

# **CAPÍTULO VII**

## **Sensibilización a quimioterápicos**

**1.- Introducción**

**2.- Descripción de experimentos**

**3.- Resultados de la combinación radiación/Taxol**

**4.- Resultados de la combinación radiación/VP-16**

**5.- Análisis de ciclo celular y apoptosis**

**6.- Discusión**

## **1.- Introducción**

A pesar de los grandes avances producidos durante los últimos años en el tratamiento del cáncer, existen dos problemas básicos aun por resolver. Uno es la necesidad de eliminar absolutamente todas las células transformadas, pues una única superviviente puede seguir proliferando descontroladamente y dar lugar a un nuevo tumor. El otro gran problema es la falta de especificidad de las terapias. Una terapia adecuada debería distinguir entre células sanas y células transformadas. Esta distinción no es sencilla, ya que una célula cancerosa funciona esencialmente igual que una normal, con la diferencia de que algunos de sus procesos fisiológicos están descontrolados.

El tratamiento del cáncer basado en la administración de fármacos (quimioterapia) tiene como principal obstáculo para su completa eficacia la aparición de fenómenos de resistencia. Estos fenómenos pueden ser debidos a diferentes causas. En ocasiones, las células no absorben correctamente el fármaco, o lo degradan con rapidez. Sin embargo, es más frecuente que la resistencia aparezca durante el transcurso del tratamiento, después de una respuesta inicial favorable. Esto es debido a cambios genéticos, como por ejemplo la sobreexpresión de genes inhibidores de apoptosis, pertenecientes a la familia bcl-2, como el bcl-x [SIM94]. Al ser esta forma de muerte celular uno de los principales mecanismos de actuación de los quimioterápicos, su inhibición reduce drásticamente la eficacia de los mismos.

La rápida proliferación de las células de un tumor, junto con su inestabilidad genética, hacen relativamente fácil la formación de mutaciones desfavorables y el desarrollo de resistencias. A esto hay que añadir que, en general, cuando un fármaco no llega a matar las células tumorales, contribuye a la aparición de todo tipo de modificaciones genéticas, favoreciendo la aparición de células resistentes. A pesar de que puede parecer que la combinación de distintos fármacos podría evitar este problema al reducir la probabilidad de mutaciones “de resistencia” a todos ellos, las células pueden mostrar mecanismos de resistencia comunes a todos ellos. El más conocido es la expulsión del fármaco al exterior de la célula por medio de una proteína, la glicoproteína P, que actúa como transportadora en la membrana plasmática. Al fenotipo que produce esta resistencia a múltiples drogas se le denomina MDR (Multi Drug

Resistance) y se llama *mdr-1* al gen que codifica la información para la síntesis de la glicoproteína P [SIM94].

El uso de altas dosis de radiaciones ionizantes para controlar las poblaciones tumorales (radioterapia) también muestra limitaciones importantes. La mayor restricción viene dada por la dosis máxima administrable. En situaciones en las que se compromete la integridad de tejidos sanos, la dosis puede resultar insuficiente para eliminar por completo las células tumorales (especialmente las más radiorresistentes). En la misma línea, la radioterapia actual no es eficaz en el tratamiento de metástasis alejadas del foco tumoral, pues sería necesaria una irradiación de todo el cuerpo que afectaría gravemente a tejidos vitales radiosensibles.

Por otro lado, resulta necesario optimizar los esquemas de fraccionamiento para reducir al máximo los efectos indeseables. Fracciones de dosis demasiado bajas o demasiado espaciadas en el tiempo pueden dar lugar a una repoblación tumoral. Por el contrario, si las fracciones son demasiado elevadas se produce un aumento del daño al tejido sano, así como del riesgo de aparición de daños tardíos.

A la vista de las utilidades y limitaciones terapéuticas de los tratamientos con radiaciones ionizantes y fármacos citotóxicos resulta interesante considerar las ventajas de la unión de ambas terapias [TAN89]. La combinación de las variables propias de cada una de ellas tales como vía de administración, esquema, duración y dosis en quimioterapia, y, campo, fraccionamiento, calidad y dosis en radioterapia, da como resultado un complejo esquema de efectos difícilmente cuantificables. No obstante, pueden darse casos relativamente sencillos en los que las limitaciones de uno de los tratamientos pueden reducirse utilizando el otro. Por ejemplo, en el caso de la existencia de metástasis alejadas del tumor primario, la radioterapia no resulta completamente eficaz por sí sólo como se ha visto anteriormente. La colaboración espacial (sin interacción biológica) de ambas terapias puede conseguir un control del foco tumoral por la radiación, con una acción de agentes citotóxicos sobre las metástasis a distancia. La combinación de ambos agentes en interacción biológica tiene posibilidades como la administración previa a la irradiación de agentes químicos sensibilizantes, o el aumento de dosis radioterápica con un adecuado soporte farmacológico. De igual manera pueden

incluirse dosis moderadas o bajas de quimioterapia intercaladas en esquemas de radioterapia fraccionada.

A escala subcelular o biomolecular se conocen con bastante precisión las acciones que algunos tipos de fármacos y radiaciones provocan por separado. Sin embargo, un número considerablemente menor de estudios aborda los efectos resultantes de la combinación de ambos. Excepto en los casos de agentes químicos radioprotectores como los mencionados (capítulo de radiobiología) las respuestas a la combinación fármaco-radiación surgen de la adición de los efectos tóxicos de cada uno por separado. La inespecificidad de los daños producidos por la radiación hacen que resulte idónea para la posterior acción de fármacos que actúen sobre componentes específicos de las células. Por ejemplo, la creación de especies químicas reactivas en el citoplasma o la ruptura de moléculas como el ARN, pueden inducir respuestas de muerte celular programada o apoptosis, favoreciendo el efecto de fármacos que actúan mediante éste mecanismo.

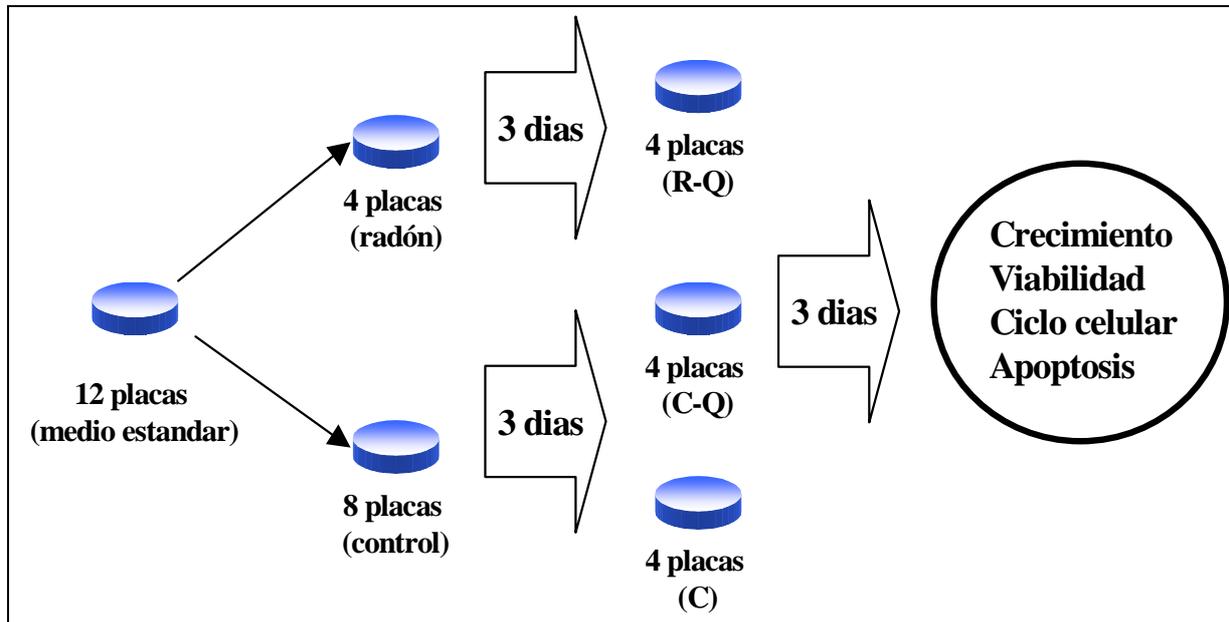
Sobre esta base, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos con referencia a la proliferación y, principalmente, a la expresión de genes relacionados con la apoptosis y la resistencia a fármacos quimioterápicos se realizó otra serie de experimentos de irradiación de MCF-7 con bajas dosis producidas por partículas  $\alpha$ . Este grupo de experimentos se ha llevado a cabo con el fin de poner a prueba la posibilidad de que las bajas dosis de radiación  $\alpha$  actúen como agente sensibilizante a la posterior acción de los fármacos taxol y VP-16, habitualmente empleados en tratamientos de quimioterapia.

## **2.- Descripción de experimentos**

Para llevar a cabo los experimentos de sensibilización a quimioterápicos se utilizaron células tumorales MCF-7 de la misma procedencia que las empleadas en los análisis de proliferación. Las dosis empleadas en dichos experimentos se encontraron entre 1.7 y 15 mGy. Como muestra la Figura 7.1, cada experimento estuvo dividido en dos etapas. En la primera de ellas parte de las placas de cultivo estuvieron expuestas a medio de cultivo con radón disuelto y parte a medio de cultivo estándar sin radón.. En ambos casos, el medio de cultivo ha sido previamente calentado a 37°C y filtrado para

asegurar su esterilidad. Después de tres días de incubación se cambia el medio de cultivo de las placas por medio fresco en cuatro de ellas y por medio fresco con taxol o VP-16 en las ocho restantes. Las concentraciones de ambos quimioterápicos variaron entre 20 y 100 nM para el Taxol, y entre 500 y 2000 nM para el VP-16. Así, se tienen placas con células irradiadas y quimioterápico (R-Q), placas con células sin irradiar y quimioterápico (C-Q) y otras sin irradiar en medio estándar o controles (C). (Fig. 7.1)

Después de tres días se realizan los recuentos de células presentes y viables, así como los análisis genéticos en cada caso. Para ello, las células fueron tratadas con 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA in PBS (pH 7.4) at 37°C for 5 min, y pasadas por una aguja esteril de calibre 25 para producir la suspensión unicelular y poder contarlas con un hemocitómetro. La viabilidad se determinó por el test de exclusión del “trypan blue”.



**Fig. 7.1:** Esquema de los experimentos de sensibilización de MCF-7

### **3.- Resultados de la combinación radiación/Taxol**

Se realizaron siete experimentos para diferentes dosis de radiación alfa y concentraciones de Taxol. Todos los datos fueron analizados con un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiple Student-Newman-Keuls. La significación estadística de las diferencias entre supervivencia en las distintas condiciones de cultivo se calculó mediante el test t de Student empleando un intervalo de confianza de un 99%,  $p < 0.001$ . En cada tabla se expresan los porcentajes medios referidos a los controles de supervivencia y viabilidad celulares, así como la supervivencia a largo plazo, es decir, el porcentaje de células supervivientes y viables. Los valores se acompañan de las respectivas desviaciones estándar. Además, en las tablas se muestran las condiciones de cultivo empleadas: C-C en el caso de células cultivadas en medio estándar; C-T para células cultivadas 3 días en medio estándar y en medio con taxol otros tres días; y R-T en el caso de células cultivadas en medio con radón disuelto y posteriormente en medio con una concentración de taxol.

En los dos experimentos en los que se usó una concentración de 20 nM de taxol y dosis de radiación alfa de 1.7 y 3.2 mGy, la supervivencia de las células tratadas con taxol sólo y con taxol tras irradiación fue similar (Tabla 7.1), produciéndose disminuciones no significativas con respecto a los controles. Los errores asociados con los porcentajes de supervivencia, debidos a la diferente actividad proliferativa en las diferentes placas de cultivo, son altos, mostrando un efecto en parte aleatorio del taxol sólo y combinado con la radiación. La viabilidad de las células supervivientes mostró valores entorno al 76 y el 83%, los cuales no difieren significativamente de los encontrados en los controles.

<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Proliferación (% control)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>C-C</b>	100	15	87	2
<b>C-T</b>	90	14	83	5
<b>R-T</b>	95	16	76	3

**Tabla 7.1:** Valores medios de la proliferación y la viabilidad celular para dosis entre 1.7 y 3.2 mGy, y una concentración de taxol de 20 nM.

En otras tres experiencias se empleó una concentración de taxol de 50 nM y dosis alfa entre 2.7 y 15 mGy. Como puede observarse en la tabla 7.2 el taxol produce una disminución significativa de la proliferación celular con respecto al control y también lo hace, en mayor medida, la combinación de irradiación y taxol. Igualmente, las diferencias de proliferación entre las células tratadas con taxol y las irradiadas previamente son también significativas en los tres experimentos. Los porcentajes de crecimiento con respecto al control fueron de 32 y 18% respectivamente, con bajas desviaciones estándar. La viabilidad de las células supervivientes fue del 59% en las células tratadas con 50 nM de Taxol, y del 47% en las células tratadas con Taxol y previamente irradiadas con radón. Estos resultados podrían ser considerados de interés para su aplicación terapéutica, teniendo en cuenta que la concentración de taxol empleada puede considerarse próxima a la utilizada en clínica.

<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Proliferación (% control)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>C-C</b>	100	10	83	2
<b>C-T</b>	32 <sup>a</sup>	4	59 <sup>a</sup>	3
<b>R-T</b>	18 <sup>ab</sup>	2	47 <sup>ab</sup>	4

**Tabla 7.2:** Valores medios de la proliferación y la viabilidad celular para dosis entre 2.7 y 15 mGy y 50 nM de taxol (<sup>a</sup>: significativamente diferente del control C-C p<0.001, <sup>b</sup>:significativamente diferente del Taxol C-T, p < 0.001)

La tabla 7.3 muestra los resultados obtenidos para una dosis de 3 mGy y 75 nM de taxol. Se observa que el taxol provoca una mayor disminución en la proliferación que en las anteriores experiencias, entorno al 14 %, pero las diferencias entre cultivos previamente irradiados y cultivos sin irradiar no resultó significativa. También la viabilidad se redujo notablemente hasta valores del 57 % en placas con Taxol solamente y del 50% en placas con cultivo irradiado y Taxol, pero sin resultar las diferencias entre ambos valores medios estadísticamente significativas.

También se realizó otra experiencia usando una concentración de taxol de 100 nM, que no se muestra en las tablas ya que la proliferación resultó próxima a cero en todos los casos.

<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Proliferación (% control)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>C-C</b>	100	17	83	2
<b>C-T</b>	14 <sup>a</sup>	2	57 <sup>a</sup>	5
<b>R-T</b>	12 <sup>a</sup>	2	50 <sup>a</sup>	5

**Tabla 7.3:** Valores medios de la supervivencia y la viabilidad celular para dosis de 3.0 mGy y 75 nM de taxol. (<sup>a</sup>: significativamente diferente del control, C-C, p<0.001, <sup>b</sup>:significativamente diferente del Taxol, C-T, p<0.001)

#### **4.- Resultados de la combinación radiación/VP-16**

Se han realizado cuatro experimentos con diferentes dosis de radiación y concentraciones de VP-16. En cada uno de ellos se han estudiado la proliferación y viabilidad celulares. Las condiciones empleadas están referidas como C-C para las células cultivadas en medio estándar, C-VP (VP-16) en el caso de células cultivadas en medio estándar durante tres días y en medio con VP-16 otros tres días, y R (dosis)-VP

(VP-16) para las células cultivadas en medio con radón (3 días) y después en medio con VP-16 otros tres días.

La proliferación se ha calculado con respecto al control promediando el resultado en las tres placas utilizadas en cada experiencia. A partir de este promedio se ha calculado la correspondiente desviación típica, lo cual permite establecer la significación estadística de las diferencias encontradas por medio de un test t de Student ( $p < 0.001$ ). La viabilidad también está referida al porcentaje de control.

Se llevaron a cabo dos experimentos con una concentración de VP-16 de 2000 nM para concentraciones de radón que produjeron dosis entre 2.7 y 15 mGy. En el primero de ellos se observó que tanto el VP-16 sólo, como combinado con radón produjeron diferencias significativas en el crecimiento y la viabilidad con respecto al control. La combinación Rn-VP produjo una proliferación del 43% aunque mayor de la observada para el VP sólo, que fué de un 14%. En cuanto a la viabilidad, quedaron un 22% de células viables, lo que supone alrededor de la cuarta parte del control.

En el segundo experimento con 2000 nM de VP16, se empleó una concentración mayor de radón disuelto en el medio (tabla 7.4). En este caso, se encontraron diferencias significativas entre el control, el medio con VP16 y el medio con VP16-Rn, siendo este último el que mayores disminuciones provocó en el crecimiento y la viabilidad. Se obtuvo un 13% de células supervivientes, lo cual supone cerca de diez veces menos que en el control, y un 2% de células viables, es decir, cincuenta veces menor que la viabilidad del control.

<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>Supervivencia (% control)</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Viabilidad (%)</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>C-C</b>	100	6	100	7
<b>C-VP16</b>	23 <sup>a</sup>	2	6 <sup>a</sup>	2
<b>R-VP16</b>	13 <sup>ab</sup>	2	2 <sup>ab</sup>	1

**Tabla 7.4:** Combinación de 15 mGy y 2000 nM de VP-16. (<sup>a</sup>: significativamente diferente del control  $p < 0.001$ , <sup>b</sup>: significativamente diferente del VP16,  $p < 0.001$ )

Se realizaron otros dos experimentos usando concentraciones de VP de 1000 nM y 500 nM. En ambos, la concentración de radón fué similar, y los resultados no difieren significativamente entre sí. Como en los otros experimentos se encontraron diferencias significativas en la supervivencia y la viabilidad entre el medio de control y los medios con VP sólo y VP-Rn. La concentración de 500 nM de VP produjo por si sola crecimientos y viabilidades (98 y 66% respectivamente) próximas a las de control. En este caso, hay que tener en cuenta que el experimento se realizó en un medio con más CO<sub>2</sub> de lo habitual, lo cual influye negativamente en el crecimiento. La combinación con radón dió una supervivencia del 85% (algo mayor de tres cuartas partes del control), y una viabilidad del 54%, que supone dos terceras partes de la obtenida en el control. Las diferencias encontradas entre el VP16 sólo y combinado con radón no resultaron importantes, siendo 98 y 85% para la supervivencia, y 66 y 54% para la viabilidad. En la concentración de 1000 nM de VP16, los valores referentes a la supervivencia y la viabilidad fueron menores en el VP16 sólo (86 y 61%), y en el VP-Rn (85 y 67%), que en el control, pero estas diferencias entre sí no resultan significativas en ninguno de los casos.

Como se verá a continuación, la citometría de flujo mostró diferencias entre las muestras de control y el resto. Las células tratadas con VP-16 sólo mostraron en todos los casos un aumento significativo del porcentaje de células que se encuentran en la fase M, manteniendo aproximadamente constante el número de ellas en las fases G0 y G1.

En las muestras irradiadas se observó una disminución poco significativa en el número de células en fase G0 y G1, con un ligero aumento de aquellas en fase M. Este resultado puede indicar una contribución de la radiación al efecto del VP16, pero las pequeñas diferencias encontradas no permiten establecer una influencia clara de la radiación sobre el ciclo.

## **5.- Análisis de ciclo celular y apoptosis**

### ***Breve descripción del ciclo celular***

Al proceso por el cual una célula acaba por dar lugar a dos células hijas se le llama ciclo celular. Cada célula atraviesa en cada momento de su existencia un punto de este ciclo. El ciclo celular consta de cuatro fases llamadas G1, S, G2 y M. Aunque con variaciones, esta cadena de sucesos dura unas 24 horas. En cada una de las fases hay un punto de control encargado de asegurar el correcto paso de unas a otras. La finalidad de estos puntos de control es hacer que la célula se divida exclusivamente cuando esté lista para ello.

La fase G1 es el intervalo (de 6 a 12 horas) que transcurre antes de la síntesis o replicación del DNA. En esta fase la célula dobla su tamaño y su masa por la síntesis continua de todos sus componentes como resultado de la transcripción y traducción de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. En un organismo superior, tan sólo una mínima porción de las células se dividen de manera habitual, encontrándose el resto de ellas en un estado de reposo denominado G0.

La fase S (de síntesis del ADN) corresponde al periodo (de 6 a 8 horas) durante el cual se replica el ADN. En esta etapa, en cada cromosoma se genera una copia idéntica de la molécula de ADN. En el intervalo que transcurre entre esta replicación genómica y la división en dos células hijas (de 3 a 4 horas), la célula se prepara comprobando que las dos anteriores fases se han desarrollado con normalidad. Es decir, se verifica que se ha duplicado la masa para dar lugar a dos células hijas (G1), y que la replicación del DNA ha sido correcta y sólo se ha producido una vez (S). A esta fase de comprobación se la llama G2.

Finalmente, la célula entra en la fase de división propiamente dicha o mitosis (M). Esta división tiene una duración aproximada de 1 hora y comprende distintas etapas de reorganización interna cuya finalidad es distribuir correctamente el material genético y el resto de orgánulos intracelulares entre las dos células hijas.

**Resultados**

Se utilizó la citometría de flujo para analizar el ciclo celular y la apoptosis en tres experimentos. En el primero de ellos se empleó únicamente taxol en diferentes concentraciones y tras diferentes tiempos de exposición. En los otros dos se combinaron diferentes concentraciones de radón con una concentración de taxol de 50 nM.

En la experiencia con taxol se usaron concentraciones de 25, 50 y 100 nM y en cada caso se esperaron 24, 48 y 72 h. Con respecto al control, los histogramas de representación de la cantidad de ADN celular muestran una reducción del pico G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y la zona S, con un significativo aumento del pico G<sub>2</sub>/M. (Fig. 7.2). Esto es debido a la acumulación de las células en la fase previa a su entrada en mitosis, a causa de la estabilización de los microtúbulos durante la mitosis provocada por el taxol como se ha descrito anteriormente. El análisis de la región sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> o hipodiploide de los histogramas indicó valores bajos de apoptosis aumentando éstos con el tiempo de exposición. En los cultivos de control, la apoptosis se encontró entre el 2 y el 9% tras 24, 48 y 72 horas. Para la concentración más baja de taxol, 25 nM, se obtuvieron valores de 8, 18 y 23 % respectivamente. Usando la concentración más próxima a las usadas terapéuticamente, 50 nM, se obtuvieron resultados ligeramente menores a los anteriores. A las 24 horas había un 6% de células muertas por apoptosis, aumentando al 12 y 18 % a las 48 y 72 horas respectivamente. Por fin, para la concentración mayor, 100 nM, los resultados fueron los más bajos. A las 24 y 48 horas había un 3 y un 9% de muertes por apoptosis, llegándose a un 2 % a las 72 horas. (Tabla 7.5)

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Control</b>	<b>25 nM</b>	<b>50 nM</b>	<b>100 nM</b>
<b>24</b>	3	8	6	3
<b>48</b>	9	18	12	9
<b>72</b>	2	23	18	2

**Tabla 7.5:** Apoptosis con diferentes concentraciones de Taxol, tras 24, 48 y 72 horas

En un segundo experimento se combinaron dosis de radiación alfa de 20 mGy con concentraciones de taxol de 25 y 50 nM. Partiendo de valores de apoptosis bajos (entorno al 2%) y similares en cultivos de control e irradiados, se observó un importante incremento tras el cultivo con las dos concentraciones de taxol. Sin embargo, las diferencias entre células previamente irradiadas y las de las poblaciones de control no resultaron significativas. Tras tres días de cultivo con 25 y 50 nM de taxol, se obtuvieron valores similares en todas las placas, alrededor del 30 %. Con respecto a la fase del ciclo celular de los cultivos cabe añadir que el pico G<sub>2</sub>/M característico de la acumulación provocada por el taxol se mantuvo en todos los casos. (Tabla 7.6)

<b>Condiciones de cultivo</b>	<b>% apoptosis</b>
<b>C</b>	2
<b>T (25 nM)</b>	36
<b>T (50 nM)</b>	29
<b>R-T (25 nM)</b>	34
<b>R-T (50 nM)</b>	31

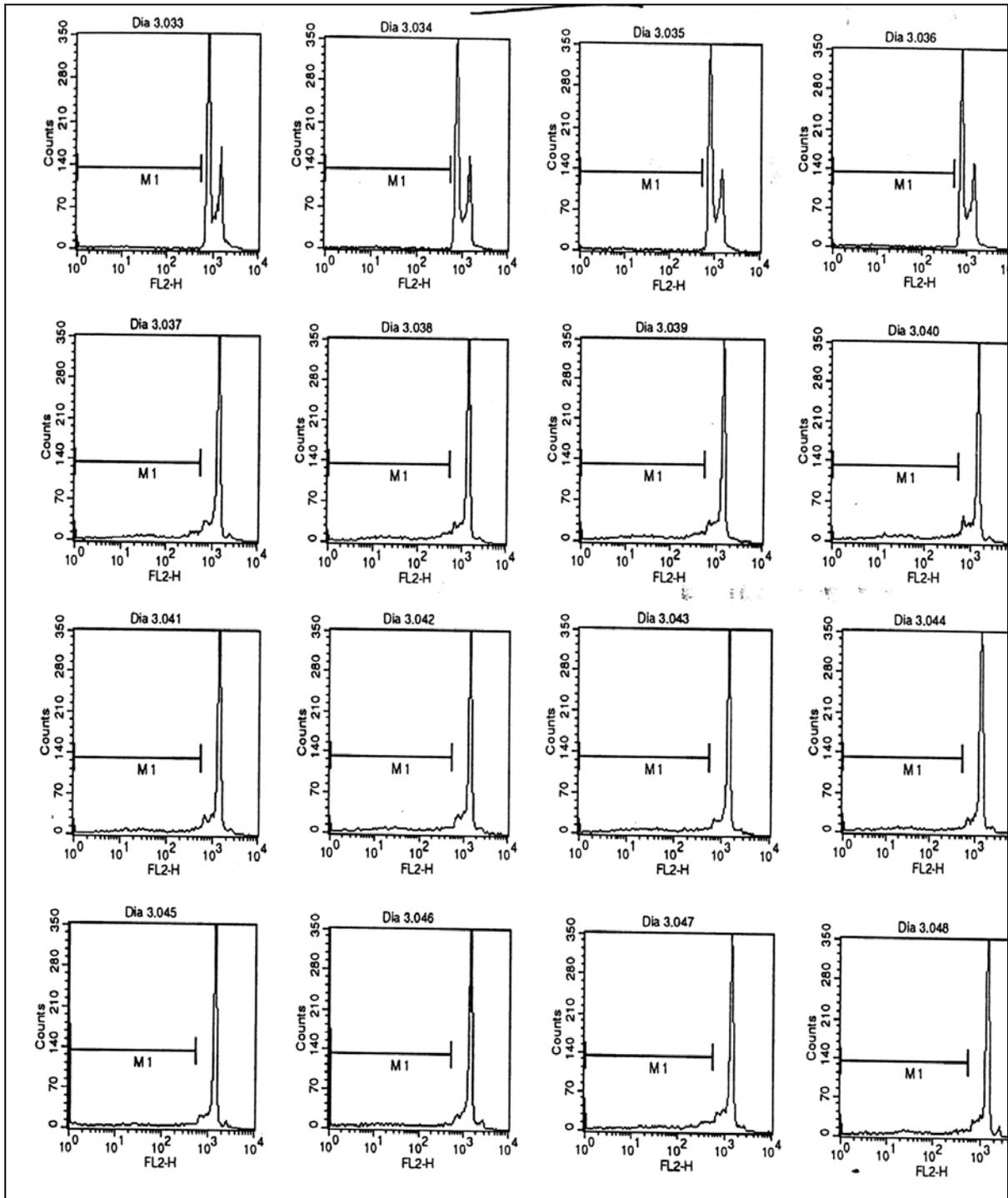
**Tabla 7.6:** Apoptosis en combinación de radón (20 mGy) con diferentes concentraciones de Taxol

En el último experimento se combinó una dosis de 15 mGy con 50 nM de taxol, y con 2000 nM de VP-16 en otras placas. Los cultivos irradiados mostraron histogramas sin diferencias significativas con los controles. Al igual que en las anteriores experiencias descritas, se observa una acumulación de células en fase previa a la mitosis cuando los cultivos se tratan con taxol. La combinación de radón y taxol provocó pequeños aumentos en la proporción de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y en el porcentaje de apoptosis. Mientras que en los controles la apoptosis era de un 3 %, en las células tratadas sólo con taxol fue de un 8 %. En los cultivos irradiados, y posteriormente tratados con taxol, este porcentaje alcanzó el 13 %. (Tabla 7.7).

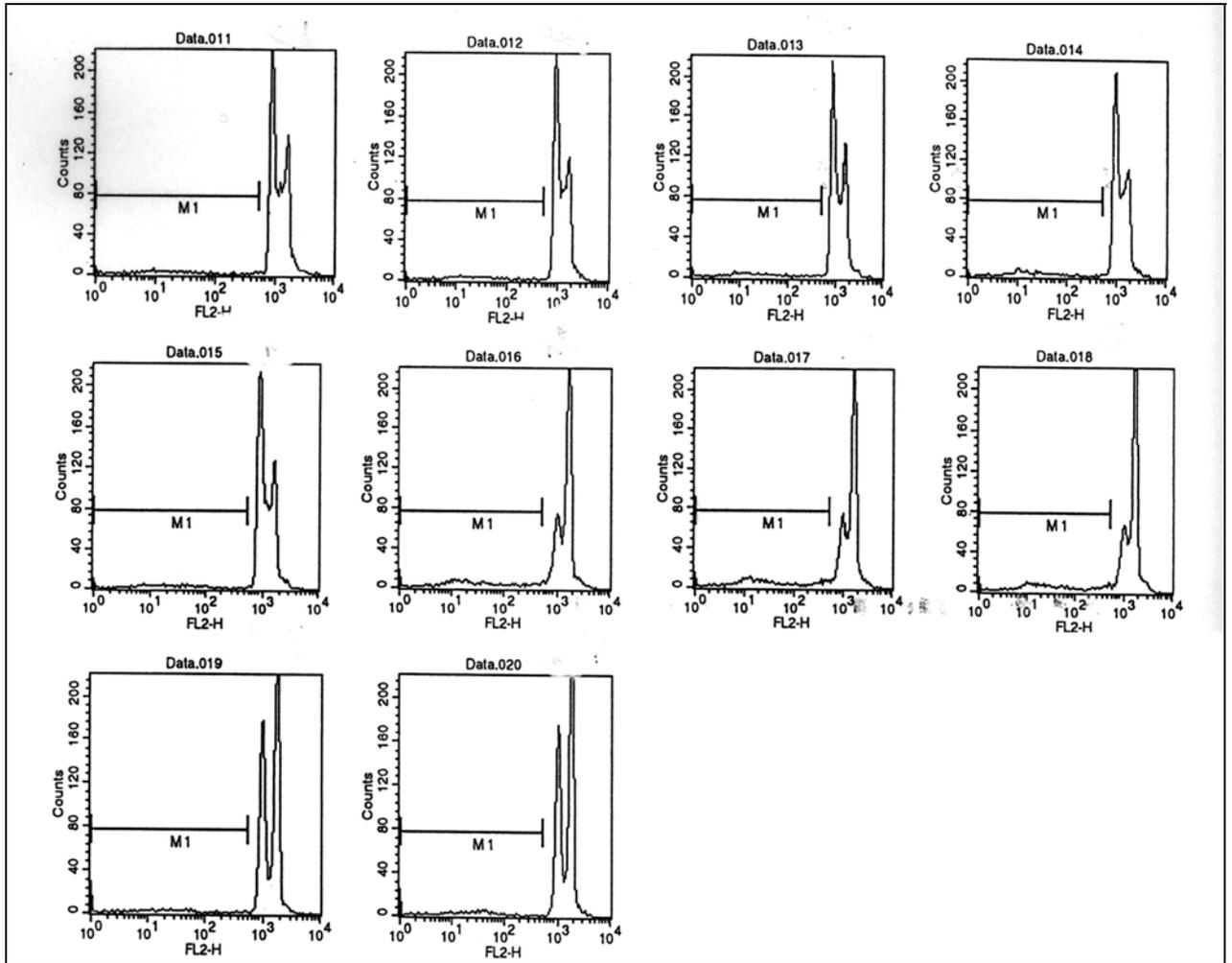
Condiciones de cultivo	% apoptosis
<b>C</b>	3
<b>VP-16</b>	4
<b>T</b>	9
<b>R-T</b>	12
<b>R-VP-16</b>	4

**Tabla 7.7:** Apoptosis en MCF-7, con taxol, VP-16 y radón combinado con cada uno de ellos

Los histogramas correspondientes a cultivos tratados sólo con VP-16 mostraron un aumento significativo del número de células en fase  $G_0/G_1$  con respecto al taxol, tanto en cultivos irradiados como en los de control (Fig. 7.3). En cuanto a la apoptosis, la combinación de radón y VP-16 no dio resultados significativamente diferentes (5%) de los obtenidos por los controles tratados con VP16 (4%)



**Fig. 7.2:** Ejemplo de diagramas obtenidos de la citometría de flujo con diferentes concentraciones de taxol. Las cuatro gráficas superiores corresponden a cultivos control. Las siguientes tres filas corresponden, respectivamente, a concentraciones de Taxol de 25, 50 y 100 nM.



**Fig. 7.3:** Ejemplo de diagramas obtenidos de la citometría de flujo con las combinaciones de radiación-taxol, radiación-VP-16. Las gráficas corresponden a las situaciones: C-C (011-015), R-T (016-018) y R-VP16 (019 y 020)

## **6.-Discusión**

### ***Combinación con Taxol***

La escasez de estudios acerca de la combinación de radiación alfa con fármacos [ROB83, KAD92] hace que resulte difícil entender de que manera las bajas dosis de partículas alfa pueden influir en la acción del taxol.

En la valoración de los efectos combinados hay que tener en cuenta el balance entre lesiones subletales inducidas por la radiación e incrementadas posteriormente por la acción del taxol, y la eficacia de los mecanismos de reparación de dichos daños en las células. Los valores de supervivencia y viabilidad encontrados en los cultivos irradiados antes del tratamiento con taxol indican que las lesiones producidas por las bajas dosis de partículas alfa administradas no resultan suficientes para producir por si solas cambios notables en dichos valores con respecto a los controles.

Un resultado análogo ocurre con la menor concentración de taxol, 20 nM. Por si sola, esta concentración no produce cambios significativos en la supervivencia y viabilidad celulares en comparación con los controles. De igual forma, el conjunto de lesiones producidas por la irradiación y el taxol tampoco resultan suficientes para producir cambios significativos.

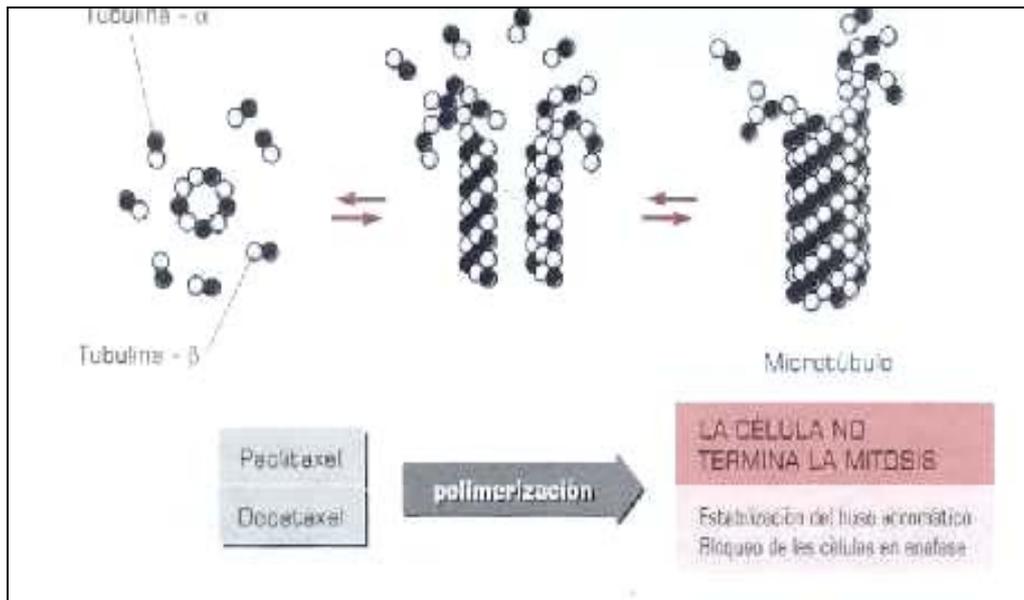
Por el contrario, los 75 nM de taxol inducen daños suficientes en las células para provocar reducciones importantes en la supervivencia y viabilidad de las mismas. Por esta razón, el efecto de las partículas alfa queda minimizado por la acción del taxol sin que se aprecien diferencias significativas entre los cultivos irradiados y los no irradiados.

Finalmente, la mayor concentración de taxol, 100 nM se muestra capaz de eliminar por si sola todo el cultivo sin que haya posibilidad de observar ningún efecto debido a las partículas alfa.

A la vista de lo anterior, los resultados indican que las bajas dosis de partículas alfa empleadas en los experimentos son capaces de potenciar la acción del taxol en concentraciones intermedias (50 nM, del orden de las terapéuticas), resultando su efecto despreciable en combinación con concentraciones bajas (20 nM) o muy altas (75 y 100 nM).

El taxol (paclitaxel) es un diterpenoide (taxano o taxoide) que se extrae del tejo (*taxus brevifolia*). Su obtención ha sido un problema básico desde su descubrimiento. Inicialmente se llevó a cabo la tala de árboles, con un rendimiento reducido, ya que se necesitaba un árbol centenario para purificar 300 mg de taxol. Por otro lado, su síntesis química resulta difícil y costosa, por lo que se ha recurrido a la producción de taxol semisintético a partir de un precursor que se aísla de partes renovables del tejo como las hojas.

Este fármaco actúa uniéndose y promoviendo la polimerización de la  $\beta$  tubulina, proteína mayoritaria de los microtúbulos que forman el huso acromático durante la mitosis (Fig.7.4). De esta forma, el taxol estabiliza los microtúbulos y evita su despolimerización. Pueden distinguirse dos efectos morfológicos sobre dicha estructura: por un lado, la agregación anormal en el citoplasma con apilamiento en paralelo que no está asociada con el centrosoma, y que tiene lugar en todas las fases del ciclo celular inhibiendo la formación del huso acromático normal; y por otro, la formación de husos anormales en células en división activa, que impide la adecuada disposición de los cromosomas en la mitosis. Como resultado de estas acciones, el ciclo celular se detiene antes de entrar en mitosis y por tanto, cesa la proliferación celular. El taxol también afecta a otros procesos no relacionados con el huso acromático, pero que dependen de la función de los microtúbulos, como la movilidad de algunas líneas celulares cancerosas. Además, activa la muerte por apoptosis por fosforilación e inactivación de la proteína bcl-2. También en células de cáncer de mama induce la expresión de los genes p53 y p21, relacionados con el control de daños diversos en el genoma. Su capacidad antitumoral ha sido comprobada en el tratamiento del cáncer de ovario avanzado y en el de mama metastásico [SCH79].



**Fig. 7.4:** Mecanismo de actuación del Taxol (Paclitaxel)

La explicación del efecto combinado debe encontrarse en una acción complementaria de la radiación alfa y el taxol que esté relacionada con la apoptosis, ya que éste es el principal mecanismo de actuación del quimioterápico. El cambio en la expresión de algunos miembros de la familia de genes bcl-2 parece estar detrás de este tipo de respuestas como se ha mencionado anteriormente. Resulta también interesante considerar la posibilidad de un efecto aumentado por vías dependientes del gen p53. Este gen está encargado de controlar la funcionalidad e integridad estructural del ADN (por eso es llamado a veces “guardián del genoma”) y de otros componentes celulares como el huso acromático durante la mitosis. En células de cáncer de mama, está descrito que el taxol induce la expresión de las proteínas p53 y p21. El aumento en los niveles de estos dos productos, especialmente de p53, se produce en respuesta a una variedad de daños producidos en la célula. Si estos daños resultan excesivos, p53 inicia un proceso de regulación en la expresión de los genes bcl-2 y bax, que da lugar a la muerte celular por apoptosis. En este sentido, la radiación alfa podría iniciar, a través de lesiones en estructuras vitales de la célula, este proceso, potenciando la acción del taxol.

### ***Combinación con VP-16***

Los resultados acerca de la supervivencia y viabilidad de las células MCF-7 tratadas con radiación y VP-16, muestran que en las concentraciones empleadas, la contribución de la radiación alfa al efecto del quimioterápico es menor que en el caso del taxol. No obstante, en algunos casos se pudo observar un efecto significativo de la combinación con respecto a la administración del fármaco sólo.

Para la menor concentración de VP-16, 500 nM, las células fueron irradiadas previamente con una dosis de 2.8 mGy. Los valores de supervivencia, tanto en el caso de VP-16 sólo, 98 %, como combinado con radiación, 85 %, no resultaron significativamente diferentes de los obtenidos en el control. La viabilidad de las células supervivientes fue del 66 % en los cultivos tratados con VP-16, y del 54 % en los previamente irradiados. En ninguno de los dos casos las diferencias introducidas por la irradiación previa resultaron significativas.

Los cultivos tratados con 1000 nM de VP-16 fueron irradiados con una dosis de 3 mGy. Los resultados de este experimento fueron similares a los obtenidos con la concentración de 500 nM, aunque en este caso tanto la supervivencia como la viabilidad resultaron considerablemente menores que en los controles. La supervivencia promedio en los cultivos tratados sólo con VP-16 fue del 82 %, resultando viables un 61 % de las células supervivientes. Cuando las células fueron previamente irradiadas con 3 mGy de partículas alfa, estos valores fueron del 85 y 67 % respectivamente. De nuevo, los cambios en la supervivencia y la viabilidad producidos por la irradiación no resultaron significativos.

En los dos experimentos en los que se administró la mayor concentración de VP-16, 2000 nM, los resultados fueron más interesantes. En el primero de ellos las células fueron previamente irradiadas con 2.7 mGy. En este caso, tanto la supervivencia como la viabilidad resultaron muy bajas en todos los casos, y significativamente menores que en los controles. En los cultivos no irradiados, estos valores resultaron ser del 40 y 31 % respectivamente, y en los previamente tratados con irradiación alfa, del 43 y 22 %.

En el último caso con 2000 nM de VP-16 se obtuvieron los mejores resultados. Las células fueron previamente irradiadas con una dosis de 15 mGy. La supervivencia fue significativamente menor que en los controles tanto en las células tratadas con VP-16 sólo, como en las tratadas con radiación y fármaco. Además, estos valores, 23 y 13 % respectivamente, resultaron significativamente diferentes entre sí. Igualmente, la viabilidad de las células supervivientes fue muy baja, resultando del 6 % en las células tratadas con VP-16 sólo, y únicamente del 2 % en las tratadas con el fármaco después de ser irradiadas.

De nuevo, la explicación de esta potenciación de las bajas dosis de partículas alfa al efecto del VP-16 resulta complicada. Aunque en un principio se pensó que el VP-16 actuaba bloqueando la formación del huso acromático, se ha comprobado que este mecanismo sólo actúa en concentraciones de 4 a 6 veces superiores a las farmacológicamente activas en animales y seres humanos. Esta estimación es difícil de hacer en nuestros experimentos *in vitro*, considerándose como concentraciones altamente citotóxicas a aquellas que son capaces de acabar con todo el cultivo. Este parece ser el caso de las concentraciones de VP-16 por encima de 2000 nM.

No obstante, se sabe que el VP-16 inhibe la actividad de la topoisomerasa II cuando esta enzima intenta reunir las roturas de la doble hélice de ADN causadas previamente [KRI75]. La estabilización de estas roturas dobles lleva a la célula a morir por apoptosis por mecanismos probablemente mediados por el gen supresor de tumores p53.

Aunque los resultados son menos notables que los obtenidos para el taxol, los mecanismos de sensibilización de la radiación alfa pueden ser similares. La producción de radicales libres en el medio inter e intracelular pueden iniciar una serie de procesos hacia la apoptosis regulados por p53, que actúa como sensor del estrés oxidativo. Como ya se mencionó, este gen activa la expresión de inductores de apoptosis como bax, reprimiendo paralelamente la acción de inhibidores como bcl-2. Sin haber estudiado específicamente la expresión de p53, la ruptura del equilibrio entre genes inductores/inhibidores de apoptosis por la radiación ha sido observada y muy probablemente se encuentre en la causa de los efectos observados.

Este tipo de estudios in vitro constituye una base fundamental para plantear una posible utilización clínica de bajas dosis de radiación alfa. Para ello resulta imprescindible la realización de estudios acerca de los efectos que dichas dosis provocan en células sanas. En este sentido, utilizando el mismo método de irradiación, hemos obtenido previamente indicios de que estas dosis de radiación alfa no influyen en el crecimiento de poblaciones de fibroblastos [SOT96b]. Adicionalmente, el carácter gaseoso del radón añadiría la posibilidad de irradiación a todo el cuerpo, por inhalación, transporte por la sangre y disolución en los tejidos, con acción sobre metástasis alejadas del foco tumoral.