.035$$

$$\beta = -0.020 \pm 0.004$$

y los correspondientes al estudio de inducción de rupturas dobles de cadena de DNA cuantificados por análisis de imagen de la tinción del gel con bromuro de etidio se ofrecen en la figura 4.11.a. El análisis cuantitativo de los resultados, realizado mediante la aplicación del modelo matemático descrito en el apartado 2.8.2 (figura 4.11b), ha permitido concluir que la línea celular A2780 sufre 1.77 ± 0.12 rdc/Gy/Mpb.

En las figuras 4.12a y 4.12b se puede comprobar, en relación con todo ello, la relación existente entre FS2 y daño inicial inducido. El hecho de que el punto experimental correspondiente al ensayo estudiado mediante análisis de imagen se ajuste adecuadamente a la línea de regresión existente entre ambas magnitudes entendemos que refuerza nuestro pensamiento inicial. Es posible, por ello, que podamos confirmar en el futuro la veracidad de las hipótesis planteadas.

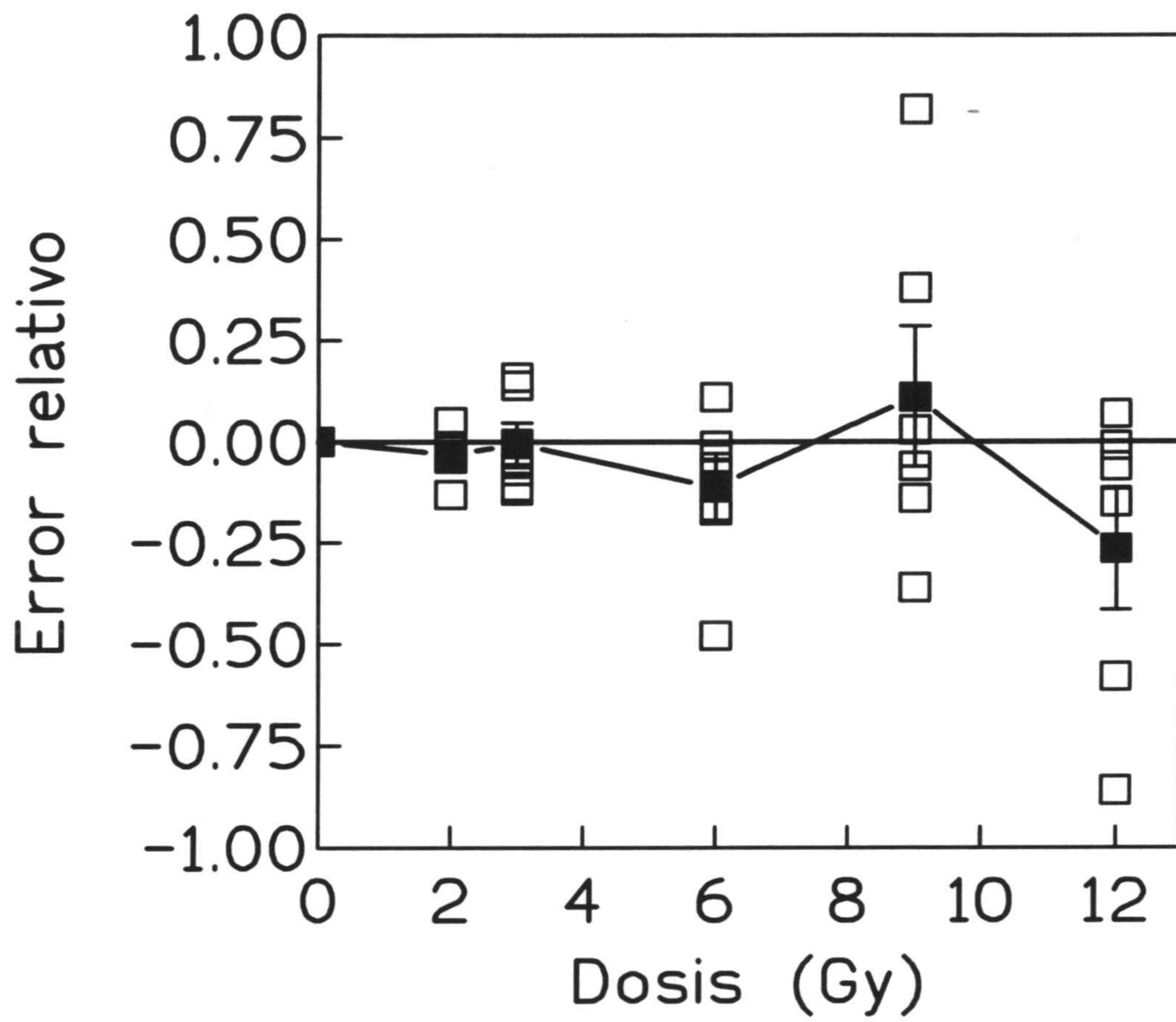


Figura 4.1 Error relativo de los puntos experimentales de supervivencia celular. Modelo lineal-cuadrático

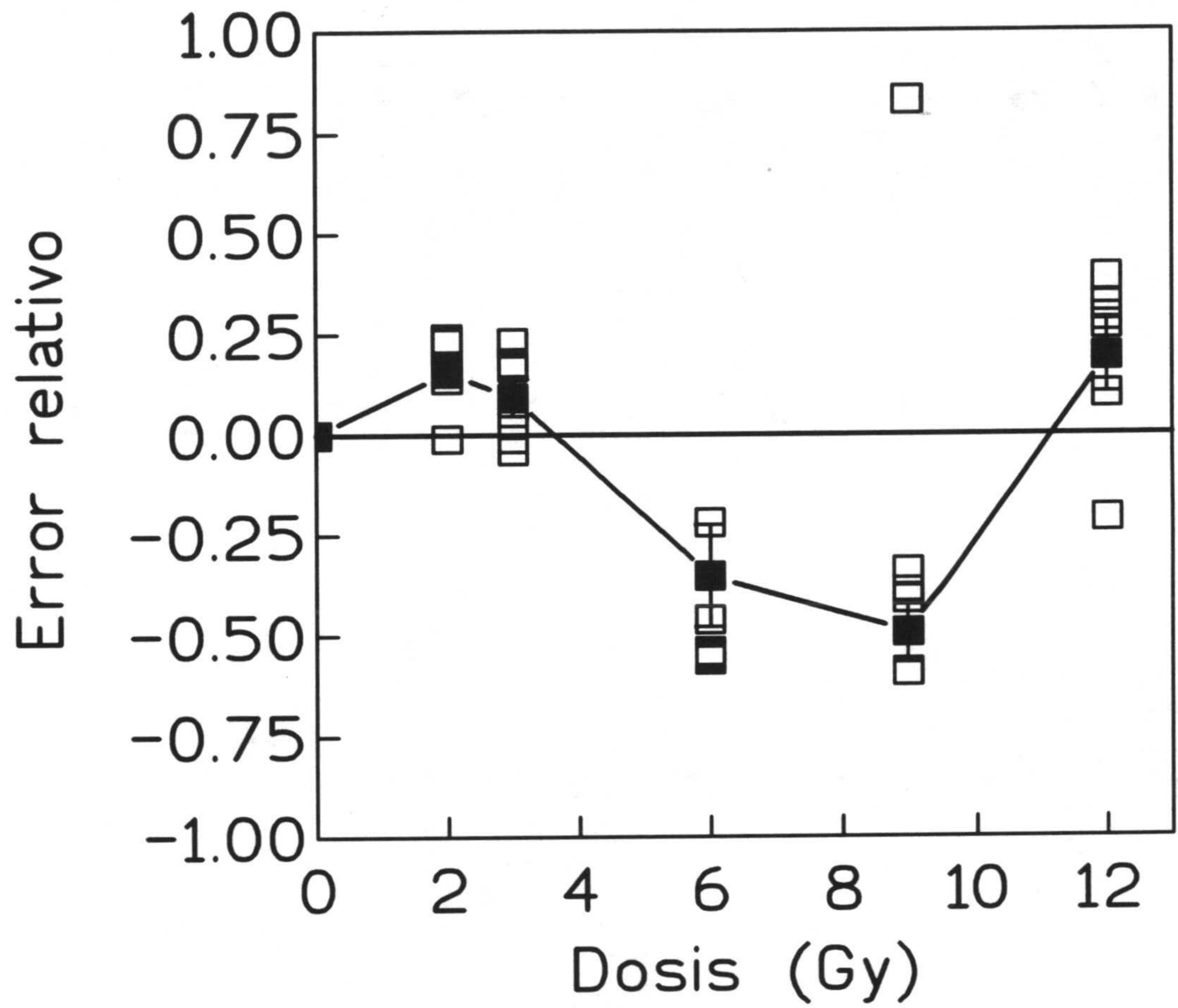


Figura 4.2 Error relativo de los puntos experimentales de supervivencia celular. Modelo de múltiples blancos

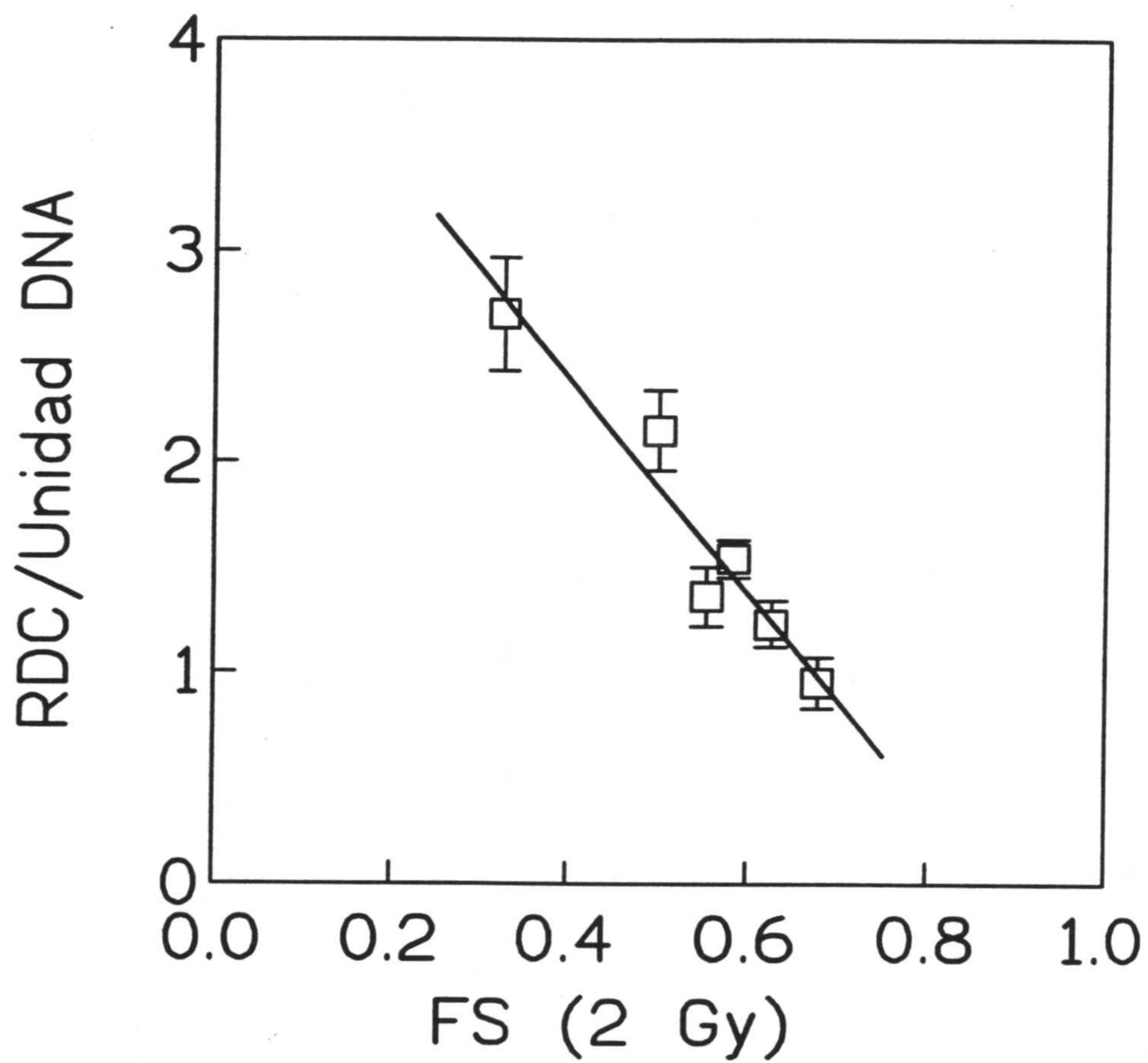


Fig. 4.3 *Relación entre el número de rupturas dobles de cadena de DNA y el parámetro FS2 de la curva de supervivencia celular*

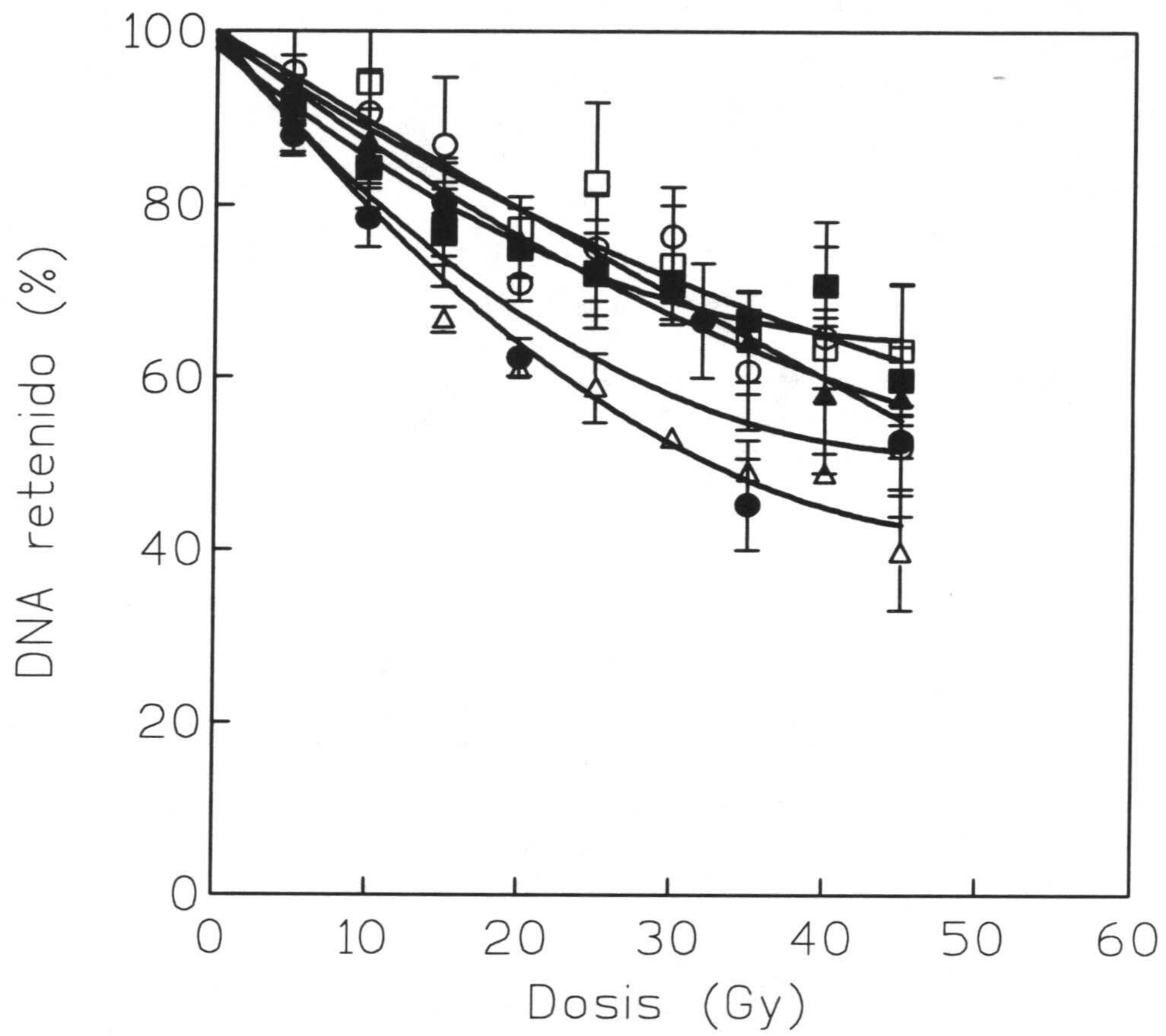


Figura 4.4 Fracción de actividad retenida en los pocillos tras electroforesis de campo pulsado. Se incluyen todos los experimentos.

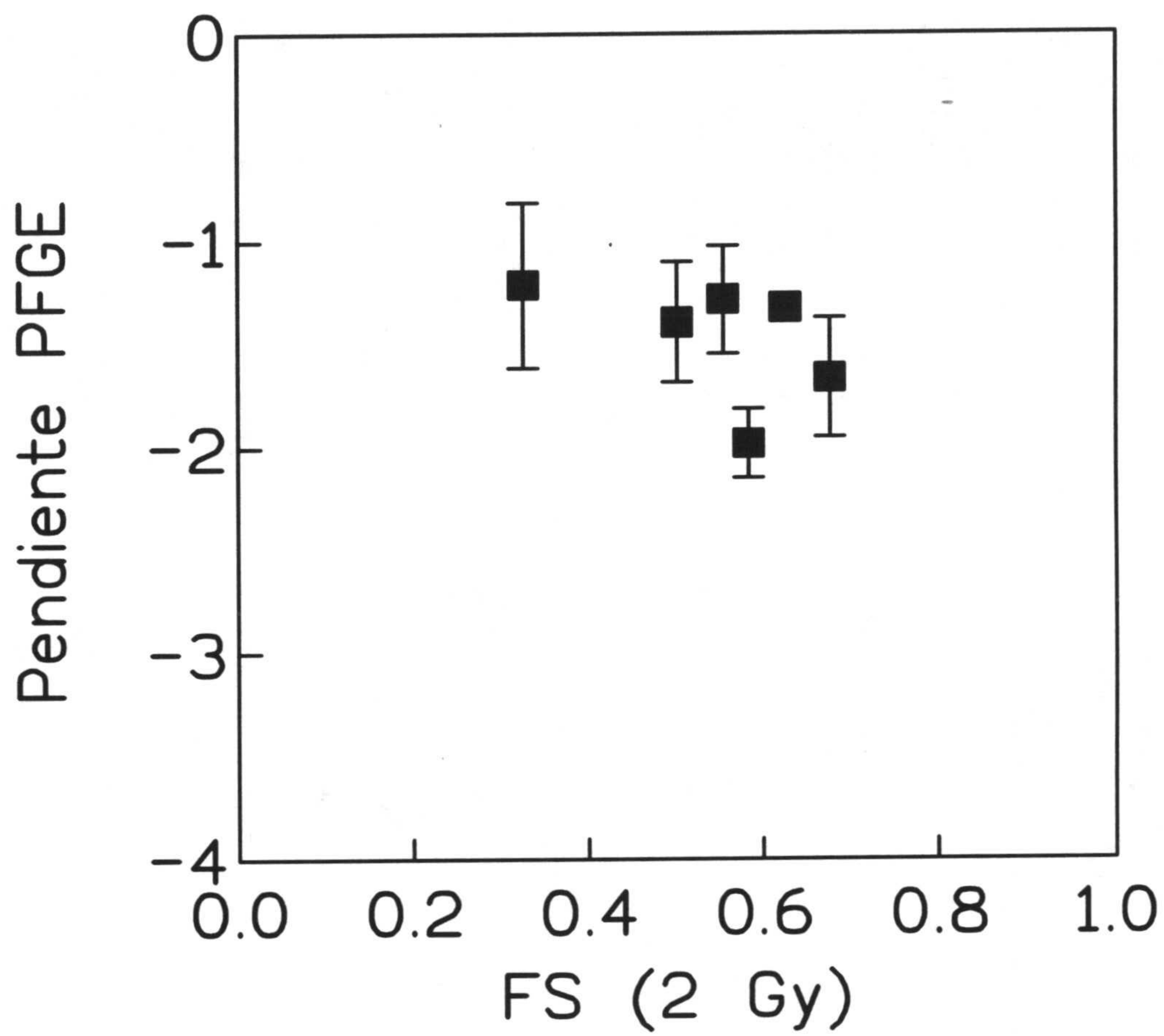


Figura 4.5 Representación gráfica de las pendientes de extracción de DNA en función de la fracción de supervivencia celular tras irradiación a 2 Gy.

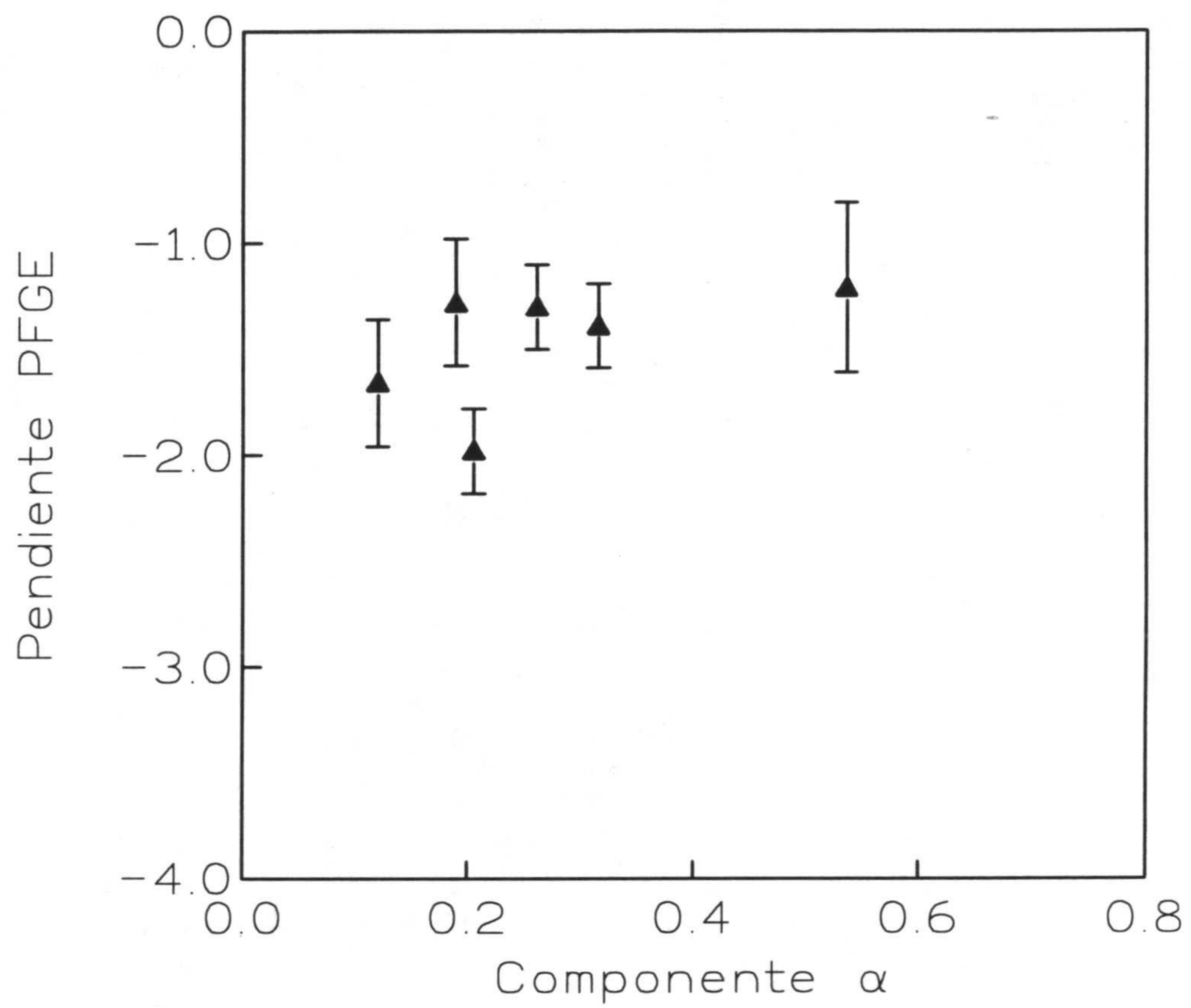


Figura 4.6 Representación gráfica de las pendientes de extracción de DNA en función del componente alfa de la curva de supervivencia.

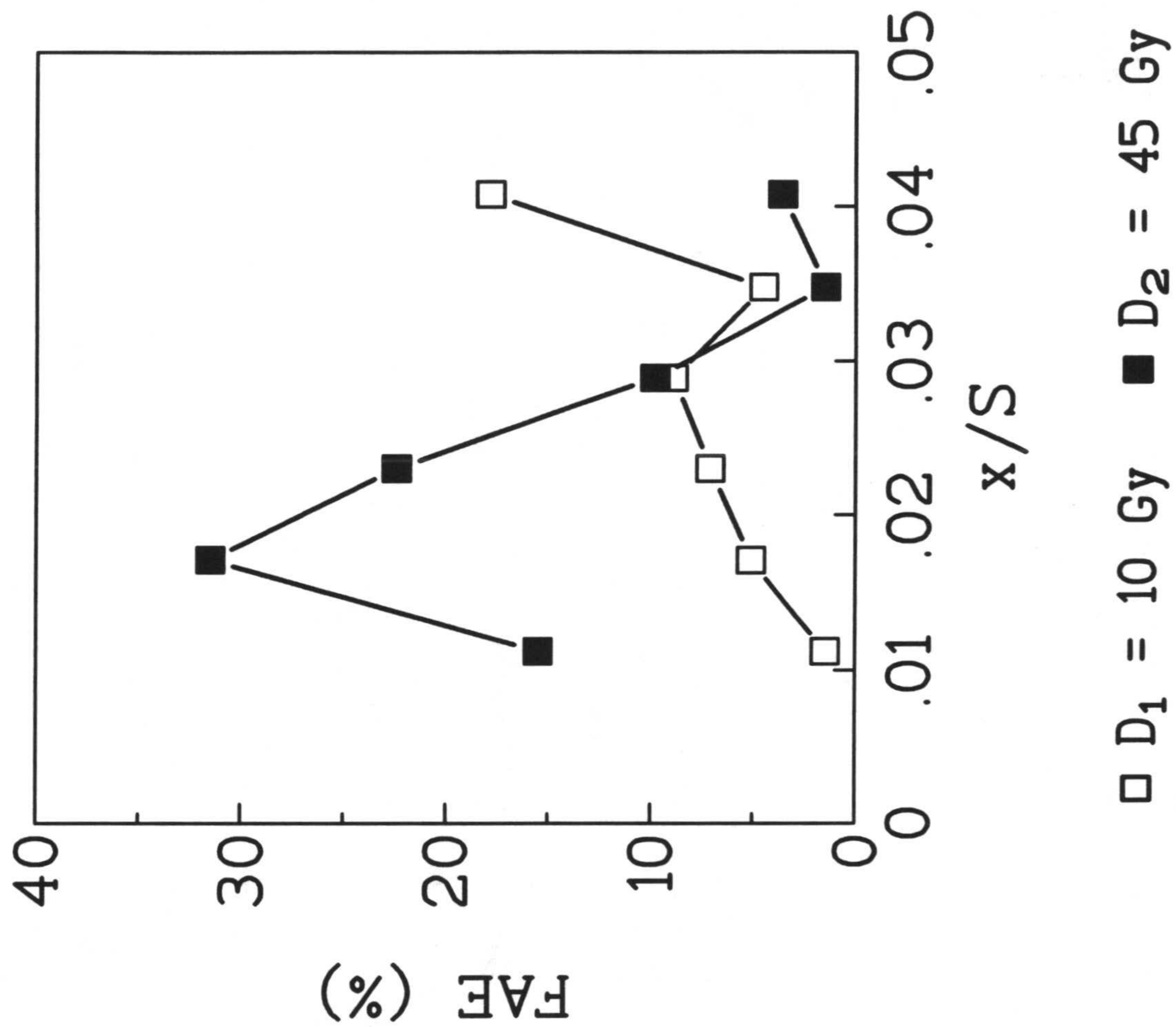


Figura 4.7 Frecuencia de distribución del tamaño de fragmentos de DNA tras irradiación celular a dosis de 10 Gy y 45 Gy

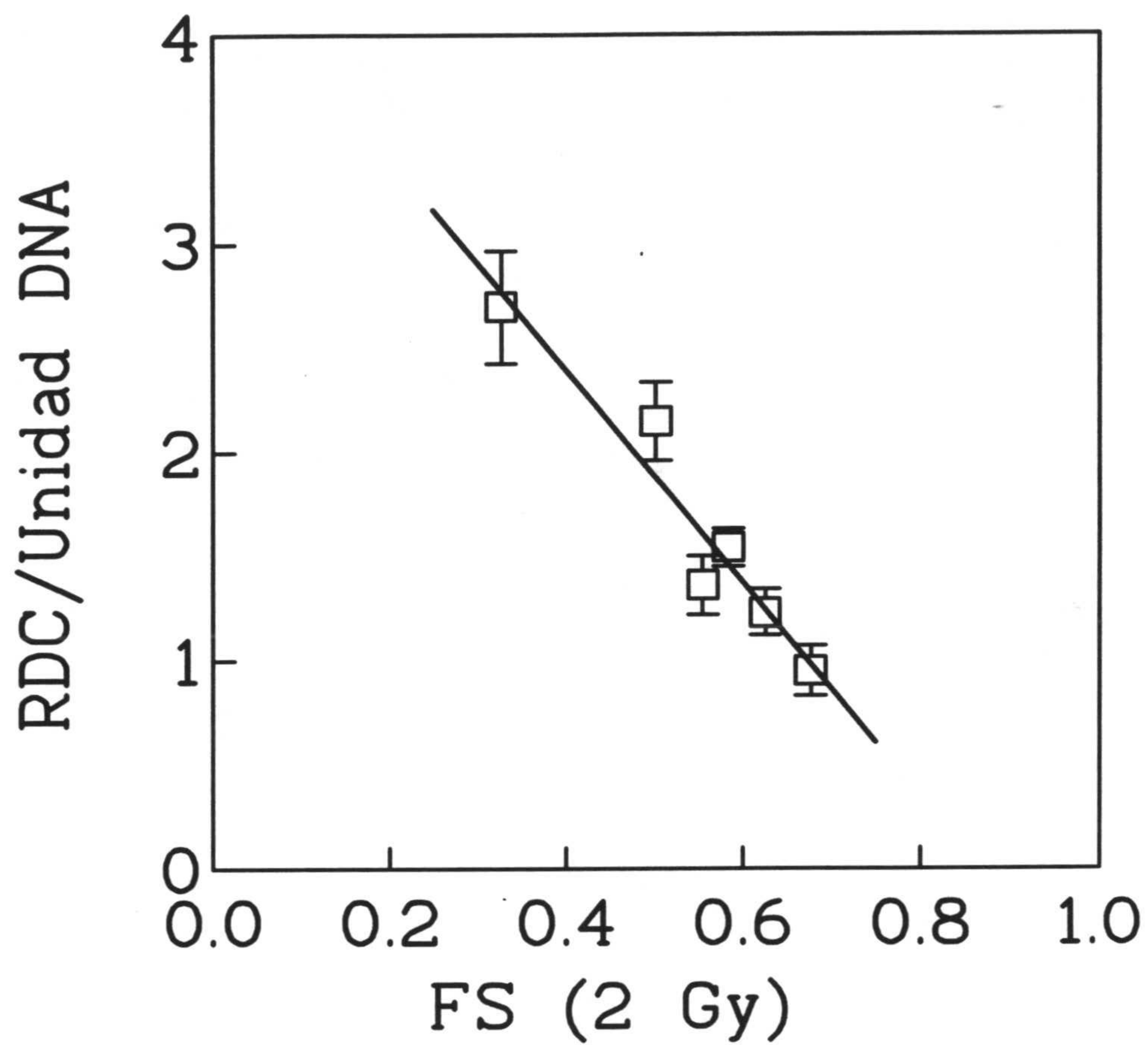


Fig. 4.8 *Relación entre número de rupturas dobles de cadena de DNA y el parámetro FS2 de la curva de supervivencia celular*

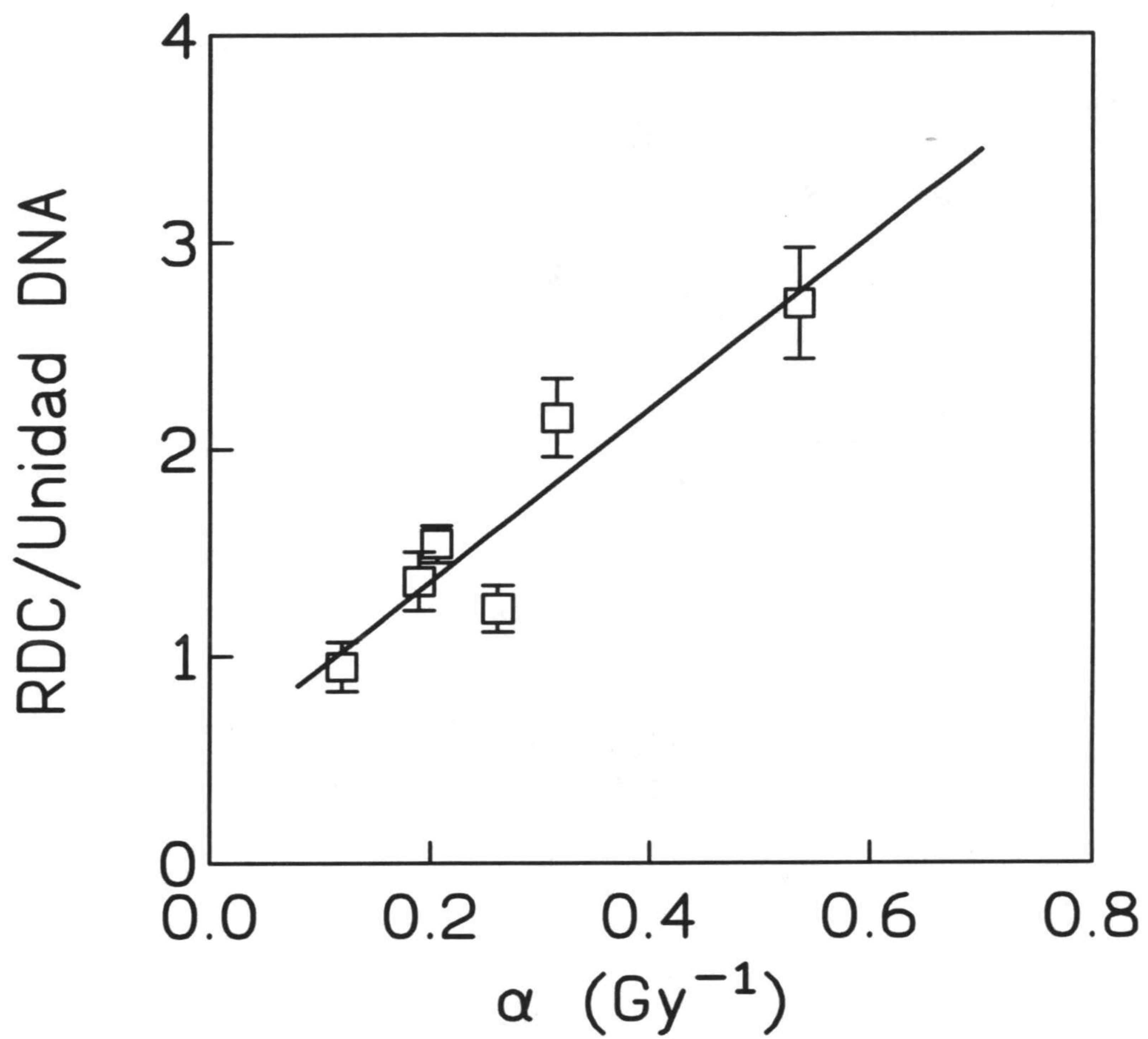


Figura 4.9 Relación entre RDC de DNA por unidad de dosis y unidad de DNA y el componente alfa de la curva de supervivencia.

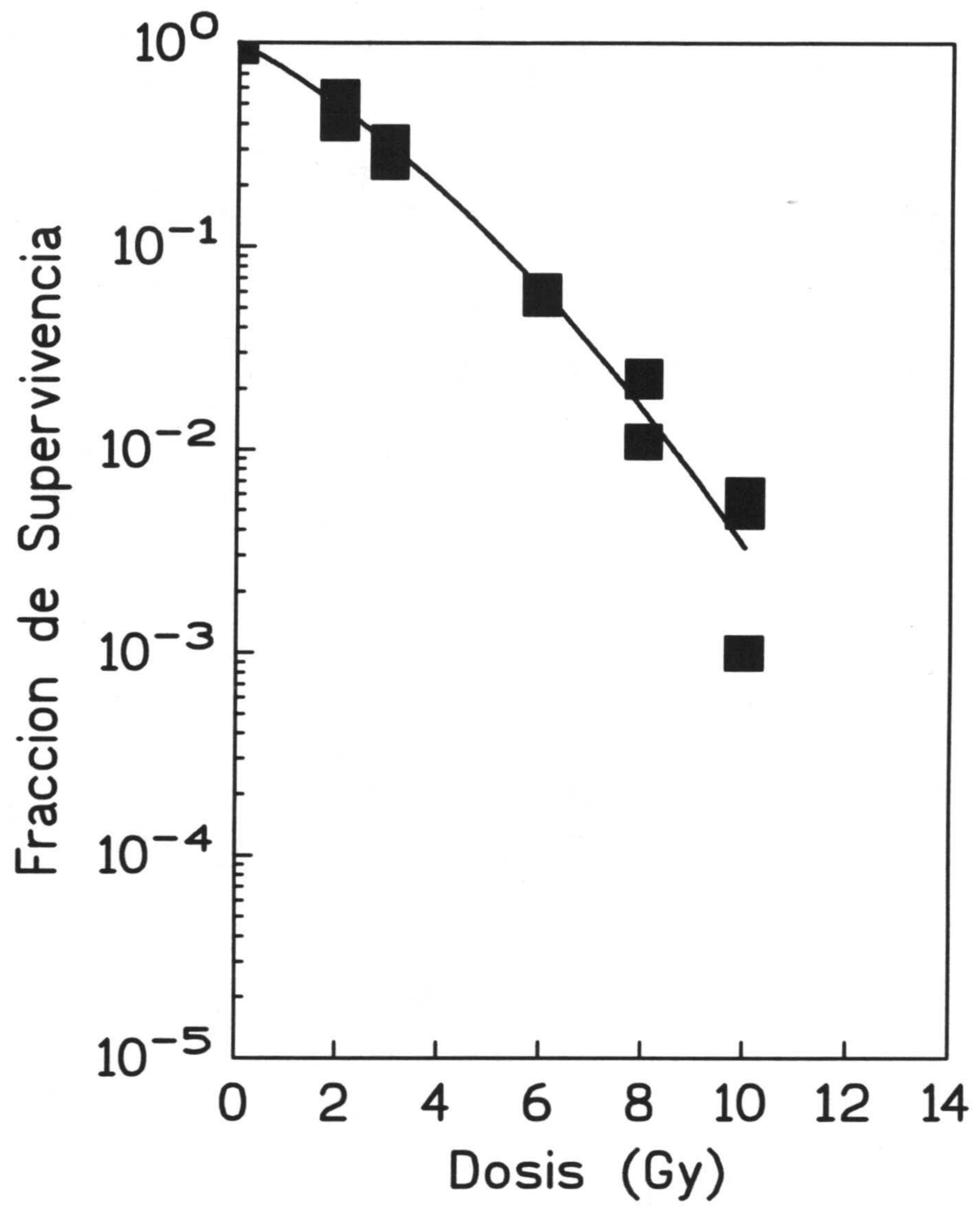


Figura 4.10 Curva de supervivencia celular frente a la radiación. Línea celular A2780

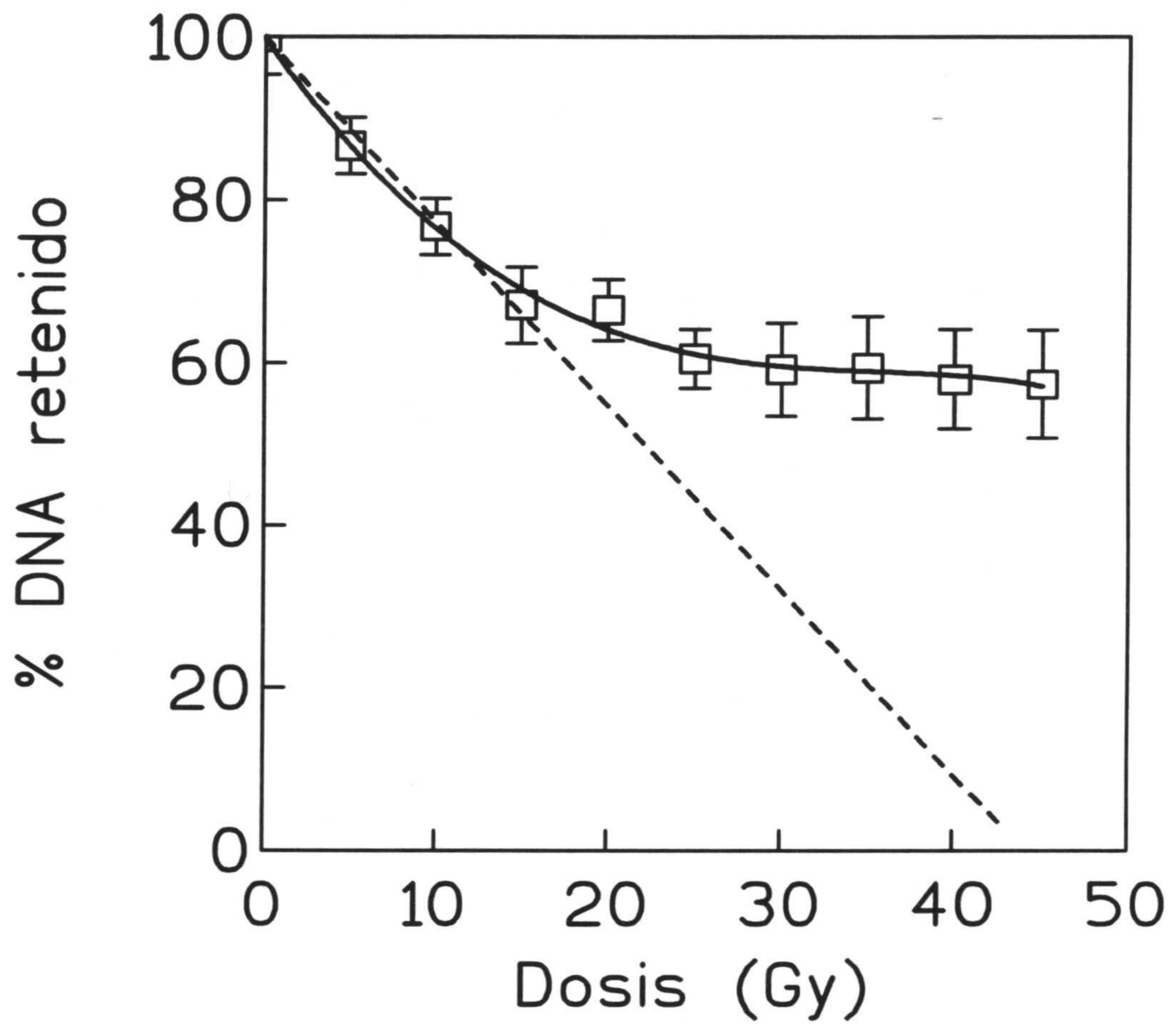


Figura 4.11a Fracción de DNA retenido en el pocillo tras irradiación celular a diferentes dosis. Línea celular A2780

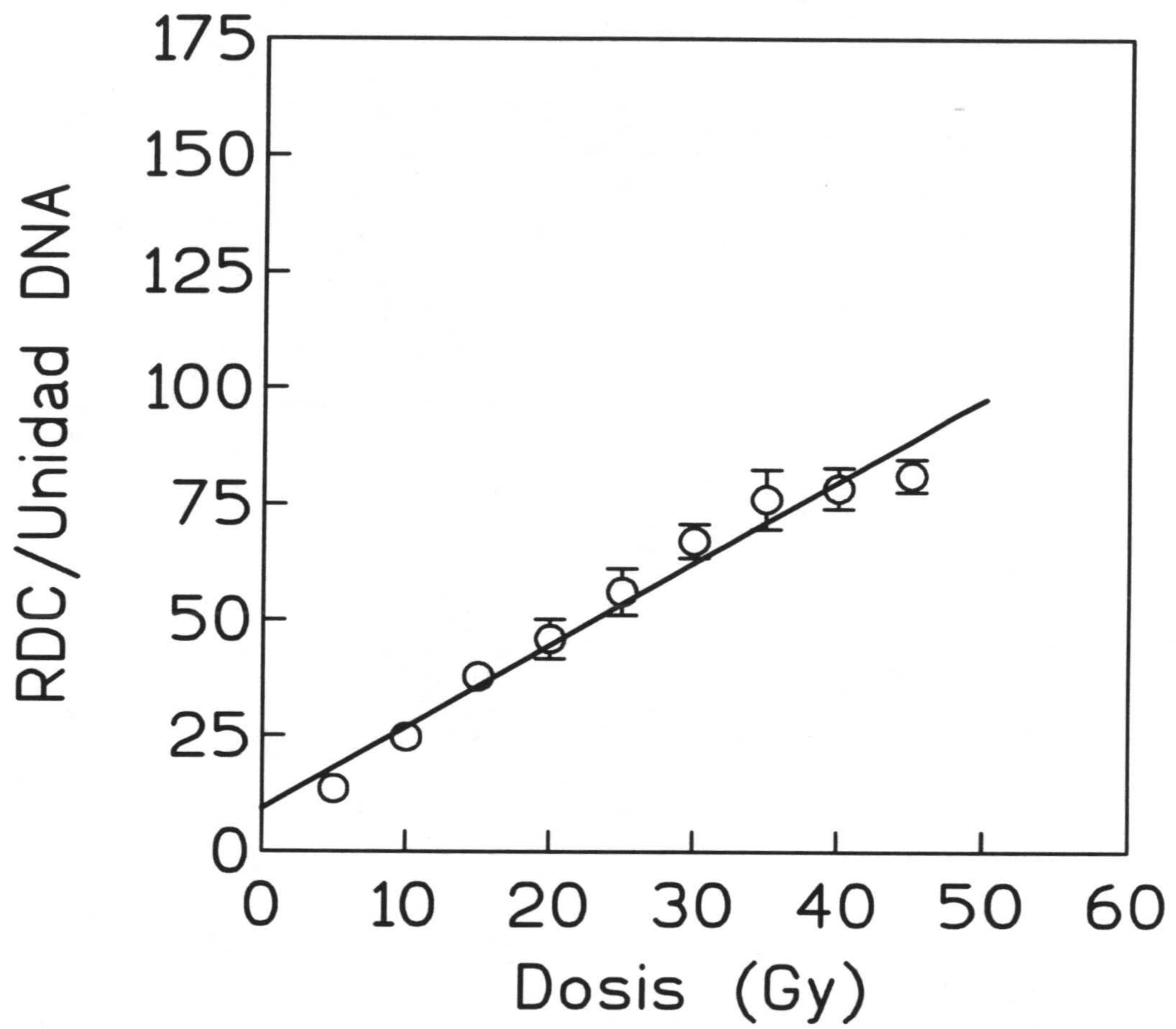


Figura 4.11b Número de rupturas dobles de cadena de DNA inducidas tras irradiación celular a diferentes dosis. Línea celular A2780

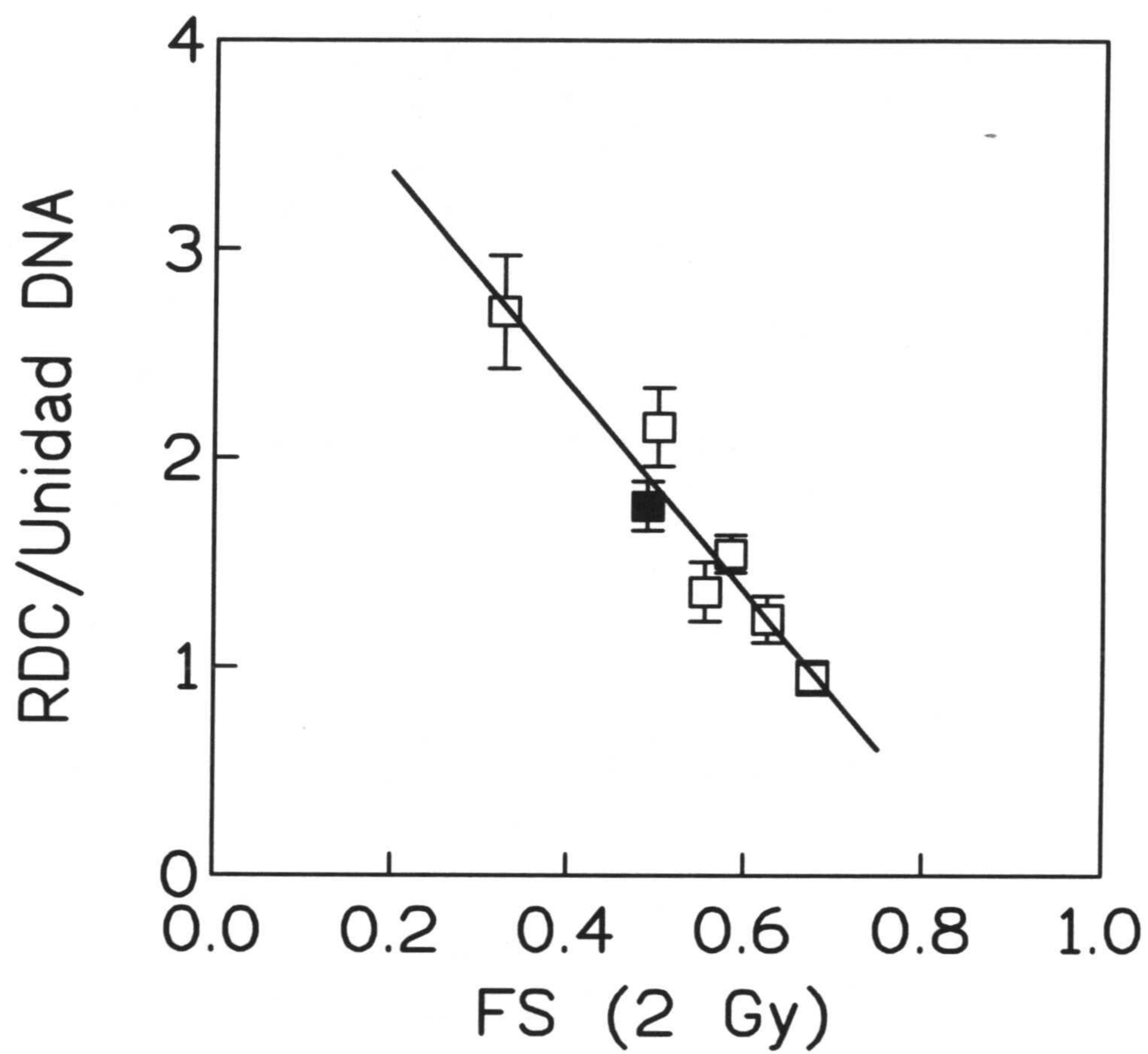


Figura 4.12 Relación entre número de RDC/Gy/200 MBP y fracción de supervivencia a 2 Gy.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

El análisis y discusión críticos de los resultados del presente estudio y su comparación con los publicados en la literatura científica sobre el tema objeto de nuestra investigación, nos han permitido formular, entre otras, las siguientes conclusiones:

1) Las líneas celulares tumorales humanas ensayadas en el presente estudio así como sus respectivos clones, MCF-7 (MCF-7 BUS / MCF-7 BB), T47D (T47D-B1 / T47D-B8), EVSA-T y RT-112, han demostrado poseer características proliferativas e indicadores de hormonodependencia propios. Habiéndose demostrado, por otra parte, que su radiosensibilidad relativa y los parámetros moleculares que definen ésta son diferentes, las citadas líneas deben considerarse como modelos tumorales distintos en los estudios de radiosensibilidad.

2) En términos generales, el nivel de radiosensibilidad celular observado para las líneas celulares descritas puede considerarse intermedio respecto de los publicados por otros autores. MCF-7 BUS y RT-112 han resultado ser, en este sentido, las líneas celulares más sensible y resistente a la radiación, respectivamente.

3) Elementos definidores de la radiosensibilidad de las líneas celulares ensayadas han resultado ser: i) a nivel celular, FS2 y el componente alfa de la curva de supervivencia; ii) a nivel molecular, el número de rdc de DNA / unidad de dosis / unidad DNA, por un lado, y el componente rápido del proceso de reagrupamiento de las rdc de DNA, por otro.

4) Para la definición de los parámetros de radiosensibilidad antes descritos ha sido necesario validar previamente el ajuste de las curvas experimentales dosis-respuesta de las líneas celulares descritas a un modelo matemático determinado. De los modelos ensayados

(L-Q y MB), el ajuste al modelo L-Q ha demostrado estar asociado con el menor error.

5) Para bajas dosis de radiación ($0 < D < 12$ Gy), el componente α de las curvas de supervivencia ha resultado estar en estrecha correlación con el parámetro FS2. Ello indica, evidentemente: i) que el coeficiente α es determinante en la radiosensibilidad celular para los niveles de dosis considerados; ii) que el coeficiente α constituye, asimismo, un elemento indicativo de gran valor para discernir la severidad de las lesiones radioinducidas sobre el genoma celular en tales niveles de dosis.

6) En el análisis del proceso de lesión molecular inducida sobre el genoma celular a que alude el punto anterior han podido ponerse de manifiesto, en el curso de nuestro trabajo de investigación, los siguientes hechos: i) la relación existente entre número de rdc de DNA y dosis de radiación es de carácter lineal; ii) la inducción de rdc de DNA por unidad de dosis, constante para la totalidad de las líneas celulares ensayadas, puede considerarse como un fenómeno invariante del proceso dosis de radiación / lesión molecular radioinducida sobre el genoma.

7) Comoquiera, por otra parte, que entre la frecuencia y/o el número de rdc de DNA / Unidad Dosis / Unidad DNA y la fracción de supervivencia celular a la radiación (FS2) se ha encontrado una relación de dependencia definida, parece claro que la supervivencia celular, aunque influida por factores distintos (otros tipos de lesión, reparación defectuosa) está ciertamente relacionada con el daño inicial producido sobre el genoma. Esta cuestión, sumamente polémica en la literatura, constituye hoy un campo de estudio apasionante en la biología de la radiación.

8) El análisis del proceso de reparación de las lesiones inducidas sobre el genoma, dependiente del tiempo y medido mediante el cálculo de la velocidad de reagrupamiento de

las rdc de DNA, nos ha permitido determinar: i) que muchas de estas lesiones se reparan, si se permite a las células el tiempo necesario para ello; ii) que el proceso de reparación ajusta bien con un modelo biexponencial cuyos componentes, rápido y lento, traducen la existencia de mecanismos de reparación de base molecular probablemente distinta; iii) que radiosensibilidad celular ($FS2 / \alpha$) y velocidad de reagrupamiento de las rdc de DNA (componente rápido) han resultado ser magnitudes inversamente relacionadas entre sí (mayor radiosensibilidad / menor reparación).

9) No ha sido posible demostrar la existencia de una relación significativa entre lesión residual no reparada y FS2, ni hemos podido poner de manifiesto diferencias en el nivel de daño residual de las distintas líneas celulares ensayadas. Una insuficiencia relativa del método PFGE para discernir lesión residual o distinguir diferentes grados de fidelidad en el proceso de reparación, en los niveles de dosis utilizados, podría constituir la causa de esta indefinición.

10) La estrecha relación de dependencia encontrada entre los dos parámetros moleculares básicos de radiosensibilidad detectados en el presente estudio (número de rdc / unidad de dosis / unidad DNA y componente rápido del proceso de reagrupamiento de tales lesiones) induce a considerar que ambos procesos (lesión y reparación) deben estar influidos por un factor común. A título de hipótesis, no de conclusión, y de acuerdo con la situación actual de la investigación sobre este punto, se puede sugerir que el factor común antes mencionado podría estar representado por la estructura de la cromatina nuclear y sus características conformacionales.

11) Demostrada la importancia clínica de la determinación del parámetro de radiosensibilidad celular intrínseca (FS2) y teniendo en cuenta la relación de dependencia observada entre los valores de FS2 y los parámetros moleculares de radiosensibilidad (rdc

/ DNA y componente rápido del proceso de reparación) en las líneas ensayadas, parece indudable que, en el campo de la predicción de la respuesta tumoral a esquemas de irradiación fraccionada, el ensayo molecular podría sustituir con ventaja al ensayo clonogénico.

12) Las razones que justifican la sustitución de un ensayo por otro son de variado orden: i) el ensayo molecular se puede realizar en menos tiempo y está sujeto a menor número de problemas técnicos que el ensayo clonogénico; ii) de acuerdo con resultados preliminares propios, el ensayo molecular puede quedar considerablemente simplificado, sin detrimento de su fiabilidad, introduciendo en la metodología experimental el análisis por imagen de la distribución de fragmentos de DNA en geles preparados para tal fin.

6. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

AGER, D.D., DEWEY, W.C. (1990)

Calibration of pulsed-field gel electrophoresis for measurement of DNA double-strand breaks.
Int. J. Radiat. Biol., 58: 249-259.

AHN, S.Y., NEVALDINE, B., HAHN, P.J. (1991)

Direct measurement by pulsed-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.

AHNSTRÖM, G. (1985)

Comment on paper by Radford.
Int. J. Radiat. Biol., 48: 51-52.

ALAOUI, M.A., BATIST, G., LEHNERT, S. (1992)

Radiation-induced damage to DNA in drug and radiation-resistant sublines of a human breast cancer cell line.
Radiat. Res., 129: 37-42.

ALLEY, M.C., SCUDEIRO, D.A., MONKS, A. (1988)

Feasibility of drug screening with panels of human tumour cell lines using a microculture tetrazolium assay.
Cancer Res., 48: 589-601.

ANAND, R., SOUTHERN, E.M. (1990)

Pulsed field gel electrophoresis. En: "Gel Electrophoresis of Nucleic Acids. A Practical Approach", second edition, D Rickwood and B. d. Hames eds., IRL Press at Oxford University Press, United States by Oxford University Press, New York, pp. 101-123.

ARLETT, C.F. (1979)

Survival and mutation in gamma irradiated human cell strains from normal or cancer-prone individuals. En: "Proceeding 6th International Congress Of Radiation Research", Okada, s., Imamura, M., Terasina, T., Yamaguchi, H., eds., Japanese Association of Radiation Research, Tokyo, pp. 596-602.

BARENDSSEN, G.W. (1979)

Influence of radiation quality on the effectiveness of small doses for induction of reproductive death and chromosome aberrations in mammalian cells.
Int. J. Radiat. Biol., 36: 49-63.

BARENDSSEN, G.W. (1992)

Radiation-induced DNA damage in relation to linear and quadratic terms of dose-effect relationship for cell reproductive death.

Br. J. Radiat., suppl. 24: 53-56.

BARENDSSEN, G.W. (1993)

Sublethal damage and DNA double strand breaks similar RBE-LET relationships: evidence and implications.

Int. J. Radiat. Biol., 63 (3): 325-330.

BARTON, D.F., DAVID, F.N. (1956)

Some notes on ordered random intervals.

J. R. Stat. Sec., B18: 79-99.

BEGG, A.C., McNALLY, N.J., SHRIEVE, D.C., KÄRCHER, H. (1985)

A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample.

Cytometry, 6: 620-626.

BEGG, A.C., HOFLAND, I., MOONEN, L., BARTELINK, H., SCHRAUB, S., BONTEMPS, P., LE FUR, R., VAN DEN BOGAERT, W., CASPERS, R., VAN GLABBEKE, M., HORIOT, J.C. (1990)

The predictive values of cell kinetic measurements in a European trial of accelerated fractionation in advanced head and neck tumours: an interim report.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 19: 1449-1453.

BENDER, M.A., GOOCH, P.C. (1962)

The kinetics of X-ray survival of mammalian cell in vitro.

Int. J. Radiat. Biol., 5: 133-145.

BENDER, M.A., GRIGGS, H.F., BEDFORD, J.S. (1974)

Mechanisms of chromosomal aberration production III. Chemicals and ionizing radiation.

Mutat. Res., 23: 197-212.

BLÖCHER, D. (1982a)

DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of X-rays. Determination of induced breaks by centrifugation at reduce speed.

Int. J. Radiat. Biol., 42: 317-328.

BLÖCHER, D., POHLIT, W. (1982b)

Double strand-breaks in Ehrlich ascites tumor cells at low dose of X-rays II. Can cell death be attributed to double strand-break ?

Int. J. Radiat. Biol., 42: 329-338.

BLÖCHER, D., EINSPENNER, M., ZAJACKOWSKI, J. (1989)

CHEF electrophoresis, a sensitive technique for the determination of DNA double-strand breaks.

Int. J. Radiat. Biol., 56: 437-448.

BLÖCHER, D. (1990)

CHEF-electrophoresis a linear induction of double-strand breaks corresponds to a non-linear fraction of extracted DNA with dose.

Int. J. Radiat. Biol., 57: 7-12.

BLÖCHER, D., SIGUT, D., HANNAN, M.A. (1991)

Fibroblast from ataxia telangiectasia (AT) and AT heterozigotes show an enhanced level of residual DNA double-strand breaks after low dose-rate gamma-irradiation as assayed by pulsed field gel electrophoresis.

Int. J. Radiat., 60 (5): 791-802.

BOHR, V.A., PHILIPS, D.H., HANAWALT, P.C. (1987)

Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome.

Cancer Res., 47: 6426-6436.

BOHR, V.A., EVANS, M.K., FORNACE, A.J. (1993)

A DNA repair and its pathogenetic implication.

Laboratory Investigation, 61 (2): 143-161.

BOOTHMAN, D.A., BOUVARD, I., HUGHES, E.N. (1989)

Identification and characterization of X-ray-induced proteins in human cells.

Cancer Res., 49: 2871-2878.

BRADFORD, M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding.

Anal. Biochem., 72: 248-254.

BRADLEY, M.O., KOHN, K.W. (1979)

X-ray induced DNA double-strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution.

Nucl. Acids Res., 7: 793-804.

BRIEGES, B.A., HARNDEN, D.G. (1982)

"Ataxia-Telangiectasia: A Molecular Link Between Cancer, Neuropathology and Immune Deficiency", Bridges, B.A., Harndenn, D.G., eds., John Wiley, Chichester.

BRISTOW, R.G., HARDY, P.A., HILL, R.P. (1990a)

Comparison between in vitro radiosensitivity and in vivo radioresponse of murine tumor cell lines. I: parameters of in vitro radiosensitivity and endogenous cellular glutathione levels.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 18: 133-145.

BRISTOW, R.G., HILL, R.P. (1990b)

Comparison between in vitro radisensitivity 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: 331-345.

BROUWNER, M., SMETS, L.A., JONGSMA, A.P.M. (1983)

Isolation and characterization of subclones of L1210 murine leukemia with different sensitivities to various cytotoxic agents.

Cancer Res., 43: 2884-2888.

BRYANT, P.E., BLOCHER, D. (1980)

Measurement of the kinetics of DNA double-strand break repair in Ehrlich ascites tumour cells using the unwinding method.

Int. J. Radiat. Biol., 38: 335-347.

BRYANT, P.E. (1984)

Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using Pvu II and Bam HI: evidence for the double strand break origin of chromosomal aberrations.

Int. J. Radiat. Biol., 46: 57-65.

BRYANT, P.E., WARRING, R., AHNSTROM, G. (1987)

DNA repair kinetics after low doses of x-rays. A comparison of results obtained by the unwinding and nucleotide sedimentation methods.

Mutat. Res., 131: 19-26.

BRYANT, P.E. (1988)

Enzymatic restriction of mammalian cell DNA: evidence for double-strand breaks as potentially lethal lesions.

Int. J. Radiat. Biol., 48: 55-60.

BUDD, M., MORTIMER, R.K. (1982)

*Repair of double strand breaks in a temperature conditional radiation-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.*

Mutat. Res., 103: 19-24.

BUICK, N.R. (1984)

The cell renewal hierarchy in ovarian cancer. En: "Human Tumor Cloning", Sidney E. Salmon y Jeffrey M. Trent eds., Grune and Stratton, Orlando, pp.: 3-13.

BUSH, C., McMILLAN, T.J. (1993)

Micronucleus formation in human tumour cells: lack of correlation with radiosensitivity.

Br. J. Cancer, 67: 102-106.

CASSONI, A.M., McMILLAN, T.J., PEACOCK, J.M. STEEL, G.G. (1992)

Differences in the level of DNA double-strand breaks in human tumor cell lines following low dose-rate irradiation.

Eur. J. Cancer, 28: 1610-1614.

CENTER, M.S., RICHARDSON, C.C. (1970)

*An endonuclease induced after infection of *Escherichia Coli* with bacteriophage T7.l. Purification and properties of the enzyme.*

J. Biol. Chem., 245: 6285-6291.

CHADWICK, K.H., LEENHOUTS, H.P. (1981)

A molecular theory of radiation biology (Springer-Verlag, Berlin).

CHARLTON, D.E., NIKJOO, N., HUMM, J.L. (1989)

Calculation of initial yields of single and double strand breaks in cell nuclei from electron, protons and alpha particules.

Int. J. Radiat. Biol. Phys., 21: 1457-1469, 1989.

CHEONG, N., WANG, Y., JACKSON, M., ILIAKIS, G. (1992)

Radiation-sensitive irs mutants rejoin DNA double strand breaks with efficiency similar to that of parental V79 cells but show altered response to radiation-induced G2 delay.

Mutat. Res., DNA repair, 274: 111-122.

CHEONG, N., WANG, Y., ILIAKIS, G. (1993)

Radioresistance induced in rat embryo cells by transfection with the oncogenes H-ras plus v-myc is cell cycle dependent and maximal during S and G₂

Int. J. Radiat. Biol., 63(5): 623-629.

CHIU, S.M., FRIEDMAN, L.R., XUE, L.Y. OLEINICK, N.L. (1986)

Modification of DNA damage in transcriptionally active vs bulk chromatin.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 12: 1529-1532.

COLE, A., MEYN, R.E., CHEN, R., CORRY, P.M. (1980)

Mechanisms for cell injury. En: "Radiation Biology In Cancer Research", R.E. Meyn and H.R. Withers eds., Raven Press, New York, pp. 33-58.

CONGER, A.D., LUIPPOLA, H.J. (1957)

Studies on the mechanism of acquired radioresistance in cancer.

Cancer Res., 17: 897-903.

CONTOPOULOU, C.R., COOK, V.E., MORTIMER, R.K. (1987)

Analysis of DNA double-strand breakage and repair using orthogonal field alternation gel electrophoresis.

Yeast, 3: 71-76.

COOK, V.E., MORTIMER, R.K. (1991)

A quantitative model of DNA fragments generated by ionising radiation, and possible experimental applications.

Radiat. Res., 125: 102-106.

COQUERELLE, T., WEIBEZAHN, K.F., LUCKE-MUHLE, C. (1987)

Rejoining of double-strand breaks in normal human and ataxia-telangiectasia fibroblasts after exposure to 60-Co-gamma-rays, 241-Am alpha particules or bleomycin.

Int. J. Radiat. Biol., 51: 209-218.

COURTENAY, V.D., MILLS, J. (1978)

An in vitro colony assay for human tumors grown in immune-suppressed mice and treated in vivo with cytotoxic agents.

Br. J. Cancer, 37: 261-268.

COURTENAY, V.D. (1984)

A replenishable soft agar colony assay for human tumour sensitivity testing. En: "Predictive Drug Testing On Human Tumor Cells", V. Hofmann, M.E. Berens and G. Martz eds., Springer-Verlag, Berlin, pp. 19-34.

COX, R.A. (1982)

Cellular description of the repair defect in ataxia-telangiectasia. En: "Ataxia-Telangiectasia. A Molecular Link Between Cancer, Neuropathology And Immune Deficiency", Bridges, B.A., Harnden, D.G., eds., John Wiley, Chichester, pp. 141-154.

CURTIS, B.S. (1986)

Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation. A unified repair model. Radiat. Res., 106: 252-270.

DAHM-DAPHI, J., DIKOMEY, E., PYTTLIK, C., JEGGO, P.A. (1993)

Reparable and non-reparable DNA strand breaks induced by X-irradiation in CHO K1 cells and the radiosensitive mutant, XR- V15B. Part. I. X-rays.

Int. J. Radiat. Biol., 63 (5): 609-616.

DAHM-DAPHI, J., DIKOMEY, E., PYTTLIK, C., JEGGO, P.A. (1993)

Reparable and non-reparable DNA strand breaks induced by X-irradiation in CHO K1 cells and the radiosensitive mutants xrs-1 and xrs-5.

Int. J. Radiat. Biol., 64: 19-26.

DE WYNGAERT, J.K., LEITH, J.T., PECK, R.A., BLIVEN, S.F., ZEMAN, E.M., MARIONO, S.A., GLICKSMAN, A.S. (1981)

Differential RBE values obtained for mammary adenocarcinoma tumour cell subpopulations after 14.8 MeV neutron irradiation.

Radiat. Res., 88: 118-131.

DEACON, J., PECKMHAM, M.J., STEEL, G.G. (1984)

The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. Radiother. Oncol., 2: 317-323.

DEBENHAM, P.G., WEBB, M.B.T., JONES, N.J., COX, R. (1987)

Molecular studies on the nature of the repair defect in ataxia-telangiectasia and their implications for cellular radiology.

J. Cell Science, suppl. 6: 177-189.

DEBENHAM, P.G., JONES, N.J., WEBB, M.B.T. (1988)

Vector-mediated DNA double-strand break repair analysis in normal, and radiation-sensitive, Chinese hamster V79 cell.

Mutat. Res., 199: 1-9.

DEL MORAL, R., FERNANDEZ, J.C., LOPEZ-GONZALEZ, J.D., GOMEZ, M., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., OLEA, N., PEDRAZA, V. (1991)

Kinetics of cellular proliferation and hormonal receptors in EVSA-T breast cancer cell line. Rev. Esp. Fisiol., 47 (1): 25-30.

DENEKAMP, J. (1992)

In memoriam: Nicolas J. McNally (1939-1991).

Br. J. Cancer, Radiat. 24, J. Hopewell, T. Wheldon, D. Tait, R. Dale eds., London, pp. vii-xi.

DESCHAVANNE, P.J., CHAVAUDRA, N., FERTIL, B., MALAISE, E.P. (1984) *Abnormal sensitivity of some Cokaynes syndrome cell strains to UV and gamma-rays.*

Mutat. Res., 131: 61-70.

DEVLEESCHOUWER, N., OLEA, N., LECLERCQ, G., LEGROS, N., HEUSON, J.C. (1986)

Induction of progesterone receptor in an estrogen, progesterone receptor-negative breast cancer cell line. J. esteroid Biochem., 44: 365-368.

DEWEY, W.C., HOPWOOD, L.E., SAPARETO, S.A., GERWECK, L.E. (1977)

Cellular responses to combinations of hypertemia and radiation.

Radiology, 123: 463-468.

DIKOMEY, E., FRANZKE, J. (1988)

DNA denaturation kinetics in CHO cells exposed to different X-ray doses and after different repair intervals using the alkaline unwinding technique.

Radiat. Environ Biophys., 27: 29-37.

DISCHE, S. (1991)

A review of hypoxic cell radiosensitization.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 20: 147-152.

EGUCHI-KASAI, K., KOSAKA, T., SATO, K., KANEKO, I. (1991)

Reparability of DNA double-strand breaks and radiation sensitivity in five mammalian cell lines.

Int. J. Radiat. Biol., 59 (1): 97-104.

ELIA, M.C., BRADLEY, M.O. (1992)

Influence of chromatin structure on the induction of DNA double strand breaks by ionizing radiation.

Cancer Res., 52: 1580-1586.

ELIA, M.C., NICHOLL, W.W. (1993)

Application of programmable, autonomously controlled electrode (PACE) technology to the development of an improved pulsed field gel electrophoresis assay for DNA double-strand breaks in mammalian cells.

Int. J. Radiat., 63(1): 7-11.

- ELIASON, J.F., AAPRO, M.S., DECREY, D., BRINK-PETERSEN, M. (1985)**
Non-linearity of colony formation by human tumour cells from biopsy samples.
Br. J. Cancer, 52: 311-318.
- ELKIND, M.M. (1990)**
Repair processes in treatment and induction of cancer with radiation.
Cancer, 65: 2165-2171.
- EPSTEIN, L.B., JEN-TA, S., ABELE, J.S., REESE, C.C. (1980)**
Further experience in testing the sensitivity of human ovarian carcinoma cells to interferon in an in vitro semisolid agar culture system: comparison of solid and ascites forms of the tumor. En: "Cloning Of human Tumor Stem Cells", Salmon S.E. ed., Ciss, New York, pp. 277-290.
- EVANS, H.H., RICANATI, M., HORNG, M.F., JIANG, Q., MENCL, J., OLIVE, P. (1993)**
DNA double-strand break rejoining deficiency in TK6 and other human B-lymphoblast cell lines.
Radiat. Res., 134: 307-315.
- FERTIL, B., MALAISE, E.P. (1981)**
Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 7: 621-629.
- FIDLER, I.J., HART, I.R. (1982)**
Principles of cancer biology: biology of cancer metastasis. En: "Principles and Practice of Oncology". Vincent T. DeVita, Jr., Samuel Hellman y Steven A. Rosenberg eds., Philadelphia, pp. 80-92.
- FITZGERALD, T.J., HENAULT, S., SAKAKEENY, M., SANTUCCI, M.A., PIERCE, J.H., ANKLESARIA, P., KASE, K., DAS, I., GREENBERGER, J.L. (1990)**
Expression of transfected recombinant oncogenes increases radiation cell lines selectively at clinical low-dose rate.
Radiat. Res., 122: 44-52.
- FLETCHER, G.H. (1980a)**
Basic principles of radiotherapy. En: "Textbook Of Radiotherapy", third edition, Lea y Febiger eds., Philadelphia, pp. 180-228.
- FLETCHER, G.H. (1980b)**
Basic clinical parameters. En: "Textbook Of Radiotherapy", third edition, Lea y Febiger eds., Philadelphia, pp. 181-219.
- FLETCHER, G.H. (1988)**
Regaud lecture perspectives on the history radiotherapy.
Radiother. oncol., 12 (4): iii-V, 253-271.

FLORES, R. (1978)

A rapid and reproducible assay for quantitative estimation of proteins using bromophenol blue.

Anal. Biochem. 89: 605-611.

FRANKENBERG, D., FRANKENBERG-SCHWAGER, M., BLÖCHER, D., HARBICH, R. (1981)

Evidence for DNA double-strand breaks as the critical lesion in yeast cell irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions.

Radiat. Res., 88: 524-532.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M., FRANKENBERG, D., BLÖCHER, D., ADAMCZYK, C. (1981)

The effect of dose rate on the production of DNA double-strand breaks.

Radiat. Res., 87: 710-717.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M., FRANKENBERG, D., BLÖCHER, D., HARBICH, R., ADAMCZYK, C. (1982)

Irreparable DNA double-strand breaks induced in eucaryotic cells by sparsely or densely ionizing radiation and their importance for cell killing.

Mutat. Res., 96: 132.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M. (1989)

Review of repair kinetics for DNA damaged induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation.

Radiother. Oncol., 14: 304-320.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M., FRANKENBERG, D., HARBICH, R., ADAMCZYK, C. (1990)

A comparative study of rejoining of DNA double-strand breaks in yeast irradiated with 3.5 MeV α -particles or with 30 MeV electrons.

Int. J. Radiat. Biol., 57: 1151-1168.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M., FRANKENBERG, D. (1992)

Shouldered survival curves in accordance with the unsaturated rejoining kinetics of DNA double-strand breaks.

Br. J. Radiat., suppl. 24: 23-27.

FREIFELDER, D. (1965)

Mechanisms of inactivation of coliphage T7 by X-rays.

Proc. Nat. A. Sciences, USA, 54: 128-134.

FRESHNEY, R.I. (1983a)

Disaggregation of the tissue and primary culture. En: "Culture Of Animal Cells", R. Ian Freshney ed., Alan R. Liss Inc., New York, pp. 99-118.

FRESHNEY, R.I. (1983b)

Contamination. En: "Culture Of Animal Cells", R. Ian Freshney ed., Alan R. Liss Inc., New York, pp. 181-188.

GARRET, W.R., PAYNE, M.G. (1978)

Applications of models for cell survival: the fixation-time picture. Radiat. Res., 73: 201-211.

GELINAS, M., FLETCHER, G.H. (1973)

Incidence and causes of local failure of irradiation in squamous cell carcinoma of the faucial arch, tonsillar fossa, and base of tongue. Radiology, 108: 383-387.

GIACCIA, A.J., SCHWARTZ, J., SHIEH, J., BROWN, J.M. (1992)

The use of asymmetric-field inversion gel electrophoresis to predict tumor cell radiosensitivity. Radiother. Oncol., 24: 231-238.

GLEASON, D.F. (1977)

Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. En: "Urologic Pathology: The Prostate", M. Tannenbaum, ed., Lea y Febiger, Philadelphia,

GOOGHEAD, D.T., BRENNER, D.J. (1983)

Estimation of a single property of low LET radiations which correlates with biological effectiveness.

Phys. Med. Biol., 28: 485-492.

GOODHEAD, D.T. (1985)

Saturable repair models of radiation action in mammalian cells. Radiat. Res., 104: 58-67.

GORGOJO, L., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., OLEA, N., PEDRAZA, V. (1988)

Quimiosensibilidad en células de cáncer de mama humano (MCF-7 y EVSA-T) cultivadas en monocapa.

Rev. Farmacol. Clin. Exp., 5: 321-329.

GREEN, A., PRAGER, A., STOUDT, P.M., MURRAY, D. (1992)

Relationship between DNA damage and the survival of radiosensitive mutant Chinese hamster cell lines exposed to gamma-irradiation. Part. 1: Intrinsic radiosensitivity.

Int. J. Radiat. Biol., 61 (4): 465-472.

HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., VLODAVSKY, I., CHAUDHURI, A., WITTE, L., FUKS, Z. (1991)

Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. Cancer Res., 51: 2552-2558.

HAMBURGER, A.W., SALMON, S.E. (1977)

Primary bioassay of human tumor stem cells.
Science, 197: 461-463.

HANNAN, M.A., BLÖCHER, D., SIGUT, D., WAGHRAY, M. (1991)

DNA double strand breaks in fibroblast cell lines, from non-Hodgkin's lymphoma patients, showing increased sensibility to chronic gamma irradiation.
Cancer Letters, 57: 137-143.

HANNAN, M.A., GREER, W., SMITH, B.P., SIGUT, D., ALI, M.A., AMER, M.H. (1991)

Skin fibroblast cell lines derived from non-Hodgkin's lymphoma (NHL) patients show increased sensitivity to chronic gamma irradiation.
Int. J. Cancer, 47: 261-266.

HAYNES, R.H. (1966)

The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena.
Radiat. Res., suppl. 6: 1-29.

HEPPNER, G.H., MILLER, B.E. (1978)

Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences.
Cancer Res., 38: 3758-3763.

HILL, H.Z., HILL, G.J., MILLER, C.F., KWANG, F., PURDY, J. (1979)

Radiation and melanoma: response of B16 mouse tumor cells and clonal lines to in vitro irradiation.
Radiat. Res., 80: 259-276.

HITTLEMAN, W.N., POLLARD, M. (1982)

A comparison of the DNA and chromosome repair kinetics after gamma-irradiation.
Radiat. Res., 92: 497-509.

HO, K.Y. (1975)

*Induction of DNA double-strand breaks by X-rays in a radiosensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.*
Mutat. Res., 30: 327-334.

HÖCKEL, M., SCLINGER, K., KNOOP, C., VAUPEL, P. (1991)

Oxygenation of the uterine of the carcinoma cervix: evaluation by computerized O₂ tension measurements.
Cancer. Res., 51: 6098-6102.

ILIAKIS, G. (1988)

Radiation-induced potentially lethal damage: DNA lesions susceptible to fixation.
Int. J. Radiat. Biol., 53: 541-584.

ILIAKIS, G., OKAYASU, R. (1988)

The level of DNA double strand breaks does not correlate with cell killing in X-irradiated mitotic and G1-phase cells.

Int. J. Radiat. Biol., 53: 395-404.

ILIAKIS, G., METZGER, L., MUSCHEL, R.J. McKENNA, G. (1990)

Induction and repair of DNA double strand breaks in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with oncogenes H-ras and V-myc.

Cancer Res., 50: 6575-6579.

ILIAKIS, G.E., CICIOLINI, O., METZGER, L. (1991a)

Measurement of DNA double-strand breaks in CHO at various stages of cell cycle using pulsed-field gel electrophoresis: calibration by means of ¹²⁵I decay.

Int. J. Radiat. Biol., 59: 343-357.

ILIAKIS, G.E., METZGER, L., DENKO, N., STAMATO, T.D. (1991b)

Detection of DNA double-strand breaks in synchronous cultures of CHO cells by means of a asymmetric field inversion gel electrophoresis.

Int. J. Radiat. Biol., 59 (2): 321-341.

ILIAKIS, G., MEHTA, R., JACKSON, M. (1992)

Level of DNA double-strand break rejoining in Chinese hamster xrs-5 cells in dose-dependent: implications for the mechanism of radiosensitivity.

Int. J. Radiat. Biol., 61(3): 315-321.

IRWING, J.O. (1995)

A unified derivation or some well-known frequency distribution of interest in biometry and statistics.

J. R. Stat. Soc. A., 118: 389-404.

JAKESZ, R., SMITH, C.A., AITKEN, S., HUFF, K., SCHUETTE, W., SHACKNEY, S., LIPPMAN, M. (1984)

Influence of cell proliferation and cell cycle phase on expression of estrogen in MCF-7 breast cancer cells.

Cancer Res., 44: 619-625.

KAWAMURA, M., PREISLER, H.D. (1989)

A new approach to the detection of DNA damage.

Leuk. Res., 13: 391-398.

KELLAND, L.R., EDWARDS, S.M., STEEL, G.G. (1988)

Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in human cervix carcinoma cell lines of differing radiosensitivity.

Radiat. Res., 116: 526-538.

KELLERER, A.M., ROSSI, H.H. (1972)

The theory of dual radiation action.

Curr. Topics Radiat. Res., 8: 85-158.

KELLERER, A.M., ROSSI, H.H. (1978)

A generalized formulation of dual radiation action.
Radiat. Res., 75: 471-488.

KEMP, L.M., SEDGWICK, S.G., JEGGO, P.A. (1985)

X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell defective in double-strand break rejoining.
Mutat. Res., 132: 189-196.

KEYDAR, J., CHEN, L., KARBY, S. (1979)

Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin.
Eur. J. Cancer, 15: 659-665.

KOVACS, E., LANGEMANN, H. (1990)

Investigation of the repair of simple-strand breaks in human DNA using alkaline gel electrophoresis.
Mutat. Res., 124: 137-140.

KOVAL, T.M., KAZMAR, E.R. (1988)

DNA double-strand break repair in eukaryotic cell lines having radically different radiosensitivities.
Radiat. Res., 113: 268-227.

KRISCH, R.E., KRASIN, F., SAURI, C.J. (1977)

Curr. Topics. Radiat. Res. 12-355.

KYSELA, B.P., MICHAEL, B.D., ARRAND, J.E. (1993a)

Field-inversion gel electrophoresis analysis of the induction and rejoining of DNA double-strand breaks in cells embedded in agarose.
Radiat. Res., 134: 107-111.

KYSELA, B.P., MICHAEL, B.D., ARRAND, J.E. (1993b)

Relative contributions of levels of initial DNA damage and repair of double-strand breaks to the ionizing radiation-sensitive phenotype of the Chinese hamster cell mutant, XR-V15B. Part. I. x-rays.
Int. J. Radiat. Biol., 63 (5): 609-616.

LEA, D.E. (1955)

Actions of radiations on living cells, McMillan ed., 2nd ed., capítulo VIII, University press, London pp. 282-306.

LEHMAN, A.R., ORMEROD, M.G. (1970)

Double-strand breaks in the DNA of a mammalian cell after x-irradiation. Biochem. Biophys. Acta, 217: 268-277.

LEHMAN, A.R., ORMEROD, M.G. (1972)

The replication of DNA in murine lymphoma cells (5178 Y). I. Rate of replication. Biochem. Biophys. Acta, 204: 128-143.

LEHMAN, A.R. (1982)

The cellular and molecular response of ataxia-telangiectasia to DNA damage. En: "Ataxia-Telangiectasia: A Molecular between Cancer, Neuropathology and Immune Deficiency", Bridges, B.A., Harnden, D.G., eds., John Wiley, Chichester, pp: 141-154.

LEITH, J.T., DEXTER, D.L., DE WYNGAERT, J.K., ZEMAN, E.M., CHU, M.Y., CALABRESI, P., GLICKSMAN, A.S. (1982)

Differential responses to X-irradiation of subpopulation of two heterogeneous human carcinoma in vitro.

Cancer Res., 42: 2556-2561.

LIPPMAN, M.E., BOLAN, G. (1975)

Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture.

Nature, 256: 592-593.

LITTLE, J.B., NOVE, J., WEICHSELBAUM, R.R. (1980)

Abnormal sensitivity of diploid skin fibroblasts from a family with Gardners syndrome to the lethal effects of X-irradiation, ultra violet and mitomycin-C.

Mut. Res., 70: 241-250.

LOPEZ-GONZALEZ, J.D., DEL MORAL, R., OLEA, N., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., PEDRAZA, V. (1989)

Cinética de proliferación y de liberación de antígeno polipeptídico tisular en células MCF-7: influencia hormonal.

Rev. Esp. Fisiol., 45: 227-234.

LUEDKE, D.W. (1984)

Interlaboratory reproducibility of the human tumor colony forming assay (SECSG) experience. En: "Human Tumor Cloning", Sidney E. Salmon y Jeffrey M. Trent eds., Grune and Stratton, Orlando, pp. 245-253.

MACKILLOP, W.J., STEWART, S.S., BUICK, R.N. (1982)

Density volume analysis in the study of cellular heterogeneity in human ovarian carcinoma. Br. J. Cancer, 45: 812-820.

MACKILLOP, W.J., CIAMPI, A., TILL, J.E., BUICK, R.N. (1983)

A stem cell model of human tumor growth: implications for tumor cell clonogenic assays.

J. Nat. Cancer Inst., 70: 9-16.

MALAISE, E.P., FERTIL, B., DESCHAVANNE, P.J., CHAVAUDRA, N., BROCK, W.A. (1987)

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: 319-333.

MASTERS, J.R.W., HEPBUNN, P.J., WALKER, L., HIGHMAN, W.J., TREJDOSIEWICZ, L.K., POVEY, S., HILL, B.T., RIDDLE, P.R., FRANKS, L.M. (1986)

Tissue culture models of transitional cell carcinoma: characterization of 22 human urothelial cell lines.

Cancer Res., 4: 3630-3636.

McMILLAN, T.J., CASSONI, A.M., EDWARDS, S., HOLMES, A., PEACOCK, J.H. (1990)

The relationship of DNA double-strand breaks induction to radiosensitivity in human tumour cell lines.

Int. J. Radiat. Biol., 58: 427-438.

McMILLAN, T.J., HOLMES, A. (1991)

The isolation and partial characterization of a radiation-sensitive clone of a human bladder carcinoma cell line.

Radiat. Res., 128: 301-305.

McNALLY, N.J. (1989)

Can cell kinetic parameters predict the response of tumours to radiotherapy?.

Int. J. Radiat. Biol., 56: 777-786.

MENDELSON, M.L. (1960)

The growth fraction: a new concept applied to tumors.

Science, 132: 1496.

MENDELSON, M.L. (1962)

Autoradiography analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of the C3H mouse III. The growth fraction.

J. Natl. Cancer Inst., 28: 1015-1029.

MIDANDER, J., REVESZ, L. (1980)

The frequency of micromuclei as a measure of cell survival in irradiated cell populations.

Int. J. Radiat. Biol., 38: 237-242.

MORT, C., McMILLAN, T.J. (1993)

Molecular aspects of radiation sensitivity. En: "Molecular Biology For Oncologists", John Yarnold, Michael Stratton y Trevor McMillan eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 169-175.

MUELLER-KLIESSER, N.F., SUTHERLAND, R.M. (1982)

Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids.

Cancer Res., 42: 237-242.

NEVALDINE, B., LONGO, J.A., KIG, G.A., VILENCHIK, M., SAGERMAN, R.H., HAHN, P.J. (1993)

Induction and repair of DNA double-strand breaks.

Radiat. Res., 133: 370-374.

NIAS, A.H.W., GILBERT, C.W., LAJTHA, L.G., LANGE, C.S. (1965)

Clone size analysis in the study of cell growth following single or during continuous irradiation.

Int. J. Radiat. Biol., 9: 275-290.

NUÑEZ, M.I., VILLALOBOS, M., OLEA, N., VALENZUELA, M.T., PEDRAZA, V., McMILLAN, T.J., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M. (1994)

Radiation-induced DNA double-strand break rejoining in human tumor cells.

Cancer Res. (enviado para publicación).

OBE, G., JOHANNES, C., SCHULTE-FROHLINDE, H. (1992)

DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberration, mutation and oncogenic transformation.

Mutagenesis, 12: 3-12.

OKAYASU, R., ILIAKIS, G. (1989)

Linear DNA elution dose response curves obtained in CHO cells with non-unwinding filter elution after appropriate selection of the lysis conditions.

Int. J. Radiat. Biol., 55: 569-581.

OLEA, N., VILLALOBOS, M., THOMAS, J., LOPEZ-GONZALEZ, J.D., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., PEDRAZA, V. (1987)

Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7. II. Sincronización y reclutamiento celular hormonalmente-inducidos.

Rev. Esp. Fisiol., 43: 217-224.

OLEA, N. 1993.

Comunicación personal.

OLEINICK, N.L., CHIU, S., FRIEDMAN, L.R. (1984)

Gamma irradiation as a probe of chromatin structure: damage and repair of chromatin in the metaphase chromosome.

Radiat. Res., 98: 629-641.

OLIVE, P.L., DURAN, R.E., RICHE, J., OLIVOTTO, I.A., JACKSON, S.M. (1993)

Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers.

Cancer Res., 53: 733-736.

OSTLING, O., JOHANSON, K.J. (1984)

Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 123: 291-298.

OVERGAARD, J. (1989)

Sensitization of hypoxic tumour cells-clinical experience.

Int. J. Radiat. Biol., 56: 801-811.

OZOLS, R.F., CORDEN, B.I., JACOB, J. (1984)

High-dose cisplatin in hypertonic saline.

Ann. Int. Med., 100: 19-24.

PAINTER, R.B. (1980)

The role of DNA damage and repair in cell killing induced by ionising radiation. En: "Radiation Biology In Cancer Research", R.E. Meyn y H.R. Withers eds., Raven Press, New York, pp. 59-68.

PARETZKE, H.G. (1987)

Radiation track structure therapy. En: "kinetics Of Non-Homogeneous Processes", G.R. Freeman ed., Wiley, New York, pp. 89-170.

PAVELIC, Z.P., SLOCUM, H.K., RUSTUM Y.M., CREAVIN, P.J., KARAKOUSIS, C., TAKITA, H. (1980)

Colony growth in soft agar of human melanoma, sarcoma and lung carcinoma cells disaggregated by mechanical and enzymatic methods.

Cancer Res., 40: 2160-2164.

PEACOCK, J.H., CASSONI, A.M., McMILLAN, T.J. (1988)

Radiosensitive human tumour cell lines may not be recovery deficient.

Int. J. Radiat. Biol., 54: 945-953.

PEACOCK, J.H., EADY, J.J., EDWARDS, S., HOLMES, A., McMILLAN, T.J., STEEL, G.G. (1989)

Initial damage or repair as the major determinant of cellular radiosensitivity.

Int. J. Radiat. Biol., 56 (5): 543-547.

PEACOCK, J.M., EADY, J.I., EDWARDS, S.M., McMILLAN, T.I., STEEL, G.G. (1992a)

The intrinsic β ratio for human tumour cells: is it a constant?

Int. J. Radiat. Biol., 61: 479-487.

PEACOCK, J.H., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., McMILLAN, T.J., STEEL, G.G. (1992b)

The nature of the initial slope of radiation cell survival curves.

Br. J. Radiat. suppl., 24: 57-60.

PETERS, L.J., BROCK, W.A. (1992)

Cellular radiosensitivity as predictor of treatment outcome: where do we stand?

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 25: 147-148.

POHLIT, W. (1975)

The shape of dose-effect curves for diploid yeast cells irradiated with ionizing particules.

En: "Cell Survival After Low Doses Of Radiation", T. Alper ed., Institute of Physics, Wiley, London, pp. 190-196.

POHLIT, W., HEYDER, I.R. (1981).

The shape of dose-survival curves for mammalian cells and repair of potentially lethal damage analysed by hypertonic treatment.
Radiat. Res., 87: 613-634.

POWELL, S., McMILLAN, T.J. (1990)

DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation.
Radiother. Oncol., 19: 95-108.

POWELL, S.N., WHITAKER, S.J., EDWARDS, S.M., McMILLAN, T.J. (1992)

A DNA repair defect in a radiation-sensitive clone of a human bladder carcinoma cell line.
Br. J. Cancer, 65: 798-802.

PRISE, K.M., DAVIES, S., MICHAEL, B.D. (1987)

The relationship between radiation-induced DNA double-strand breaks and cell killing in Chinese hamster V79 fibroblasts irradiated with 250 KVp X-rays, 2.3 MeV. neutrons, or ²³⁸Pu α -particules.
Int. J. Radiat. Biol., 52: 893-902.

PRISE, K.M., DAVIES, S., STRAFORD, M.R.L., MICHAEL, B.D. (1992)

The role of non-protein sulphydryls in determining the chemical repair rates of free radical precursors of DNA damage and cell killing in Chinese hamster V79 cells.
Int. J. Radiat. Biol., 62 (3): 297-306.

PUCK, T.T., MARKUS, P.I. (1956)

Action of X-rays on mammalian cells.
J. Exp. Med., 103: 653-666.

RADFORD, I.R. (1985)

The level of induced DNA double-strand breakage correlates with cell killing after X-irradiation.
Int. J. Radiat. Biol., 48 (1): 45-54.

RADFORD, I.R. (1986)

Evidence for general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells.
Int. J. Radiat. Biol., 49 (4): 611-620.

RADFORD, I.R. (1987)

Effect of cell-cycle position and dose on the kinetics of DNA double strand breaks in X-irradiated Chinese hamster cells.
Int. J. Radiat. Biol., 52: 555-563.

RESNICK, M.A., MARTIN, P. (1976a)

*Repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control.*
Mol. Gen. Genet., 143: 119-129.

RESNICK, M.A. (1976b)

The repair of double-strand breaks in DNA: A model involving recombination.
J. Theor. Biol., 59: 97-106.

RESNICK, M.A. (1978)

Similar responses to ionizing radiation of fungal and vertebrate cell and the importance of DNA double-strand breaks.
J. Theor. Biol., 71: 339-346.

RITTER, M.A., CLEAVER, J.E., TOBIAS, C.A. (1977)

High-LET radiations induce a large proportion of non-rejoining DNA breaks.
Nature, 266: 653-655.

ROFSTAD, E.K. (1989)

Hypoxia and reoxygenation in human melanoma xenografts.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 17: 81-89.

ROFSTAD, E.K. (1991)

Influence of cellular radiation sensitivity on local tumor control human melanoma xenografts given fractionated radiation treatment.
Cancer Res., 51: 4609-4612.

ROORS, R., OKADA, S. (1972)

Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds.
Int. J. Radiat. Biol., 21: 329-342.

ROSEMANN, M., KANON, B., KONINGS, W.T., KAMPINGA, H.H. (1993)

An image analysis technique for detection of radiation-induced DNA fragmentation after CHEF electrophoresis.
Int. J. Radiat. Biol., 64 (2): 245-249.

ROSEMANN, M., KAMPINGA, H.H., PEACOCK, J.H., McMILLAN, T.J., KONINGS, A.W. (1994)

Pulsed-field gel electrophoresis: the radiation dose response relationship for DNA migration.
Enviado para publicación.

ROSS, G., BROWN, R. (1992)

The role of DNA repair processes in determining response to cancer therapy.
Eur. J. Cancer, 28 (1): 281-285.

ROTI ROTI, J.L., WRIGHT, W.D. (1987)

Visualization of DNA loops in nucleoids from Hela cells: assays for DNA damage and repair.
Cytometry, 8: 461-467.

RUBIN, P., KELLER, B., QUICK, R. (1974)

The range of prescribed tumor lethal doses in the treatment of different human tumors. En: "The Biological And Clinical Basis Of Radiosensitivity", M. Friedman, C.C. Thomas eds., Springfield Ill., pp. 435-484.

RUBINSTEIN, L.V., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D., SIMON, R.M., TOSINI, S., SKEMAN, P., SCUDEIRO, D.A., MONKS, A., BOYD, M.R. (1990)

Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumour cell lines. J. Natl. Cancer Inst., 82: 1113-1118.

RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., LOPEZ-GONZALEZ, J.D., DEL MORAL, R., FERNANDEZ, J.C., GORGOJO, L., OLEA, N., PEDRAZA, V. (1990)

Liberación del antígeno polipeptídico tisular y proliferación de células MCF-7 tras sincronización con hidroxitamoxifeno y rescate con estradiol. Rev. Esp. Fisiol., 46 (2): 205-210.

RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., BUSH, C., PEACOCK, J.H., STEEL, G.G., WHITAKER, S.J., McMILLAN, T.J. (1993a)

Dose-rate effect for DNA damage induced by ionising radiation in human tumor cells. Radiat. Res., (en prensa).

RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., McMILLAN, T.J. OLEA, N., PEACOCK, J.M., PEDRAZA, V., STEEL, G.G., VILLALOBOS, M., WHITAKER, S.J. (1993b)

Aspectos moleculares celulares y multicelulares de la radiosensibilidad tumoral. En: "Avances De La Investigación Oncológica Española", J.C. Lacal y M. Barbacid eds., Farmaindustria. Serie científica, Madrid, pp. 187-226.

RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., STEEL, G.G., WHITAKER, J.S., McMILLAN, T.J. (1994a)

A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis. Int. J. Radiat. Biol. (enviado para publicación).

RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., NUÑEZ, M.I., McMILLAN, T.J., OLEA, N., MORT, C., VILLALOBOS, M., PEDRAZA, V., STEEL, G.G. (1994b)

Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. Br. J. Cancer (en prensa)

SANCHEZ-REYES, A. (1992)

A simple model of radiation action in cells based on a repair saturation mechanism. Radiat. Res., 130: 139-147.

SAPORA, O., BARONE, F., BELLI, M., MAGGI, A., QUINTICLIANI, M., TABOCCHINI, M.A. (1991)

Relationship between cell killing, mutation induction and DNA damage in X-irradiated V79 cells: the influence of oxygen and DMSO. Int. J. Radiat. Biol., 60 (3): 364-482.

SCHLAG, P., FLENTJE, D. (1984)

Heterogeneity and variability of test results as limiting factors for predictive assays. En: "Predictive Drug Testing On Human Tumor Cells", V. Hofman, M.E. Berens y G. Martz eds., Springer-Verlag, Berlin, pp. 191-196.

SCHWARTZ, D.C., CANTOR, C.R. (1984)

Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed-field gradient gel electrophoresis. Cell, 37: 67-75.

SCHWARTZ, J.C., ROTMENSCH, J., GIOVANAZZI, S.M., COHEN, M.B., WEICHSELBAUM, R.R. (1988)

Faster repair of DNA double-strand breaks in radioresistant human tumour cells. Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 15: 907-912.

SCUDIERO, D.A., SHOEMAKER, R.H., PAULL, K.D. (1988)

Evaluation of a soluble tetrazolium formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res., 48: 4827-4833.

SIDDIQI, M.A., BOTHE, E. (1987)

Single and double strand break formation in DNA irradiated in aqueous solution: dependence on dose and OH radical scavenger concentration. Radiat. Res., 112: 449-463.

SINELSHCHIKOVA, T.A., LVOVA, G.N., SHONIYA, N.N., ZASUKHINA, G.D. (1987)

Defective DNA excision repair in cell of patients with homocystinuria. Mutat. Res., 184: 265-270.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDEIRO, D., MONKS, A., McMALIAN, J., VISTICA, D., WARREN, J.T., BOKESCH, H., KENNEY, S., BOYD, M.R. (1990)

New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J. Natl. Cancer Inst., 82: 1107-1112.

SOTO, A.M., SONNENSCHNEIN, C. (1985)

The role of estrogen on the proliferation of human breast cancer cells (MCF-7). J. steroid. Biochem., 23: 87-94.

SOTO, A.M., MURAI, J.T., SIITERI, P.K., SONNENSCHNEIN, C. (1986)

Control of cell proliferation: evidence for negative control on estrogen-sensitive T47D human breast cancer cell. Cancer Res., 46: 2271-2276.

SOTO, A.M., SONNENSCHNEIN, C. (1987)

Control of cell proliferation in sensitive cells: the case for negative controls. Endocrine Rev., 8: 44-52.

SOULE, H.D., VAZQUEZ, A., LONG, A., ALBERT, S., BRENNAN, M.A. (1973) *Human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.*
J. Natl. Cancer Inst., 51: 1409-1413.

STAMATO, T.D., DENKO, N. (1990)
Asymmetric field inversion gel electrophoresis for detecting DNA double-strand breaks in mammalian cells.
Radiat. Res., 121: 196-205.

STAMATO, T., GUERRIERO, S., DENKO, N. (1993)
Two methods for assaying DNA double-strand break repair in mammalian cells by asymmetric field inversion gel electrophoresis.
Radiat. Res., 133: 60-66.

STEEL, G.G. (1967)
Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours.
Eur. J. Cancer., 3: 381-387.

STEEL, G.G. (1968)
Cell loss from experimental tumors.
Cell tissue kinet., 1: 193-207.

STEEL, G.G. (1989a)
Survival of clonogenic cells: cell-survival curves. En: "The Biological Basis Of Radiotherapy", G.G. Steel, G.E. Adams y A. Horwich eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 45-63.

STEEL, G.G., McMILLAN, T.J., PEACOCK, J.M. (1989b)
The picture has changed in the 1980s.
Int. J. Radiat. Biol., 56: 525-537.

STEEL, G.G., PEACOCK, J.H. (1989c)
Why are some human tumours more radiosensitive than others?.
Radiat. Oncol., 15: 63-72.

STEEL, G.G. (1991)
Cellular sensitivity to low dose-rate irradiation focuses the problem of tumour radioresistance.
Radiother. Oncol., 20: 71-83.

STEPHENS, T.C., EADY, J.J., PEACOCK, J.H., STEEL, G.G. (1987)
Split-dose and low dose-rate recovery in four experimental tumour systems.
Int. J. Radiat. Biol., 52: 157-170.

SUGARBAKER, P.H., REED DUNNICK, N., SUGARBAKER, E.V. (1982)
Diagnosis and staging. En: "Principles And Practice Of Oncology", Vincent T. DeVita, Jr., Sammel Hellman, Steven A. Rosenberg eds., Philadelphia, pp.: 226-263.

SUIT, H.D. (1987)

Prediction of response of tumours to irradiation treatment. En: "Proceedings Of The Third International Meeting On Progress In Radio-Oncology", K.H. Karcher eds.

SUTHERLAND, R.L., HALL, R.L., TAYLOR, W. (1983)

Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in plateau phase. Cancer Res., 43: 3998-4006.

TAALMAN, R.D.F.M., JASPERS, N.G.J., SHENES, J.M.C.J., De WIT, J., HUSTINE, T.W.J. (1983)

Hypersensitivity to ionizing radiation, in vitro, in a new chromosomal breakage disorder, the Nijmegen Breakage Syndrome. Mutat. Res., 112: 23-32.

TAYLOR, A.M.R. (1978)

Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. Mutat. Res., 50: 407-418.

THAMES, H.D. (1985).

An "incomplete-repair" model for survival after fractionated and continuous irradiations. Int. J. Radiat. Biol., 47: 319-339.

THAMES, H.D., MASON, K.A., BENTZEN, S. M., ANG, K.K., CUNDIFF, J.H. (1989)

Split-dose recovery in mouse jejunal crypt cells: characterization of repair kinetics. Br. J. Radiat.

THOMLINSON, R.H., GRAY, L.H. (1955)

The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br. J. Cancer, 9: 539-549.

TOBI, S.E., ITZHAKI, R.F. (1993)

DNA double-strand breaks measured by pulsed-field gel electrophoresis in irradiated lymphocytes from normal humans and those with Alzheimer's disease. Int. J. Radiat. Biol., 63 (5): 617-622.

TOBIAS, C.A., BLAKELY, E.A., NGO, F.Q.H., YANG, T.C.H. (1980)

The repair-misrepair model of cell survival. En: "Radiation Biology And Cancer Research", R.E. Meyn and H.R. Withers, eds., Raven, New York, pp. 195-230.

TUBIANA, M., DUTREIX, J., WAMBERSIE, A. (1990)

Cellular effects of ionizing radiation. Cell survival curves. En: "Introduction To Radiobiology", M. Tubiana, J. Dutreix, y A. Wambersie eds., Taylor and Francis, London, pp. 86-125.

VALENZUELA, M.T. (1994)

Trabajo en curso.

VAN ANKEREN, S.C., MURRAY, D., MEYN, R.E. (1988)

Induction and rejoining of gamma-ray-induced DNA single and double strand breaks in Chinese hamster AA8 cells and two radiosensitive clones.

Radiat. Res., 116: 511-525.

VAN DER SCHANS, G.P. LENTEN, H.B., LOHMAN, P.H.M. (1982)

En: "Progress in Mutation Research", A.T. Natarajan, G. Obe y H. Altmann eds., Elsevier, Amsterdam 1982, vol 4, pp. 285-299.

VAN DER SCHANS, G.P., PATERSON, M.C., CROSS, W.G. (1983)

DNA strand breaks and rejoining in cultured human fibroblast exposed to fast neutrons or gamma rays.

Int. J. Radiat. Biol., 44: 75-85.

VILLALOBOS, M., OLEA, N., GORGOJO, L., LOPEZ-GONZALEZ, J.D., RUIZ DE ALMODOVAR, J.M., PEDRAZA, V. (1987)

Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7. I. Influencia relativa de los estrógenos y antiestrógenos sobre el crecimiento de la población celular.

Rev. Esp. Fisiol., 43: 211-216.

VOGELSTEIN, B., PARDOLL, D.M., COFFEY, D.S. (1980)

Supercoiled loops and enkaryotic DNA replication.

Cell, 22: 79-85.

VOLLRATH, D., DAVIS, R.W. (1987)

Resolution of DNA molecules greater than 5 megabases by contour-clamped homogeneous electric fields.

Nucleic Acids Res., 15: 7865-7875.

VON HOFF, D.D. (1984)

Plating efficiencies of human tumors in capillaries versus Petri dishes.

En: "Human Tumor Cloning", Sidney E. Salmon y Jeffrey M. Trent eds., Grune and Stratton, Orlando, pp. 153-161.

VON SONNTAG, C. (1987)

En: "The Chemical Basic of Radiation Biology", London, Taylor y Francis eds., 1987. Capítulo 7.

WARD, J.F. (1985)

Biochemistry of DNA lesions.

Radiat. Res., 104: S103-S111.

WARD, J.F. (1985)

The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionising radiation: a review.

Int. J. Radiat. Biol., 48: 45-54.

WARD, J.F. (1986)

Mechanisms of DNA repair and their potential modification for radiotherapy.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 12: 1027-1032.

WARD, J.F. (1988)

DNA damage produced by ionising radiation in mammalian cells: identities, mechanism of formation and repairability.

WARD, J.F. WEBB, C.F., LIMOLI, C.L., MILLIGAN, J.R. (1990a)

DNA lesion produced by ionizing radiation: locally multiply damaged sites.

En: "Ionizing Radiation Damage To DNA: Molecular Aspects", Susan S. Wallace, Robert B. Painter eds., Wiley-Liss, New-York, pp. 43-50. Prog. Nucleic Acid Res., 2: 95-125.

WARD, J.F. (1990b)

The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionising radiation: a review.

Int. J. Radiat. Biol., 57: 1141-1150.

WARTERS, R.L., LYONS, B.W. (1992)

Variation in radiation-induced formation of DNA double-strand breaks as a function of chromatin structure.

Radiat. Res., 130: 309-318.

WEICHSELBAUM, R.R., BECKETT, M.A., DAHLBERG, W., DRITSCHILO, A. (1988)

Heterogeneity of radiation response of a parent human epidermoid carcinoma cell line and four clones.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 14: 907-912.

WELCH, D.R., MILAS, L., TOMASOUIL, S.P., NICOLSON, G.L. (1983) *Heterogeneous response and clonal drift of sensitivities of metastatic 13762NF mammary adenocarcinoma clones to gamma-radiation in vitro.*

Cancer Res., 43: 6-10.

WEST, C.M.L., HENDRY, J.H. (1992)

Intrinsic radisensitivity as a predictor of patient response to radiotherapy.

Br. J. Radiat., suppl. 24: 146-152.

WEST, C.M.L., DAVIDSON, S.E., ROBERTS, S.A., HUNTER, R.D. (1993)

Intrinsic radiosensitivity and prediction of patient response to radiotherapy for carcinoma of the cervix.

Br. J. Cancer, 68: 819-823.

WHITAKER, S.J., POWELL, S.N., McMILLAN, T.J. (1991)

Molecular assays of radiation-induced DNA damage.

Eur. J. Cancer, 27 (7): 922-928.

WHITAKER, S.J., McMILLAN, T.J. (1992)

Oxygen effect for DNA double-strand break induction determined by pulsed-field gel electrophoresis.

Int. J. Radiat. Biol., 61 (1): 29-41.

WHITAKER, S.J., McMILLAN, T.J. (1992)

Pulsed-field gel electrophoresis in the measurement of DNA double-strand break repair in xrs-6 and CHO cell line: DNA degradation under some conditions interferes with the assessment of double-strand break rejoining.

Radiat. Res., 130: 389-392.

WHITAKER, S.J., UNG, Y., McMILLAN, T.J. (1994)

DNA double-strand break induction and rejoining as determinants of human tumor radiosensitivity. A pulsed-field gel electrophoresis study.

Cancer Res. (enviado para publicación)

WITHERS, H.R. (1974)

Four Rs of radiotherapy.

Avd. Radiat. Biol., 5: 241-270.

WITHERS, H.R., LESTER, J.P. (1980)

Biologic aspects of radiation therapy. En: "Radiotherapy", Gilbert H. Fletcher ed., Lea y Febiger, Philadelphia, pp. 103-180.

WLODEK, D., HITTLEMAN, W.N. (1987)

The repair double-strand DNA breaks correlates with radiosensitivity of L5178 Y-S and L5178 Y-R cells.

Radiat. Res., 112: 146-155.

WOODS, W.G.

Quantitation of the repair of gamma-radiation-induced-double-strand DNA breaks in tumour fibroblasts.

Biochem. Biophys. Acta, 655: 342-348.

YANG, X., DARLING, J.L., McMILLAN, T.I., PEACOCK, J.H., STEEL, G.G. (1991)

Heterogeneity of radiosensitivity in a human glioma cell line.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 22: 103-108.

ZDZIENICKA, M.Z., VAN WESSEL, N., VAN DER SCHANS, G.P. (1992)

A fourth complementation group among ionizing radiation-sensitive Chinese hamster cell mutants defective in DNA double-strand break repair.

Mutat. Res., 131: 309-314.