



---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Medicina  
Departamento de Estudios Avanzados  
Maestría en Ciencias de la Salud

**“Efecto de la concentración de glucosa en la respuesta radiobiológica de células de cáncer de páncreas”**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta:

Francisco Javier Vázquez Romero

Comité de Tutores

Director: Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez

Codirector: Dra. Ninfa Ramírez Durán

Asesor: Dra. Erika Patricia Azorín Vega

Toluca, Estado de México

2020

### **Aviso de autoría**

Yo, Francisco Javier Vázquez Romero, autor responsable de la presente **Tesis**, la cual lleva como título: **“Efecto de la concentración de glucosa en la respuesta radiobiológica de células de cáncer de páncreas”** y en representación de los coautores:

- a) Dr. Martín Pablo Antonio Moreno Pérez
- b) Dra. Ninfa Ramírez Durán
- c) Dra. Erika Patricia Azorín Vega

Declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante, y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma del Estado de México.

## INDICE

	No. página
Resumen	4
Summary:	6
1. Antecedentes	8
1.1. Cáncer	8
1.2. Parámetros biológicos	10
1.3. Líneas celulares	13
1.4. Radiación	15
2. Planteamiento del Problema	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
5. Justificación	22
6. Material y Métodos	23
6.1. Diseño de estudio	23
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	23
6.3. Procedimientos	23
6.4. Variables de Estudio	29
6.5. Implicaciones Bioéticas	31
6.6. Recolección de Datos	31
6.7. Análisis Estadístico	31
7. Referencias bibliográficas	32
8. Anexos	36
8.1. Carta de envío del artículo	36
8.2. Resumen del artículo	37

## Resumen:

El cáncer es una patología que se caracteriza por la diseminación, proliferación y crecimiento incontrolado de células. Actualmente en México el cáncer causa anualmente el 13.5% de las defunciones registrándose aproximadamente 130,000 casos nuevos de cáncer al año. El cáncer de páncreas ocupa el primer lugar en la categoría de cáncer de órganos digestivos con 32 muertes por cada 100,000 habitantes. Este tipo de cáncer tiene la tasa más baja de supervivencia asociado con su difícil diagnóstico debido a que comparte la sintomatología con otras patologías; dentro de los síntomas más frecuentes se puede describir: dolor abdominal, pérdida de peso inexplicable, falta de apetito, dolor en hemi-cinturón, ictericia e indigestión. Los factores de riesgo que desencadenan esta patología son: edad mayor a 60 años, sobrepeso, pancreatitis, tabaquismo, diabetes y antecedentes familiares de cáncer. Existen diversos tratamientos contra el cáncer de páncreas, entre ellos: quimioterapia, resección quirúrgica y radioterapia. La radioterapia ha coadyuvado a la muerte de células cancerígenas por medio de la aplicación de radiación ionizante. El isótopo más utilizado es el Cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ), el cual emite radiación de tipo gamma, que es un tipo de radiación electromagnética que puede lesionar y producir la muerte de las células en las que incide. Se ha observado una estrecha relación entre la hiperglucemia asociada a diabetes *mellitus* y el cáncer de páncreas siendo la hiperglucemia una condición que se presenta con frecuencia en el microambiente del tumor. A la fecha no existen estudios que intenten relacionar la presencia de un microambiente hiperglucémico con la respuesta a la terapia con radiación. El objetivo de este estudio fue analizar la respuesta de las células de cáncer de páncreas tratadas con altas concentraciones de glucosa a la radiación emitida por una fuente de  $^{60}\text{Co}$ . Para ello, se utilizó la línea celular AR42J correspondiente a cáncer de páncreas. Se establecieron dos grupos experimentales, uno de células expuestas a un ambiente normoglucémico y el segundo de células tratadas en un ambiente hiperglucémico, ambos, se irradiaron a dosis de 2, 4, 6, 8 y 10 Grays (Gy) y posterior a la irradiación, se midieron parámetros biológicos como: muerte celular radio-inducida, apoptosis, daño al ADN, activación de la maquinaria de reparación de daño al ADN, capacidad clonogénica, sobrevivencia y radio-resistencia. La exposición de las células AR42J a altas concentraciones de glucosa previo (48h) a la irradiación, modificó significativamente las respuestas radiobiológicas.

El ambiente hiperglucémico favoreció la muerte celular inducida por radiación activando rápidamente y desde dosis de radiación bajas ( $>2\text{Gy}$ ) las vías apoptóticas aumentando significativamente el daño al ADN. Adicional a esto, el ambiente hiperglucémico modificó la cinética de activación de la maquinaria de reparación (fosforilación de H2AX) anulando la reparación de los daños al ADN. Los eventos bioquímicos desencadenados por la exposición previa al ambiente hiperglucémico condicionan a la célula y afectan la tasa de sobrevivencia reduciendo notablemente su capacidad clonogénica. El análisis de las curvas de sobrevivencia, de las células AR42J expuestas a hiperglucemia, confirmó que el tratamiento con altas concentración de glucosa anula los mecanismos de reparación (no se observa el hombro de la curva) disminuyendo significativamente la radio-resistencia de estas células.

## Summary:

Cancer is a pathology characterized by the spread, proliferation, and uncontrolled growth of cells. Currently in Mexico, cancer causes 13.5% of deaths annually; approximately 130,000 new cases of cancer are registered each year. Pancreatic cancer is the most common of those in the category of cancer of the digestive organs with 32 deaths per 100,000 inhabitants. This type of cancer has the lowest survival rate because its diagnose is difficult due to the symptoms it shares with other pathologies; among the most frequent symptoms we can describe are: abdominal pain, unexplained loss of weight, lack of appetite, pain in the hemi-belt, jaundice and indigestion. Se ha observado una estrecha relación entre la hiperglucemia asociada a diabetes mellitus y el cáncer de páncreas siendo la hiperglucemia una condición que se presenta con frecuencia en el microambiente del tumor. A la fecha no existen estudios que intenten relacionar la presencia de un microambiente hiperglucémico con la respuesta a la terapia con radiación. The risk factors that trigger this pathology are age over 60 years, overweight, pancreatitis, smoking, diabetes, and family history of cancer. There are several treatments against pancreatic cancer, including: chemotherapy, surgical resection, and radiotherapy. Radiation therapies have contributed to the death of cancer cells through the application of ionizing radiation. The most widely used isotope is Cobalt-60 ( $^{60}\text{Co}$ ), which emits gamma-type radiation, a type of electromagnetic radiation that can damage and produce cells death. It has been observed a strong correlation between hyperglycemia due to diabetes *mellitus* and pancreatic cancer. Hyperglycemia is a commonly presented condition of the tumor microenvironment and actually there are not reports that correlates the presence of an hyperglycemic microenvironment with radiotherapy efficiency. The aim of the present study was to analyze the response of pancreatic cancer cells, treated with a high concentration of glucose, to the radiation emitted by a source of  $^{60}\text{Co}$ . For this project, AR42J cell line corresponding to pancreatic cancer was used. Two experimental groups were established, one of cells exposed to normoglycemic conditions and the second one of cells cultured in a hyperglycemic condition. Both groups were irradiated to a final absorbed radiation dose of 2, 4, 6, 8 and 10 Grays (Gy) then biological parameters such as cell death, apoptosis, DNA damage, activation of DNA repairing machinery, clonal capacity, survival and radioresistance were evaluated.

Exposition of AR42J cells to high glucose concentrations 48 h prior irradiation, significantly affect cell response. Hyperglycemic microenvironment favors radiation induced cell death that is quickly activated by low radiation doses ( $<2\text{Gy}$ ) apoptosis though increasing DNA damage. Moreover, hyperglycemic microenvironment alters kinetic activation of repairing machinery (H2AX phosphorylation) avoiding DNA strand breaks repair. Biochemical events triggered by previous exposition of cells to high concentrations of glucose, condition cells and affect survival rate reducing clonal cell capacity. Analysis of cell survival curves, confirms that hyperglycemia avoid cell repairing and significantly reduces cell radioresistance.

## **1. Antecedentes:**

### **1.1. Cáncer**

#### **1.1.1. Generalidades del cáncer**

El cáncer es una patología que se caracteriza por el crecimiento y diseminación descontrolado de células en un tejido, esta patología puede llegar a generar neoplasias o tumores malignos y su etiología es multifactorial. Se distingue por una generación rápida de células anormales, las cuales crecen de una manera desorganizada más allá de sus límites, estas células anormales pueden invadir zonas y generar mayor descontrol del crecimiento y diseminación a órganos o tejidos que se encuentran contiguos, a este proceso se le denomina metástasis<sup>1</sup>. Actualmente se conocen más de 100 tipos de cáncer, la mayoría son denominados por el órgano o el tejido donde se propaga en un inicio<sup>2</sup>.

#### **1.1.2. Epidemiología del Cáncer a nivel mundial**

Las últimas valoraciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés)<sup>3</sup> definieron que en el año 2012 más de 14 millones de casos nuevos de cáncer fueron diagnosticados y más de 8 millones de personas murieron por esta causa. Algunas otras estimaciones dictaminan que puede llegar a convertirse en la primera causa de muerte en algunos años, así mismo, esta patología podría convertirse en un obstáculo para aumentar la esperanza de vida en todos los países del mundo en el siglo XXI<sup>4</sup>. Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2015, el cáncer se estableció como la primera y segunda causa de muerte antes de los 70 años en 91 de los 172 países analizados, ocupando el tercer o cuarto lugar en otros 22 países analizados.

#### **1.1.3. Epidemiología del cáncer en México**

En los últimos años, el cáncer ha incrementado su incidencia en todo el mundo, en México durante el año 2013 esta patología representó la tercera causa de muerte<sup>5</sup>. El cáncer de páncreas es la principal causa de defunciones asociadas a tumores malignos en los órganos del aparato digestivo, seguida por aquellos asociados con los órganos del aparato reproductor, seguido de los del aparato respiratorio e intratorácicos y el de mama<sup>6</sup>.



#### 1.1.4. Tratamientos del cáncer

Los tratamientos que recibe un paciente dependerán del tipo de cáncer y del estadio en el que se encuentre<sup>7</sup>:

- **Cirugía:** su principal objetivo es la extirpación del tumor, reducir el volumen del mismo o aliviar los síntomas propios de la patología.
- **Radioterapia:** el fundamento de este tratamiento es entregar altas dosis de radiación al tumor y así evitar recidivas, con este tratamiento se espera detener y retardar tanto el crecimiento como la diseminación de las células.
- **Quimioterapia:** hace uso de medicamentos para combatir la proliferación de las células tumorales.
- **Terapias dirigidas:** en este tratamiento se usan sustancias que pretenden bloquear el crecimiento y la propagación de las células de cáncer mediante moléculas con reconocimiento específico también llamadas blancos moleculares.

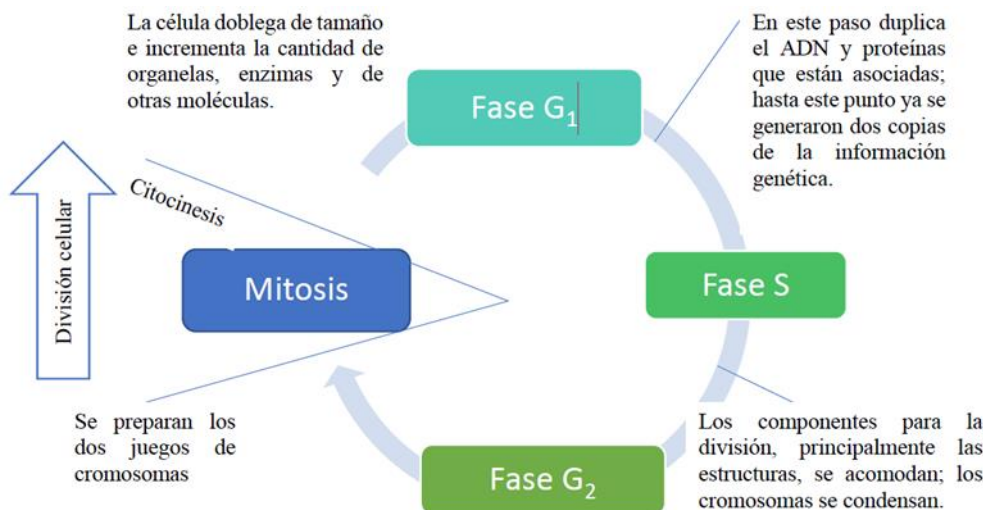
#### 1.1.5. Cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas (CP) es considerado uno de los tipos de cáncer más fulminante, suele diagnosticarse en fases tardías de su evolución, regularmente menos del 20% de los pacientes son candidatos a una resección tumoral curativa<sup>8</sup>. La edad avanzada es uno de los factores de riesgo más importantes, pues el 80% de los casos comienza entre los 60–80 años, raramente aparece antes de los 40 años<sup>9</sup>. El principal factor para el desarrollo de CP es la predisposición genética. Se calcula que arriba del 10% de los pacientes diagnosticados con CP tiene algún familiar en primer o segundo grado con esta enfermedad<sup>10</sup>. Uno de los principales factores de riesgo medioambiental para el desarrollo de CP es el consumo de tabaco, pues se estima que éste causa hasta el 25% de los tumores de páncreas<sup>11</sup>. Algunos estudios mencionan que la diabetes *mellitus* está fuertemente asociada al CP y se ha observado que podría estar asociado con la alta recurrencia de éste<sup>12</sup>.

## 1.2 Parámetros biológicos

### 1.2.1 Generalidades del ciclo celular

Un objetivo primordial de las células es su duplicación o división, ya que por este medio transmiten la información contenida en su material genético (ADN). La forma como heredan la información genética generación tras generación es mediante el ciclo celular<sup>13-14</sup>. Dentro del ciclo celular (Fig. 1) existen mecanismos que coordinan la duplicación del ADN y que regulan la división celular, esto con el fin de generar células nuevas durante el desarrollo embrionario o para la reparación de órganos dañados<sup>15</sup>.



**Figura 1.** Fases del ciclo celular. Fuente: modificado de <https://www.researchgate.net/publication/319478487>

Como ya se mencionó, el ciclo celular es el proceso de una célula mediante el cual crece y se divide para originar una copia de sí misma, dentro de este proceso la célula crece y madura para reemplazar a las células desgastadas o muertas. Comúnmente, una célula normal completa un ciclo celular desde el inicio al final en 24 horas, sin embargo, existen excepciones, por ejemplo, las células de la piel e incluso las células de cáncer que están en constante replicación además de que completan el ciclo celular en poco tiempo, generando clonas con mayor rapidez. Existen otras condiciones fisiológicas en las que las células no entran al ciclo celular para proliferar. El ciclo celular conlleva una secuencia de eventos cuya finalidad es estimular a las células para crecer y dividirse.

Este proceso inicia cuando las células están en reposo, a este primer paso se le conoce como fase G<sub>0</sub>, en esta fase las células tienen que ser estimuladas por factores de crecimiento que son desarrollados conforme a las necesidades fisiológicas para inducir la entrada en el ciclo celular. La fase G<sub>1</sub> es el primer periodo de crecimiento, durante el cual la célula crece físicamente, copia organelos y desarrolla los principales componentes moleculares que le serán de utilidad en etapas posteriores del proceso. En la siguiente fase, que es conocida como fase S, la célula prepara la síntesis del ADN, realizando una copia exacta del material genético. La fase final G<sub>2</sub> es la etapa en que la célula crece más, conforma organelos y produce proteínas para prepararse para la división durante la fase de división celular mejor conocida como mitosis o fase M<sup>16-17</sup>.

Así mismo el ciclo celular cuenta con puntos de control que aseguran que las células en condiciones desfavorables no se dividan. Los puntos de control dentro del ciclo celular incluyen las fases de transición G<sub>1</sub>-S, G<sub>2</sub>-M y la transición de metafase a anafase. Es durante el punto de control en G<sub>1</sub> que la célula elige si entrar a división o no, si la célula no recibe señales de división, se queda latente en una fase G<sub>0</sub>. Cuando la célula ingresa a la fase S, la división es irreversible; sin embargo, en este punto se verifica el tamaño de la célula, los nutrientes, los factores de crecimiento y si existe algún daño en el ADN. Mientras que en la transición de la fase G<sub>2</sub> a M la célula evalúa el daño en el ADN y si éste fue replicado correctamente. Cuando la célula detecta algún daño o falla de replicación se activan mecanismos que buscan solucionar el problema, en algunas ocasiones el daño es irreparable y como consecuencia la célula entra en apoptosis para evitar que el daño se herede a las células hijas, sin embargo, durante la carcinogénesis este paso es evadido por los mecanismos propios de la célula tumoral de modo que célula mutada continua su división heredando las mutaciones (daños en el ADN) a las células hijas; es por ello que la transición de la fase G<sub>2</sub> a la fase M es primordial en la carcinogénesis y progresión del cáncer. El punto de control de la transición de metafase a anafase comúnmente conocido como punto de control del huso analiza si todas las cromátidas están correctamente unidas a los microtúbulos del huso evitando así poliploidías. Todos estos procesos están controlados por vías de señalización internas que frecuentemente están alteradas en las células de cáncer promoviendo el crecimiento descontrolado de células dañadas<sup>18-20</sup>.

### **1.2.2 Muerte celular**

Un organismo pluricelular está conformado por una comunidad muy organizada de células, la velocidad y el número de células que conforman un organismo está perfectamente regulada, por mecanismos que controlan la velocidad de la división celular y otros la muerte de las células (apoptosis, o mejor conocida como muerte celular programada). Esta muerte celular programada elimina a las células que ya no son necesarias mediante la activación del mecanismo de muerte celular fisiológica. Cuando una estructura anatómica deja de ser necesaria también se activan los mecanismos de muerte celular. La muerte celular es uno de los procesos más importantes para mantener el equilibrio orgánico, existen episodios donde las células mueren como consecuencia de una lesión aguda, que generalmente es patológica, en estos casos su mecanismo principal es el aumento de volumen para así explotar, durante este proceso, su contenido celular se derrama sobre las células circundantes, a este proceso de muerte celular se le conoce comúnmente como necrosis<sup>21</sup>.

### **1.2.3 Metabolismo celular**

Las células tumorales realizan una reprogramación en su metabolismo energético con la finalidad de cubrir las altas demandas de energía, así las células mantienen un crecimiento rápido y descontrolado. Regularmente, las células consideradas normales hacen uso de la fosforilación oxidativa para obtener energía y así poder realizar sus procesos celulares; sin embargo, en las células tumorales se presentan muchos cambios metabólicos de manera que cambia el manejo de los nutrientes favoreciéndose el consumo de glucosa a través de la glucólisis anaerobia, mediante un proceso conocido como efecto Warburg<sup>22-23</sup>. Cuando se incrementa la glucólisis anaerobia, la célula adquiere la capacidad de incrementar sus características de proliferación, al generar recursos energéticos suficientes (ATP y otros intermediarios como el ácido láctico). En las células normales, el metabolismo está regulado por los sistemas de control que previenen la diseminación descontrolada<sup>24</sup>, pero en las células tumorales existen mecanismos que ayudan a sobrepasar los puntos de control y así generar mutaciones genéticas heredables. Las mutaciones genéticas pueden estar latentes durante mucho tiempo y uno de sus objetivos es alterar el funcionamiento de algunas vías de señalización encargadas de regular la reprogramación del metabolismo.

Las modificaciones que se generan de este proceso aumentan la utilización de los nutrientes y del metabolismo para mantener el requerimiento energético necesario para la supervivencia y la proliferación celular<sup>25-26</sup>. El metabolismo de la glucosa juega un papel fundamental en las células tumorales, puesto que se encuentra vinculado con el centro de control del crecimiento, activando y silenciando genes pro-tumorales, los cuales fomentan la proliferación celular descontrolada<sup>27-28</sup>.

### **1.3 Líneas celulares**

#### **1.3.1 Generalidades del cultivo celular**

El origen del cultivo de células o cultivo tisular *in vitro* comenzó en el siglo XIX, como una alternativa para analizar con mayor facilidad el desarrollo de las células estando exentas de los mecanismos naturales que se presentan dentro del organismo. En un inicio se comenzó utilizando fragmentos de tejidos los cuales contenían diferentes tipos de células y había restricciones en el crecimiento que no permitían simular una situación con mayor naturalidad. Subsecuente a esto, se comenzaron a realizar cultivos con fragmentos de tejidos disgregados, los cuales presentaban un crecimiento adecuado, gracias a que las células se encontraban dispersas. Años más tarde, se logró el cultivo de células durante largos periodos en condiciones asépticas, siempre que se asegurara la disponibilidad de nutrientes propios para cada tipo de célula<sup>29</sup>.

A los cultivos celulares se les clasifica de acuerdo con sus características:

- 1.- De adherencia o no adherencia a la superficie de cultivo (en monocapa o suspensión).
  - a) Cultivos en monocapa: en este tipo de cultivo las células tienen la capacidad de adherirse a la superficie del cultivo, cuando se establece un contacto entre sí, se inhibe la multiplicación celular entrando en una etapa de quiescencia. Las células más favorecidas por esta condición son las provenientes de cultivos primarios, debido a su mecanismo de estabilidad de genes y su naturalidad diploide. Los contenedores más recomendados para realizar el cultivo de este tipo de células son las cajas de Petri y los frascos para los cultivos de tejidos (Roux), estos contenedores pueden ser de plástico o de cristal los cuales deben de ser previamente tratados para favorecer la adhesión de las células y esterilizados para evitar el crecimiento indeseado de microorganismos contaminantes.

Para la obtención de muestras celulares de este tipo de cultivos, las células deben ser desprendidas de las superficies mediante agentes proteolíticos como la tripsina.

b) Cultivos en suspensión: en este tipo de cultivos las células tienen la capacidad de desarrollar un crecimiento y división sin necesidad de permanecer adheridas a una superficie. De modo que las células pueden realizar estos procesos flotando en el medio de cultivo.

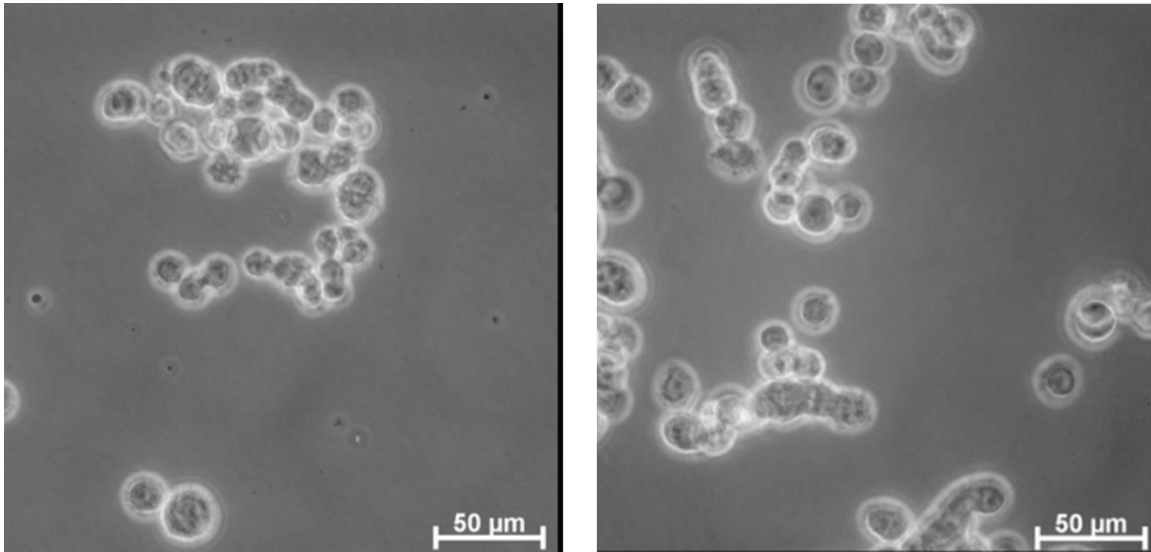
2. Origen de las células:

a) Cultivos primarios: son cultivos que derivan de células que han sido obtenidas de órganos fetales, usualmente recién sacrificados. Las características distintivas de las líneas celulares incluyen: la posibilidad de conservar la morfología original de las células del órgano del que fueron obtenidas conserva su número cromosómico diploide ( $2n$ ), su crecimiento *in vitro* es limitado ya que se inhibe por el contacto con otras células. Al ser fisiológica y morfológicamente más parecidas a las células originales, reflejan una actividad y comportamiento parecido al que presentan las células *in vivo*.

b) Líneas celulares: estas células regularmente provienen de tejido tumoral o son el resultado de la transformación artificial de las células de un cultivo primario, utilizando oncogenes o tratamientos carcinogénicos, lo que les otorga un fenotipo totalmente diferente al de las células de inicio. En este tipo de cultivo no está presente la inhibición por contacto y el crecimiento es indefinido. Se le considera transformación a la transición de una célula de un cultivo primario a una línea celular. Esta transformación, puede ser inducida fisiológicamente mediante hormonas (hidrocortisona) o utilizando inductores no fisiológicos (N, N-dimetilfingosina)<sup>30</sup>.

### **1.3.2. Línea celular AR42J**

La línea celular AR42J (Fig. 2) proveniente de tejido exocrino de páncreas, cuenta con una morfología epitelial. Las células AR42J requieren de características atmosféricas especiales (5% de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) en aire, humedad al 85% y temperatura de  $37^\circ C$ ), estas células crecen lentamente en grupos que tienden a apilarse<sup>31</sup>.



**Figura 2.** Micrografía representativa del crecimiento *in vitro* de la línea celular de adenoma pancreático de rata (AR42J). En el panel de la izquierda se observan las características morfológicas de las células en un cultivo semi-confluyente y a la derecha la organización en cúmulos de un cultivo con mayor confluencia celular.

## **1.4. Radiación**

### **1.4.1 Generalidades de la radiación**

La radiación es la expresión de la energía que se trasmite mediante el espacio en forma de partículas u ondas electromagnéticas. Esta energía, puede tener un mayor o menor impacto dependiendo de su amplitud, frecuencia y velocidad. Existen diferentes formas de emisión de la radiación (luz ultravioleta, calor, microondas, rayos X y rayos gamma entre otras)<sup>23</sup>.

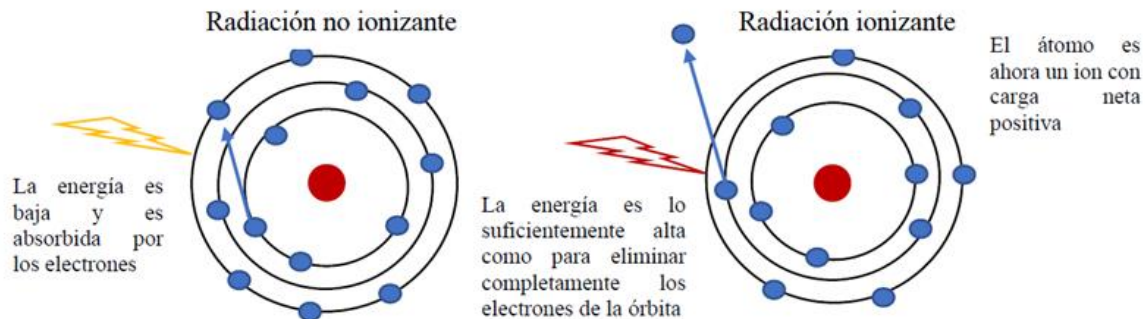
La radiación electromagnética tiene la característica de ser una emisión de energía a través de ondas magnéticas y eléctricas que se dispersan gracias a los electrones que se propagan como partículas o como fotones a una velocidad de 300,000 km/seg o  $3 \times 10^5$  Km/seg en el campo del espectro electromagnético. Los diferentes tipos de radiación electromagnética son clasificados por su frecuencia como radiaciones ionizantes y no ionizantes<sup>32</sup>.

### **1.4.2 Tipos de Radiación**

Con mayor frecuencia la radiación ionizante emite su energía a través de ondas electromagnéticas y con una longitud de onda más corta en comparación con la radiación no ionizante, generando una liberación de energía por medio de fotones o partículas, con la

energía suficiente para romper los enlaces covalentes dentro de las moléculas formándose así iones y radicales libres (Fig. 3). Este rompimiento de los enlaces dentro de las moléculas de importancia biológica conduce a daños en las células, en los tejidos y en el organismo.

Por el lado contrario, la radiación no ionizante no cuenta con la energía suficiente para romper enlaces moleculares y los daños biológicos que produce no son tan severos<sup>33</sup>.



**Figura 3.** Tipos de radiación. Modificado de: <https://education.pasco.com/epub/PhysicsNGSS/FirstPage.html>

### 1.4.3. Radiación Gamma

Es un tipo de radiación electromagnética de alta energía producida por el cambio del estado energético de un electrón (pasa de un estado de mayor energía a uno más bajo), que con mucha regularidad es emitido de inmediato o bien posterior a una desintegración alfa o beta, también puede producirse como consecuencia de la aprehensión de un neutrón y de la disgregación inelástica de las partículas subatómicas por los núcleos. Cuando los fotones gamma interactúan con la materia frecuentemente colisionan con los electrones de las capas electrónicas de átomos más externas que se cruzan en su trayecto. Durante este proceso, pierden muy lentamente su energía, por lo que tienen la capacidad de atravesar grandes distancias<sup>34</sup>.

### 1.4.4 Radiación con Cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ )

En la radioterapia se utilizan equipos con fuentes de  $^{60}\text{Co}$  que basan su funcionamiento en la



liberación de ondas o partículas de alta energía, llamadas rayos gamma, que generalmente son utilizados para terapias médicas con el fin de suprimir o generar un daño a las células de cáncer. La radioterapia es una de las opciones terapéuticas más utilizadas contra el cáncer<sup>35</sup>. Es frecuente que la irradiación con haces externos sea parte del plan terapéutico de diversos tipos de cáncer, por ejemplo, para los tumores de cabeza y cuello, vejiga, pulmón y leucemias, entre otros. En el organismo las células de diferentes tipos de tejidos crecen y se dividen con el fin de formar nuevas células o como mecanismo de recuperación de las células dañadas o viejas, sin embargo, las células tumorales realizan este proceso de una forma descontrolada y con mayor rapidez que las células normales.

La radiación actúa de dos maneras: de manera directa generando rupturas sobre el ADN<sup>36</sup> o bien de modo indirecto a través de la hidrólisis de la molécula de agua. Las rupturas en el ADN generadas por la radiación tienen la finalidad de evitar el crecimiento y la división de las células cancerígenas es por ello por lo que con frecuencia estas rupturas causan la muerte de las células. Una desventaja del uso de esta terapia es que las células consideradas normales, cercanas también se afectan con la radiación. Cabe mencionar que muchas de las células normales se recuperan y vuelven a ser funcionalmente normales<sup>37</sup>. Las terapias médicas que utilizan los rayos gamma, se basan en maquinaria de uso médico que incluye fuentes radiactivas de <sup>60</sup>Co. Las máquinas de <sup>60</sup>Co emiten radiación con una energía promedio de 1.25 MeV y requieren mantenimiento continuo para garantizar su funcionalidad y evitar fugas de radiación. Dada la energía de las emisiones gamma, el manejo y almacenamiento de las fuentes de <sup>60</sup>Co alojadas en este tipo de máquinas debe realizarse en un sitio denominado recinto, el cual está blindado con plomo para de esta forma evitar que la radiación salga del cabezal del equipo cuando se está aplicando el tratamiento. La radiación que logra salir del sitio blindado se conoce como radiación dispersa y puede llegar a otras partes del cuerpo del paciente aportando dosis menores de radiación que pueden tener un efecto sobre las células. La radiación que es medida en Kerma (*kinetic energy released per unit mass*) se conoce como radiación de fuga, y es un tipo de energía que es liberada por cada unidad de masa en un punto<sup>38</sup>.

#### **1.4.5 Efectos biológicos de la radiación**

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes son clasificados de distinta manera, en relación con la dosis absorbida en efectos estocásticos o de dosis baja y efectos determinísticos cuando la dosis recibida es superior a un umbral. Esta clasificación está sustentada por el marco de la protección radiológica. Los efectos biológicos de la radiación se fundamentan por medio de la mutación genética y la muerte celular. Una importante característica del proceso carcinogénico es la secuencia de cambios genéticos, los cuales pueden verse reflejados en la muerte celular como resultado de posibles daños en el tejido sano. Varios estudios experimentales y epidemiológicos han demostrado que a pesar de que la carcinogénesis puede ser radio-inducida, la radiación también es uno de los principales pilares para el tratamiento curativo del cáncer<sup>39</sup>.

Cuando la radiación interactúa con los tejidos vivos, a menudo, las funciones celulares comienzan a deteriorarse de forma temporal o permanente y como resultado puede causarse la muerte celular. El daño celular producido por la radiación depende de factores como el tipo de radiación, la dosis absorbida, la sensibilidad del tejido ante la radiación y la velocidad de reparación<sup>40</sup>.

## **2. Planteamiento del Problema:**

La Organización Mundial para la Salud define que el cáncer es un conjunto de patologías que se caracteriza por el desarrollo del crecimiento descontrolado y la diseminación de células mutadas que son incapaces de regular su muerte, generan masas anormales que son mejor conocidas como tumores; que pueden aparecer en cualquier parte del organismo. La Agencia para la Investigación del Cáncer, señaló que se registraron 14 millones de casos con una incidencia de 8.2 millones de muertes a causa de esta patología, así como 32.6 millones de pacientes que pudieron sobrevivir a este ente patológico (o bien, que durante al menos 5 años posteriores al diagnóstico no presentaron alguna recurrencia). El cáncer es la tercera causa de muerte en México y cada año surgen 128,000 casos aproximadamente. Por otro lado, la diabetes es una enfermedad crónico- degenerativa que se presenta una vez que el páncreas es incapaz de producir suficiente insulina o bien cuando, aun habiendo insulina en el organismo, el cuerpo no puede utilizarla de forma adecuada. En México, la prevalencia de diabetes paso de 9.2% en el año 2012 a 9.4% en el año 2016. Se sabe que existe una asociación entre la diabetes *mellitus* y el cáncer de páncreas, ahora bien, si la diabetes *mellitus* es la consecuencia del CP o es la causa, aun es discutible. Aproximadamente 50% de las personas que cursan con neoplasia de páncreas desarrollan diabetes *mellitus* y pacientes mayores de 50 años con diagnóstico de diabetes *mellitus*, pueden desarrollar una tumoración pancreática en un periodo no mayor a 2.5 años. Las opciones de tratamiento para el cáncer de páncreas disponibles son: quimioterapia, radioterapia o cirugía. En el tratamiento con radiación, o medicamento conocido como radioterapia, el tipo de radiación que es más común como opción terapéutica del cáncer de páncreas es la radioterapia con rayos externos, este tipo de terapia consiste en aplicar radiación desde una fuente externa direccionada hacia el tumor. Sin embargo, aún no se ha estudiado el efecto de la concentración de glucosa periférica (glicemia) sobre la eficiencia de la radioterapia en el cáncer de páncreas.

### **Pregunta investigación:**

¿Cuál es la respuesta radiobiológica de las células de cáncer de páncreas expuestas a una concentración elevada de glucosa (ambiente hiperglucémico) con respecto a la condición fisiológica al ser irradiadas con una fuente externa de  $^{60}\text{Co}$ ?

### **3. Hipótesis:**

#### **Hipótesis nula:**

La exposición a una concentración elevada de glucosa no modificará la respuesta radiobiológica (muerte celular radio-inducida, apoptosis, daño al ADN, activación de la maquinaria de reparación de daño al ADN, capacidad clonogénica, sobrevivencia y radio-resistencia) de las células de cáncer de páncreas.

#### **Hipótesis alterna:**

La exposición a una concentración elevada de glucosa modificará la respuesta radiobiológica (muerte celular radio-inducida, apoptosis, daño al ADN, activación de la maquinaria de reparación de daño al ADN, capacidad clonogénica, sobrevivencia y radio-resistencia) de las células de cáncer de páncreas.

#### **4. Objetivos:**

##### **General:**

Analizar la respuesta radiobiológica de las células de cáncer de páncreas expuestas a altas concentraciones de glucosa.

##### **Específicos:**

- Examinar el daño citotóxico (muerte celular radio-inducida) producido en las células de cáncer de páncreas sometidas a un microambiente hiperglucémico tras ser irradiadas con  $^{60}\text{Co}$ .
- Comparar el efecto de la exposición a altas concentraciones de glucosa en la activación de la apoptosis celular antes y después de la irradiación con  $^{60}\text{Co}$ .
- Evaluar el efecto de la exposición a altas concentraciones de glucosa en el daño al ADN y en la activación de la maquinaria de reparación de daño al ADN después de la irradiación con  $^{60}\text{Co}$ .
- Medir los cambios en la capacidad clonogénica de las células expuestas a altas concentraciones de glucosa después de la irradiación con  $^{60}\text{Co}$  y con base en ello generar las curvas de sobrevida para las células AR42J bajo condiciones hiperglucémicas.
- Analizar la curva de sobrevida de las células AR42J hiperglucémicas y determinar su radioresistencia.

## 5. Justificación:

El CP es una patología muy agresiva con un alto índice de mortalidad debido a la dificultad para diagnosticarlo oportunamente. Actualmente la supervivencia de los pacientes que padecen CP no supera el año. Una de las complicaciones del CP es que durante el tratamiento y como consecuencia de la enfermedad los pacientes desarrollan diabetes *mellitus*. Actualmente, se desconoce la influencia que pudiera llegar a generar el aumento en la concentración de glucosa en sangre en la eficiencia del tratamiento con radiación.

En México, tanto la quimioterapia como la radioterapia son los tratamientos de elección para este padecimiento, generando altos costos al sector salud, mayoritariamente sin lograr una mejoría o éxito óptimo para los pacientes que reciben este tipo de tratamientos. Los tratamientos de radioterapia externa comúnmente utilizan fuentes de  $^{60}\text{Co}$  para disparar radiación de tipo gamma al sitio donde se han localizado las células de cáncer, con la finalidad de destruirlas, o bien, demorar el crecimiento del tumor. Sin embargo, a la fecha no se ha estudiado el efecto de la glucemia en la efectividad del tratamiento con  $^{60}\text{Co}$ .

El mantener una línea celular de cáncer de páncreas en un ambiente semejante al fisiológico, brinda la oportunidad de medir con mayor precisión la respuesta tanto funcional como metabólica que tienen las células ante diferentes estímulos como son la exposición a un ambiente hiperglucémico y el tratamiento radioterapéutico.

El cultivo *in vitro* de la línea celular AR42J, en microambientes con diferentes concentraciones de glucosa, nos permitió tener un modelo adecuado para analizar algunas de las respuestas citotóxicas, genotóxicas y bioquímicas de las células tales como la muerte celular radio-inducida, apoptosis, daño al ADN, activación de la maquinaria de reparación de daño al ADN, capacidad clonogénica, sobrevivencia y radio-resistencia posterior a la irradiación con  $^{60}\text{Co}$ .

Con ello fue posible discernir la relación entre el microambiente glucémico (concentraciones de glucosa en el medio) en el que se encontraban las células de CP y la exposición a la radiación proveniente de una fuente de  $^{60}\text{Co}$ .

## **6. Material y Métodos:**

### **6.1. Diseño de Estudio**

Tipo de estudio:

- Estudio experimental

Universo:

- Células de cáncer de páncreas

Método de muestreo:

- Por conveniencia

Tamaño de muestra:

- No aplica.

Se utilizan suspensiones celulares con un promedio de  $1 \times 10^6$  células/mL y los experimentos se realizan por triplicado.

### **6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

Criterios inclusión:

- Cultivos de células de cáncer de páncreas (línea celular AR42J), con un porcentaje de viabilidad superior al 85% y libres de contaminación por microorganismos.

Criterios exclusión:

- Cultivos de células contaminados con microorganismos.
- Cultivos de células con un porcentaje de viabilidad <85%

### **6.3. Procedimientos**

#### **6.3.1 Cultivo celular**

##### **6.3.1.1 Preparación de medio de cultivo**

Se pesaron los elementos sólidos en una balanza analítica electrónica: medio RPMI-1640 2.525g, bicarbonato de sodio 0.5g y HEPES 0.65g; se disolvieron en 150 mL de agua tipo 1. Se ajustó el pH a  $7.4 \pm 0.2$  y se aforó a 250 mL. Se quitaron 50 mL de la solución y se agregaron los suplementos líquidos: suero bovino fetal 25 mL y antibiótico 2.5 mL, se mezcló y aforo a 250 mL con el medio que se había retirado. Dentro de una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad.

La solución se filtró con una unidad de filtración utilizando una bomba de vacío y se depositó en recipientes estériles. Se rotuló con el nombre del medio, la fecha y el nombre de quien lo preparó.

### **6.3.1.2 Descongelamiento de células AR42J**

Se tomó un criovial con células AR42J del tanque de nitrógeno líquido, trabajando lo más rápido posible para evitar la muerte de las células, se permitió que se descongelaran lentamente. Se llevaron a la campana de flujo laminar y el contenido del vial se transfirió a un tubo cónico de 15 mL con 5 mL de medio de cultivo. Las células fueron centrifugadas a 3,000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrante. Posteriormente el botón de células se resuspendió suavemente en 4 mL de medio fresco y la suspensión celular se transfirió a una caja de cultivo que se rotuló con el nombre de las células y el nombre de quien descongeló. El cultivo celular se mantuvo en incubación a 37°C, 85% de humedad en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> reemplazando el medio de cultivo por medio fresco cada 72 h.

### **6.3.1.3 Obtención de células en suspensión**

Una vez que el cultivo celular alcanza la confluencia, el cultivo se lavó con PBS estéril y se trató con una solución de tripsina/EDTA (0.25/0.03%) para despegar las células de la caja. Las células suspendidas se recuperaron y se lavaron con medio RPMI-1640. Posteriormente, se determinó el número y viabilidad de las células con el ensayo de exclusión de azul tripano.

### **6.3.1.4 Tratamiento de células AR42J**

Se prepararon dos grupos experimentales: el grupo control (CTL) el cual se mantuvo con una concentración estándar y fisiológica de glucosa (células que crecieron en medio de cultivo RPMI el cual contenía 5 mM de D-glucosa) y el grupo hiperglucémico (HG) el cual se conservó durante 48 h en medio RPMI al que se le adicionó D-glucosa hasta obtener una concentración final de 35.5 mM. Adicionalmente y para considerar el efecto de la presión osmótica derivada del incremento de solutos en el medio, se utilizó un grupo de control



osmótico (CTLosm) el cual fue conformado por células crecidas en medio RPMI suplementado con manosa a una concentración final de 35.5 mM.

## 6.3.2 Irradiación

### 6.3.2.1 Cálculo del tiempo de irradiación

Para la irradiación de las células en suspensión, se utilizó una fuente de  $^{60}\text{Co}$  contenida en un irradiador gamma (Gammacell 220, USAEC) en el Departamento del Irradiador Gamma del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ). A partir de la tasa de irradiación, se calculó la tasa de dosis absorbida en agua para el día en que se realizó la irradiación de las células; de ese modo, se establecieron los tiempos óptimos en que debían ser expuestas las células a la fuente de  $^{60}\text{Co}$  a fin de alcanzar las dosis de radiación absorbida deseadas. Sabiendo que:

$$A = A_o e^{-\lambda t}$$

Entonces,

$$\dot{D} = \dot{D}_o e^{-\lambda t}, \quad \lambda = \text{Ln}2 / \tau_{1/2}$$

Por lo tanto

$$\dot{D} = \dot{D}_o e^{-\left(\frac{\text{Ln} 2 (t)}{\tau_{1/2}}\right)}$$

Donde

- $\dot{D}$  Tasa de dosis que deseamos conocer en el tiempo t
- $\dot{D}_o$  Tasa de dosis conocida, obtenida en la calibración de la fuente de radiación

Así tenemos que:

$$\text{Tiempo de irradiación} = \frac{D_w}{\dot{D}}$$

$D_w$ : Dosis absorbida deseada

### **6.3.2.2 Irradiación celular**

Las suspensiones celulares fueron colocadas en viales de lucita los cuales se acomodaron dentro de un contenedor cilíndrico, sólido de material equivalente al tejido y a 4°C. Los viales se alinearon de tal forma que el campo de radiación los cubriera por completo. Los tiempos de irradiación se programaron de acuerdo con los cálculos previos, la administración de la radiación gamma fue en una sola exposición en un intervalo de dosis de 0-10 Gy. Para cada dosis de radiación estudiada, se irradiaron tres tubos con suspensión celular y de cada uno de ellos se tomó una alícuota que contenía el número de células en suspensión requerido para cada ensayo, en función del protocolo a seguir para la medición de los diferentes parámetros biológicos estudiados. Simultáneamente, se conservaron muestras sin irradiar tanto para el grupo normoglucémico como para el grupo hiperglucémico a manera de control.

### **6.3.3 Evaluación de parámetros biológicos**

#### **6.3.3.1 Viabilidad**

La viabilidad de las células después del tratamiento se determinó por citometría de flujo con el kit de conteo celular y viabilidad (cell count & viability kit, MUSE millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. De forma breve, se tomaron 450 µL del reactivo de conteo y Viabilidad, se agregaron a 50 µL de la suspensión celular ( $8 \times 10^3$  células) incubándolas 5 minutos a temperatura ambiente. Cabe mencionar que previamente se habían establecido los límites para las células AR42J, de acuerdo con la intensidad de la fluorescencia del marcador de viabilidad celular y el tamaño celular. Para lograr diferenciar una célula viva de una muerta, se formaron dos grupos. El control positivo (CTL+) constó de células cultivadas en medio completo mientras que el control negativo (CTL-) correspondió a un grupo de células

tratadas durante 3 minutos con hipoclorito de sodio en una concentración 10 M para inducir la muerte de las células. A partir de estos grupos, se establecieron las ventanas para la detección de las poblaciones celulares considerando que las células que se alejaban de la población general desplazándose hacia la esquina superior derecha correspondían con las células muertas o no viables, cuadrante ocupado mayoritariamente por el grupo CTL-.

Esta lectura se validó con el grupo CTL+ cuyas células presentaron una viabilidad superior al 85% y se concentraron en el centro y alejadas de la línea divisoria entre la población de células vivas y muertas. Estas mediciones fueron corroboradas mediante el ensayo de exclusión de azul tripano que, bajo observación directa de las células en el microscopio, permitió conocer el número total de células en suspensión y la proporción de células vivas y muertas en esta población. Estos valores, se utilizaron para calificar la confiabilidad de la ventana de detección establecida para la medición por el método de citometría de flujo del daño citotóxico en la línea celular AR42J.

### **6.3.3.2 Apoptosis**

La distribución de células apoptóticas se determinó usando el kit de Anexina V y muerte celular (Muse Merck, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante; de forma breve, después de dar el tratamiento correspondiente (hiperglucemia + irradiación), las células colectadas se diluyeron en una solución de bloqueo (albumina 1%) y se incubaron con el anticuerpo anti-Anexina V y el reactivo de muerte celular durante 20 min a temperatura ambiente. La relación de células apoptóticas en cada muestra se determinó mediante la identificación de cuatro poblaciones: (i) células no apoptóticas, células entrando en apoptosis aquellas negativas para anti-Anexina V y 7-aminoactinomicina D (7-AAD); (ii) células en apoptosis temprana aquellas positivas para anti-Anexina V y negativas para 7-AAD; (iii) células en apoptosis tardía positivas para anti-Anexina V y 7-AAD; (iv) células muertas a través de una vía no apoptótica negativas para anti-Anexina V y positivas para 7-AAD. En este caso, los límites de detección para cada población se establecieron considerando un grupo control el cual fue tratado con peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) en una concentración final de 250  $\mu$ M durante 1 h en medio libre de suero.

### **6.3.3.3 Daño al ADN**

La determinación cualitativa y cuantitativa del daño al ADN se hizo por citometría de flujo mediante la detección de la activación de la cinasa ATM y la fosforilación de la histona H2AX con el kit de detección de daño al ADN (MCH200107, Merck Millipore, Germany) de manera general, se tomaron  $2 \times 10^5$  células, se fijaron y permeabilizaron antes de incubarlas con la mezcla de anticuerpos Anti-phospho-ATM (Ser-1981) y Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser-139) durante 30 minutos.

Posteriormente el exceso de anticuerpo se lavó y las células se re-suspendieron en el amortiguador de ensayo para su análisis en el equipo de citometría Muse. A manera de control positivo del daño al ADN se utilizó un grupo de células las cuales fueron irradiadas con 10 Gy; condición en la cual se había verificado previamente mediante ensayo cometa que se producía una significativa ruptura del ADN.

La determinación del daño al ADN por este método se realizó inmediatamente después de la irradiación (manteniendo las células en hielo a fin de evitar la reparación del daño) y después de permitir la acción de los mecanismos de reparación a las 24 h posteriores a la irradiación para medir la eficiencia de la reparación de los daños mediante la comparación de la cantidad de daños remanente a las 24 h con respecto al daño total detectado inmediatamente. Dado que el ensayo se basa en la detección de las formas fosforiladas (activas) de ATM y H2AX, también se analizaron los cambios en la cinética de activación de ambas proteínas en función de la dosis por la pre-incubación en un ambiente hiperglucémico.

### **6.3.3.4 Ensayo clonogénico**

El ensayo clonogénico es una técnica que nos provee información sobre la capacidad de las células para dividirse y generar una célula viable idéntica (clona). En general, las suspensiones celulares de los dos grupos experimentales (células control y células expuestas al microambiente hiperglucémico) después de ser irradiadas a diferentes dosis de radiación entre 2-10 Gy fueron diluidas hasta una concentración final de 500 células/mL, se colocaron en placas de 12 pozos en condiciones estándar, permitiendo su proliferación durante dos semanas. Al término de este periodo, las clonas se fijaron con PFA 2% durante 48h a 4°C, se

lavaron dos veces con PBS y agua. Posteriormente, las clonas se tiñeron con una solución de cristal violeta 0.1% por 30 minutos y se lavaron tres veces con agua. Se obtuvieron fotografías de las placas las cuales fueron analizadas con el software ImageJ. A fin de hacer una medición relativa de la cantidad de clonas. Adicionalmente, se extrajo el colorante con ácido acético 10% para hacer la medición cuantitativa mediante la medición de la densidad óptica a 590 nm en un espectrofotómetro de placas Epoch 2 (BioTek Instruments, USA). El número de colonias detectadas en los grupos no irradiados se utilizó para calcular la eficiencia del cultivo (PE) y al relacionar este parámetro con el número inicial de células sembradas y el número de colonias detectadas después de la irradiación a las diferentes dosis se obtuvo el valor de fracción de sobrevivencia.

Se graficó el valor de fracción de sobrevivencia en función de la dosis para generar las curvas de sobrevivencia para las células AR42J normoglucémicas e hiperglucémicas y a partir del análisis visual de éstas determinar bajo que condición las células eran más radioresistentes.

#### **6.4. Variables de Estudio**

##### **Dependientes:**

- Muerte celular (apoptosis)
- Daño al ADN
- Capacidad clonogénica

##### **Asignación:**

- Concentración de glucosa
- Dosis de radiación

**Tabla 1.** Operacionalización de variables.

<b>Variables</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operativa</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Análisis Estadísticos</b>
<b>Variables dependientes</b>					
Muerte celular	Cese de las funciones vitales de la célula.	Presencia de Anexina V en la membrana celular. Instrumento de medición: citometría de flujo	Categórica	Presente/ Ausente	Descriptivos
Daño al ADN	Formación de rupturas de doble cadena del ADN.	Fosforilación de la H2A.X y ATM	Categórica	Presente/Ausente	Descriptivo
Proliferación celular	Aumento del número de células como resultado de la división celular.	Existencia de células generadas. Instrumento de medición: citometría de flujo.	Categórica	Presente/ Ausente	Descriptivos <i>t</i> de student
<b>Variable de asignación</b>					
Concentración de glucosa	Cantidad de glucosa que se encuentra en un medio.	Medio de glucosa a: 5.5mM y hasta 35.5mM	Cuantitativa	mM	Descriptivos ANOVA

## **6.5 Implicaciones Bioéticas**

El desarrollo del proyecto se rigió por las recomendaciones emitidas en la clasificación de seguridad en biotecnología en las Pautas del Servicio de Salud Pública de E.E.U.A, en las recomendaciones del proveedor de la línea celular (ATCC, USA) y en la norma mexicana NOM-087-Semarnat-SSA1-2002 para el manejo de residuos peligrosos biológico infecciosos.

## **6.6 Recolección de Datos**

Base de datos en el paquete estadístico Graph Pad Prisma 7.

## **6.7 Análisis Estadísticos**

Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar. La comparación entre la media de los grupos se evaluó por la prueba estadística *t* de Student usando el programa Graph Pad Prisma 7, considerando una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa.

## 7. Referencias Bibliográficas:

1. Bustamante LM, Marín SJ y Cardona D. (2012). Mortalidad por cáncer: segunda causa de muerte del adulto mayor en Medellín, 2002-2006. Revista Facultad Nacional de Salud Pública, 30 (1), 17-25. disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnsp/v30n1/v30n1a03.pdf>
2. ¿Qué es el cáncer? [Internet]. Estados Unidos de América; Instituto Nacional del Cáncer. 2020 disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Diks R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N°11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2012. disponible en: [http://globocan.iarc.fr/old/age-specific\\_table\\_r.asp?selection=224900&title=World&sex=0&type=0&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0](http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=224900&title=World&sex=0&type=0&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0)
4. World Health Organization. Global Health Observatory. Geneva: World Health Organization; 2018. Disponible en: [who.int/gho/database/en/](http://who.int/gho/database/en/).
5. Ordóñez NA, Becerra M, Monroy Z. La beneficencia del médico en el tratamiento del enfermo con cáncer terminal desde la experiencia del familiar. Acta bioethica. [internet] 2018; 24(1), 57-65. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S1726-569X2018000100057>
6. INEGI [internet] México. 2014. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer Disponible en: [http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer\\_0.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer_0.pdf)
7. NIH [Internet]. Medicina de precisión y terapia dirigida. Estados Unidos de América. Instituto Nacional del Cáncer. 2020. Disponible en: <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>.
8. Donghui LI, Keping MD, Robert MD y Abbruzzese MD. Pancreatic cancer. The Lancet. Seminar [internet] 2004; 363 (9414). 2004. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)15841-8/fulltext#secd198966648e999](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)15841-8/fulltext#secd198966648e999).



9. Lillemoe KD, Yeo CJ y Cameron JL. Pancreatic cancer: state of the art care. *CA Cancer J Clin.* 2000 Julio; 50 (4):241-68.
10. Brand RE, Lynch HT. Hereditary pancreatic adenocarcinoma. A clinical perspective *Med. Clin North Am.* 2000; 84 (1): 665-675.
11. Lowenfels AB y Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best practice and Research Clinical Gastroenterology.* 2006; 20(2): 197-209.
12. Teich N. Pancreatic cancer: Cause and result of diabetes mellitus *Gastroenterology. AGA Journal.* 2008; 134 (1): 344-345
13. López S y Lizano S. Cáncer cérvicouterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina, *Cancerología.* 2006; 1(1): 31-55.
14. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K y Walter P. *Introducción a la biología celular.* 2a edición. México. Editorial Médica Panamericana. 2006.
15. Burgués G, Pontones M, Vera D, Jiménez C y Ozonas M. Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga, *Actas Urológicas Españolas.* 2005; 29 (9): 846-859.
16. Lagunas MC, Valle A y Soto I. Ciclo celular: mecanismos de regulación. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud.* 2014; 17(2): 98-107.
17. De Toro G. Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular, VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. [internet] 2006. Disponible en: <http://conganat.cs.urjc.es/index.php/conganat>.
18. Pickup, M. W., Mouw, J. K., and Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer (La matriz extracelular modula los sellos distintivos del cáncer). *EMBO Reports.* [internet] 2014; 15(12): 1244. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15252/embr.201439246>.
19. Han Z, Chatterjee D, He DM, Early J, Pantazis P, Wyche JH y Hendrickson EA. Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation (Evidencia de un punto de control G2 en la inducción de la apoptosis independiente de p53 por radiación con rayos X). *Molecular and Cellular Biology.* [internet] 1995; 15 (11): 5849. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.15.11.5849>.

20. Gorbsky GJ. The mitotic spindle checkpoint (El punto de control del huso mitótico). *Current Biology*. [internet] 2001; 24(11): 1001. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00609-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00609-1).
21. Freshney R. Culture of animal cells. A manual of basic technique, 6<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell New York, EE. UU. 2014.
22. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123(1): 309–14.
23. Warburg O, Posener, K, Negelein, E. Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift*. 1924; 152: 319–44.
24. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009; 324:1029-1033.
25. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008; 7: 11-20.
26. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 2008; 134: 703-707.
27. Cairns RA, Harris I, McCracken S, Mak TW. Cancer cell metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2011; 76: 299-311
28. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*, 2008; 13: 472–482.
29. Vunjak-Novakovic G. Freshney R. Basic principles of cell culture. In *Culture of cells for tissue engineering*. John wiley & sons, Inc. New Jersey, EE. UU. 2006.
30. Ficha Técnica AR42J (ATCC® CRL-1492™)
31. Springber GG, Rabin LC. Para entender las radiaciones. Uruguay; DIRAC. 2011.
32. Rojas MK. Radiación electromagnética. [internet] Bucaramanga, Colombia. Universidad Pontificia Bolivariana; 2009. Disponible en: [https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/432/digital\\_17516.pdf?sequence=1](https://repository.upb.edu.co/bitstream/handle/20.500.11912/432/digital_17516.pdf?sequence=1)
33. Carrasco JL. Radiaciones Ionizantes y no ionizantes aplicaciones y riesgos. *Radio física Hospitalaria*. 2003; 36(10).
34. Cherry RN. Fuentes de radiación ionizante. Radiaciones ionizantes de Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. 2020: 2 (48). Disponible

en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/48.pdf>.

35. Gaceta de Madrid (Antiguo BOE) 10 de agosto de 1920.
36. Khune M, Riballo E, Rief N, Rothamm K, et al; A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res* 2004; 64 (1):500.
37. Fred A. Mettler, Jr. M.D.Arthur C,Upton, MD; *Medical Effects of Ionizing Radiation* 2da edition.
38. Galiano PS. “Introducción a la física de la radioterapia”. Unidad de Radio física. Hospital Central de Asturias.
39. Mozdarani H. Biological complexities in radiation carcinogenesis and cancer radiotherapy: impact of new biological paradigms. *Genes (Basel)*. 2012; 3 (90): 90-114.
40. Barrio JP, Hernández RM, Costilla S, Rodríguez JR, Ferreras MC, González P. Estudio experimental sobre los efectos de la quercetina en la disfunción orgánica y cognitiva originada por radiación ionizante. *Trauma*. 2013; 24 (1): 24-32.

## 8. Anexos:

### 8.1 Carta de envío del artículo

→ [https://www.elsevier.com/evise/faces/pages/mlanding/Mslanding.jspx?\\_adf.ctrl-state=lgpnzu3oz\\_617](https://www.elsevier.com/evise/faces/pages/mlanding/Mslanding.jspx?_adf.ctrl-state=lgpnzu3oz_617)

**Archives of Medical Research** Pablo Pablo | My Journals | Log Out | Help **EVISE**

Home Reports

The cross-check reports are currently unavailable, we are working to restore service as soon as possible. The COVID-19 pandemic impacts us all, and we are offering all possible support to our customers and employees. While at present there has been no major impact to our business or services, we ask for your understanding that this unprecedented situation might lead to some delays in the peer review process. For further support, please visit our Covid-19 community resilience resources center: [www.elsevier.com/community-resilience-resources](http://www.elsevier.com/community-resilience-resources).

ARCMED\_2020\_857 | Full Length Article  
**Radiobiological Response of Pancreatic Cancer Cells cultured over Hyperglycemic Microenvironment Conditions**  
Pablo Pablo | Universidad Autónoma del Estado de Mexico, Mexico.  
Status: **With Editor (0 days)** | Submitted: **01Jun/2020**

Overview

**Other Authors** [Show Details](#)  
Francisco Javier Vázquez Romero (Unirsidad Autónoma del Estado de México), ERIKA AZORIN-VEGA (Instituto Ncional de Investigaciones Nucleares), Ninfa Ramirez-Durán (Universidad Autónoma del Estado de México) [Contact Editorial Team](#)

**Abstract**  
The most common and lethal gastrointestinal tumor is pancreatic adenocarcinoma characterized by its poor prognosis because it is difficult to detect, resistant to therapy and extremely lethal. Pancreatic adenocarcinoma mortality risk increases 2.2 fold by systemic hyperglycemia. In recent years production of diabetogenic substances by pancreatic adenocarcinoma has been reported. The aim of the present investigation was to analyze the influence of glucose on the radiobiological response of pancreatic adenocarcinoma cells in vitro. To do this, pancreatic adenocarcinoma cell lines were exposed to a high glucose culture media (300 mM) for 96 h prior irradiation (0- 10 Gy) with a Gammacell 220 system before analyzing their clonal capacity. The survival fraction calculated show us that hyperglycemic microenvironment is an important factor that should be considered in order to obtain better radiotherapy treatment effectiveness since hyperglycemic microenvironment common in this pathology promotes pancreatic cells radioresistance and induce a severe increase in cell proliferation.

**Keywords**  
Pancreatic Cancer Cells; Hyperglycemic, radioresistance; glucose

[Additional Information](#)

[References](#)

#### RV: Successfully received: submission Radiobiological Response of Pancreatic Cancer Cells cultured over Hyperglycemic Microenvironment Conditions for Archives of Medical Research

Ref: ARCMED\_2020\_857  
Title: Radiobiological Response of Pancreatic Cancer Cells cultured over Hyperglycemic Microenvironment Conditions  
Journal: Archives of Medical Research

Dear Dr. Pablo,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Archives of Medical Research. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.elsevier.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL\\_ACR=ARCMED](http://www.elsevier.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=ARCMED) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Archives of Medical Research

#### Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

## 8.2 Resumen del artículo

### **Radiobiological Response of Pancreatic Cancer Cells cultured over Hiperglycemic Microenvironment Conditions**

Vázquez-Romero FJ.<sup>1</sup>, Azorín-Vega EP.\*<sup>2</sup>, Ramírez-Durán N.,<sup>1</sup> Moreno-Pérez MPA.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50180, México

<sup>2</sup> Departamento de Materiales Radiactivos, Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Ocoyoacac, 52750, Estado de México, México

#### ABSTRACT

The most common and lethal gastrointestinal tumor is pancreatic adenocarcinoma characterized by its poor prognosis because it is difficult to detect, resistant to therapy and extremely lethal. Pancreatic adenocarcinoma mortality risk increases 2.2 fold by systemic hyperglycemia. In recent years production of diabetogenic substances by pancreatic adenocarcinoma has been reported. The aim of the present investigation was to analyze the influence of glucose on the radiobiological response of pancreatic adenocarcinoma cells *in vitro*. To do this, pancreatic adenocarcinoma cell lines were exposed to a high glucose culture media (300 mM) for 96 h prior irradiation (0- 10 Gy) with a Gammacell 220 system before analyzing their clonal capacity. The survival fraction calculated show us that hyperglycemic microenvironment is an important factor that should be considered in order to obtain better radiotherapy treatment effectiveness since hyperglycemic microenvironment common in this pathology promotes pancreatic cells radioresistance and induce a severe increase in cell proliferation.

#### KEYWORDS

Pancreatic Cancer Cells; Hiperglycemic; Radioresistance; Glucose.