



Universidad Autónoma del Estado de México



Facultad de ciencias

“Efecto radiosensibilizador de la difluorodesoxicitidina (dFdC) en células de la médula ósea de ratones in vivo”

Tesis que para obtener el título de

Biólogo

Presenta: Sofia López Pavón

Directora de tesis: Dra. Carla García Morales

Codirector de tesis: Dr. Pedro Morales Ramírez

Toluca, Estado de México, 7 de mayo 2018.

Agradecimientos:

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones nucleares por permitir la realización de ésta tesis, a la Universidad Autónoma del Estado de México por brindarme las bases para la realización de la misma.

A mis padres que han tenido infinita paciencia y me han apoyado de manera incondicional.

Especial agradecimiento al Doctor Pedro Morales y personal del laboratorio (Teresita, Vicky, Miguel, Francisco) por transmitirme sus conocimientos y por su paciencia a lo largo de la elaboración.

Además de ellos, son muchas las personas que han contribuido en cierta forma a mi persona y a mi trabajo, desde mi formación hasta quienes me acompañaron en el proceso de la realización de la presente tesis, a quienes tengo mucho que agradecerles y que por temor a omitir a alguien no los mencionaré, pero me gustaría recalcarles lo importantes que son para mí.

Índice.

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	18
Importancia del problema.....	29
Pregunta de investigación.....	30
Método.....	31
Resultados.....	42
Discusión.....	58
Conclusiones y perspectivas.....	62
Bibliografía.....	66

Resumen

La sinergia de agentes ha sido ampliamente empleada en terapia de cáncer, incluso la sinergia entre agentes químicos y la radiación. Hay evidencia contradictoria con respecto al efecto radiosensibilizador de la difluorodesoxicitidina (dFdC). El presente trabajo pretende ver el efecto que tiene el pretratamiento con dFdC sobre la inducción de daño al ADN por radiación ionizante en células de la médula ósea de ratón *in vivo*, mediante electroforesis unicelular en gel. Se formaron grupos de 5 ratones cada uno, los cuales fueron tratados con radiación, con dFdC y la combinación de ambos. También se incluyó un grupo control no tratado. Se midió el efecto radiosensibilizador de la dFdC, a una dosis de 10 ó 30 μ mol/kg administrada en diferentes tiempos o en combinación con 0.25 ó 0.5 Gy de radiación gamma en células de médula ósea de ratón. La radiación fue administrada de una fuente ^{60}Co media hora después de haber incorporado la dFdC vía intraperitoneal, una vez hecho esto las células se recolectaron inmediatamente. El daño se determinó por medio del ensayo cometa en su versión alcalina. Se observó que la dFdC tiene un gran efecto *per se* así como un efecto aditivo con la radiación con ambas dosis. De manera adicional se realizó un análisis estadístico de las células que presentaban una gran cantidad de daño, a las cuales no se les pudo hacer el análisis de migración de la cauda, ya que no tenían forma de cometa, por lo cual fueron denominadas como “nubes” y se observó un efecto aditivo, es decir que aumentó el daño producido por la radiación pero no de manera significativa. Colateralmente se observó que la dFdC es capaz de inducir daño de manera inmediata, lo que difiere con el mecanismo más aceptado de que requiere su fosforilación y su posterior incorporación al ADN.

Introducción

La radiación es el transporte o la propagación de energía en forma de partículas u ondas y se encuentra presente en nuestro día a día, por lo que estamos en una constante exposición a ella. La radiación puede ser de tipo α , β , γ o rayos x (Spinberg & Rabin, 2011). La forma de radiación más utilizada es la ionizante, que es empleada en distintos campos, por ejemplo, en la salud en equipos radiológicos, en la industria para esterilización de productos de consumo y en el sector nuclear para investigación (Araujo & Reyes, 2002). La exposición a la radiación produce daño directo e indirecto en distintos niveles de organización (fisiológico, celular y molecular) a nivel molecular el daño directo se refleja en la deposición de la energía en la materia, siendo de particular importancia la ruptura de la estructura química básica del DNA o indirecto a través de la formación de radicales libres de agua que es la molécula más abundante en los organismos, lo que conllevan a la reacción con otras moléculas incluida la del DNA (Conde, 1999; Ortega y Jorba, 1996; Hall & Giaccia, 2012; Grosch & Hopwood, 1979).

Para la evaluación el daño producido por dicho agente existen distintas formas de evaluar el daño producido en el DNA, de forma *in vitro* e *in vivo* y con diversos modelos biológicos. ***In vivo* una de las pruebas que se utiliza es la electroforesis unicelular en gel que detecta la migración de los fragmentos del DNA, este ensayo también recibe el nombre de ensayo cometa (Güerci et al., 2006).**

Para el tratamiento del cáncer el uso combinado de la radioterapia y la quimioterapia han dado buenos resultados; los agentes anticancerígenos como la difluorodesoxicidina (dFdC) tienen la finalidad de eliminar células proliferantes, dicho efecto es llamado radiosensibilidad, que es la capacidad de sufrir alteraciones ante la acción de la radiación (Bastías 2001).

Uno de los agentes utilizados es el análogo de nucleósido difluorodesoxicidina que se incorpora a la célula con ayuda de los transportadores, dentro de la célula puede alterar el metabolismo de nucleótidos o sufre tres fosforilaciones, y se

puede incorporar al DNA interrumpiendo su replicación. Por otra parte se sabe que crea especies reactivas de oxígeno e incluso puede alterar los nucleótidos provocando así un daño a la célula (Pauwels *et al.*, 2005; Donadelli *et al* 2007; Huang *et al.*, 1991 & Morales-Ramírez *et al*, 2017).

1. Usos de la radiación

Las radiaciones ionizantes tienen aplicaciones muy importantes en la industria, la investigación y la medicina (Araujo & Reyes, 2002).

Entre las principales aplicaciones de la radiación se encuentran:

Radiaciones características que permiten emplear radionucleidos como trazadores en los campos biológico, medioambiental, sanitario, industrial, etc., así como la radioterapia usada contra el cáncer. (Gallego, 2010)

Las utilidades de las radiaciones ionizantes en estos campos de aplicación son múltiples y abarcan operaciones como transformación de las propiedades químicas de la materia permitiendo elaborar materiales más ligeros y resistentes, para evitar procesos de degradación en obras de arte para su conservación, para prolongar el periodo de conservación en ciertos alimentos, también en procesos de control de población en caso de algunas especies que estén siendo invasivas como la mosca del mediterráneo, en la esterilización de productos como sangre, tejidos entre otros, en agricultura para obtener mejor rendimiento en los cultivos, o en medicina con fines de diagnosticar o aplicar terapias (Gallego, 2010; Tomasz *et al*, 2001;).

La radioterapia es un tratamiento muy efectivo, empleada en más del 60% de los pacientes con cáncer (Orth *et al*, 2014)

1.2 ¿Qué es la radiación?:

Cuando interacciona con los átomos de un medio, provoca primero la excitación de sus electrones. En algunos casos, si la excitación es muy intensa, puede ocurrir la expulsión de electrones dejando huecos en el átomo. A este proceso se le conoce como ionización, y a la radiación que lo provoca, radiación ionizante. Los

seres vivos hemos estado expuestos a este tipo de radiación desde nuestra aparición en la Tierra. La principal fuente de radiación natural extraterrestre son los rayos cósmicos, que son partículas muy veloces y altamente energéticas. Al llegar a la atmósfera de la Tierra, interaccionan con los átomos constituyentes produciendo reacciones nucleares que dan como resultado otras partículas, y éstas continúan su viaje hacia la superficie. Como se trata de partículas cargadas, su intensidad varía dependiendo de la latitud, de acuerdo con la presencia del campo magnético, así como de la altitud, por ejemplo es más intensa en la Ciudad de México que a nivel del mar. En ocasiones, las reacciones nucleares mencionadas dan lugar a núcleos inestables que producen emisión de fotones. Además de este tipo de radiación, que llega a la Tierra del espacio exterior, existen otras fuentes de radiación también natural que recibimos constantemente, y que prácticamente ha sido la misma todo el tiempo desde que se formó la Tierra; esencialmente, es radiación que proviene de algunos minerales del suelo presentes en rocas ígneas, como es el caso del uranio-238 (^{238}U), el torio-232 (^{232}Th) y el potasio-40 (^{40}K) (Mercado, 2007).

Las diferentes clases de radiaciones electromagnéticas comprenden porciones del espectro y se clasifican de acuerdo a su longitud de onda en ondas de radio, microondas, radiaciones infrarrojas, luz visible, radiaciones de luz ultravioleta, rayos X, radiaciones gamma o radiaciones γ , los rayos catódicos (Montoya, 2008)

1.3 Tipos de Radiaciones:

1.3.1 Radiaciones ionizantes

Son de gran energía y con un alto poder de penetración. Las principales radiaciones ionizantes son: los rayos catódicos, las radiaciones gamma y los rayos X. La radiación ionizante es utilizada para la esterilización y descontaminación de suministros médicos, quirúrgicos, materiales de laboratorio, medicamentos, injertos de tejido (teniendo en cuenta sus limitantes) y en algunas industrias de

alimentos para eliminar microorganismos aumentando la vida de anaquel (Montoya, 2008).

1.3.2 Radiaciones no ionizantes

Estas radiaciones no ionizan. Específicamente producen una excitación de los electrones aumentándolos a niveles mayores de energía pero un bajo poder de penetración. Como ejemplo se tiene la luz ultravioleta que es utilizada para reducir la población bacteriana (Montoya, 2008).

1.4 Efectos de la radiación

El efecto que tiene la radiación ionizante sobre los seres vivos es el resultado de interacciones a niveles atómicos, interacciones que adoptan la forma de ionización o excitación de electrones orbitales y dan lugar al depósito de energía en el tejido.

La energía depositada puede originar un cambio molecular de consecuencias variadas generadas por dos vías (fig 1).

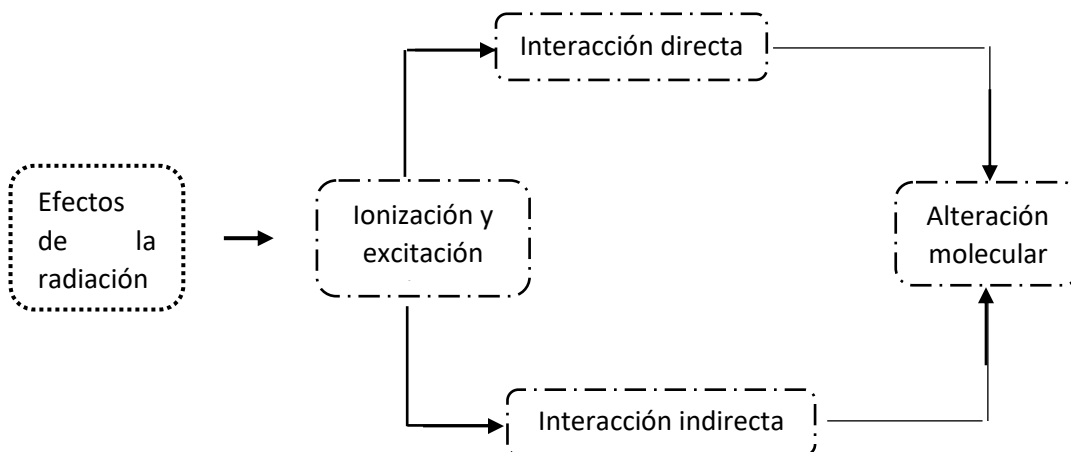


Figura 1. Esquema de la acción de la radiación

Cuando se ioniza un átomo cambian sus propiedades de unión química. Si el átomo es un constituyente de una molécula grande, la ionización puede dar lugar a la rotura de la molécula o a la recolocación del átomo dentro de la molécula. La

molécula anormal puede funcionar inapropiadamente o dejar de funcionar, lo que tal y dependiendo de la molécula afectada pueda dar lugar a un trastorno serio o a muerte celular.

Éste proceso no es irreversible. En todas las fases de la secuencia es posible regresar al status previo al daño por radiación, a través de la biosíntesis de las moléculas dañadas (Conde, 1999). Sin embargo, esta posibilidad se encuentra limitada por el tiempo de exposición, el tipo de radiación y las moléculas afectadas.

1.5 Efecto de la radiación sobre los organismos

Se consideran como efectos biológicos únicamente a las lesiones detectables inducidas por la radiación en los seres vivos. La ICPR (International Conference on Pattern Recognition) distingue tres términos diferentes para explicar el efecto de las radiaciones ionizantes. El **cambio**, que ocurre tras la interacción “radiación ionizante-materia viva”, que se define como una **alteración** molecular que puede o no evolucionar hacia un daño, ya que puede o no ser reparado. El **daño** es una anomalía estructural o funcional de la célula, que puede expresarse o no como lesión en el individuo irradiado o en su descendencia (Ortega y Jorba, 1996).

1.6 Como actúa la radiación en la materia

Cuando la radiación X o gamma atraviesa un cuerpo (o cualquier tipo de materia) pierde energía (no velocidad), dicha liberación de energía a través de fotones en la materia ocurre en dos pasos:

1.6.1 Primero la interacción de los átomos con el tejido resulta en la interacción con los átomos liberando electrones orbitales; esto puede reflejarse en tres procesos principales:

1.6.1.2 Efecto fotoeléctrico:

En éste proceso el electrón entra y un átomo sufre una completa o *verdadera absorción*, es decir, el fotón cede toda su energía al átomo, inmediatamente el

átomo responde expulsando un electrón, generalmente de la capa K o L, dejando un “agujero” en esa capa. El átomo está excitado e ionizado desde que el electrón escapó del átomo. Un electrón de un más alto nivel de energía llena el “agujero” de la capa K teniendo como resultado la emisión de un fotón característico de rayos-x. Incluso, hay una serie o cascada de electrones para llenar los “agujeros” sucesivos, representando fotones característicos (ver figura 2)

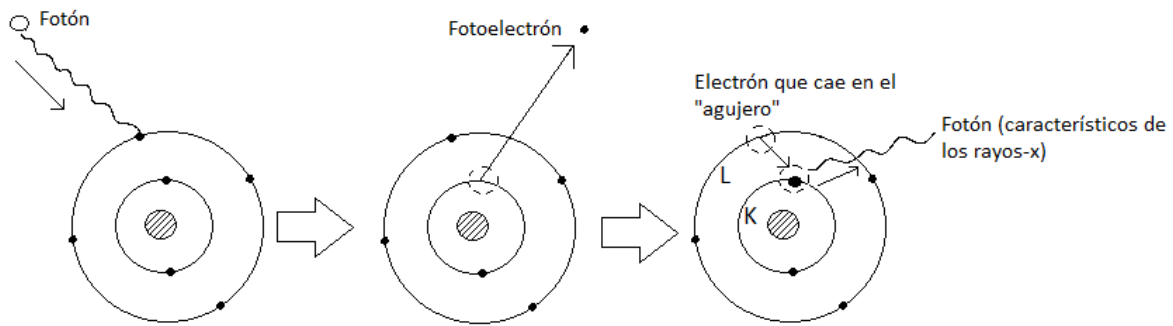


Figura 2. Esquematación del efecto fotoeléctrico (Selman, 1983)

1.6.1.3 Efecto Compton

Un fotón de alta energía interactúa con un electrón de la capa exterior, como si dos bolas de billar colisionaran. El fotón disperso (sigue otra dirección) con menos energía que el fotón incidente. El electrón es eyectado como un electrón de retroceso (ver figura 3).

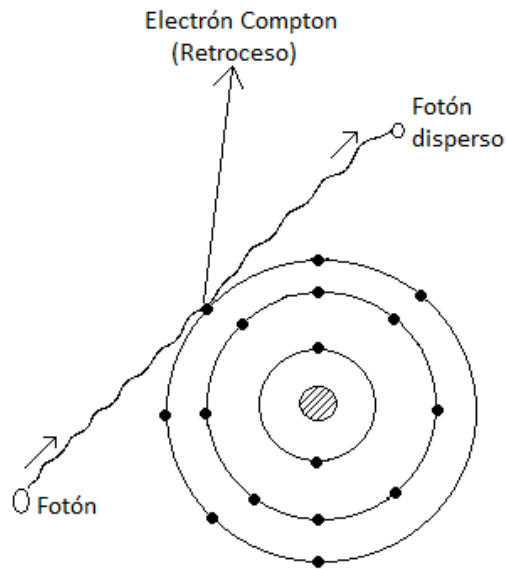


Figura 3. Esquematación del efecto Compton (Selman , 1983)

1.6.1.4 Producción de pares

Un fotón con mínima energía de 1.02 MeV puede interactuar con un átomo (probablemente cerca del núcleo), después de lo cual cambia a dos partículas cargadas: a negatrón (un electrón negativo) y a positrón (un electrón positivo). La producción de pares y el proceso de aniquilación toman lugar cerca de un átomo cercano al núcleo, si fuese cerca de un electrón se forma un triplete que consiste en el par y un electrón que se pone en movimiento durante la interacción (ver figura 4).

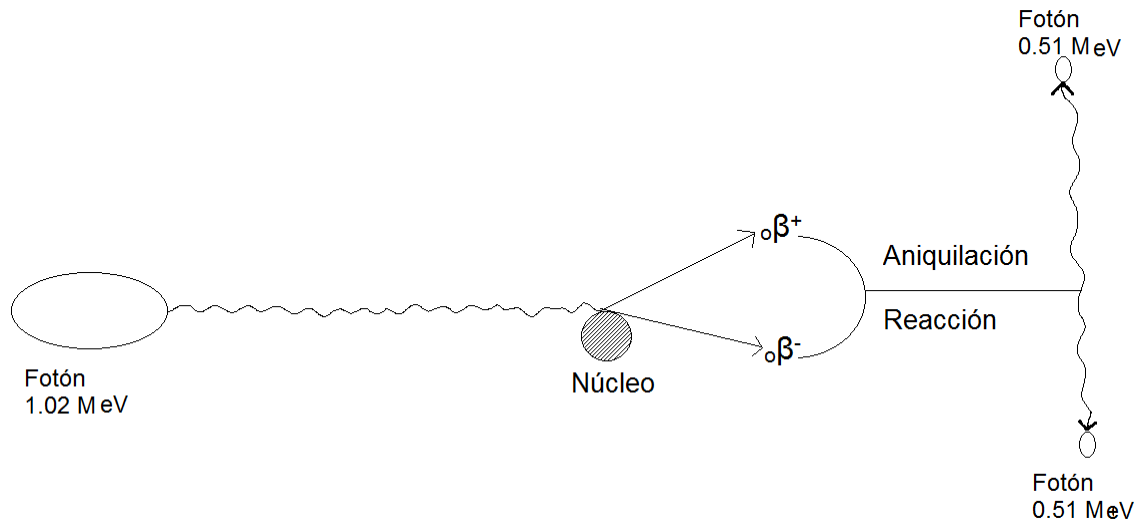


Figura 4. Esquematación de la producción de pares) (Selman, 1983)

1.6.2 Los electrones liberados llamados “electrones primarios” se mueven después a través del cuerpo causando ionizaciones y excitaciones a medida que interactúan con otros electrones orbitales.

Grupos de iones y átomos excitados a lo largo de la trayectoria de rayos primarios y delta producen lesiones radiobiológicas en el DNA, la gravedad dependerá de la cercanía de los grupos; entre más cerca estén mayor será la cantidad de energía depositada por unidad de la trayectoria (ver figura 5).

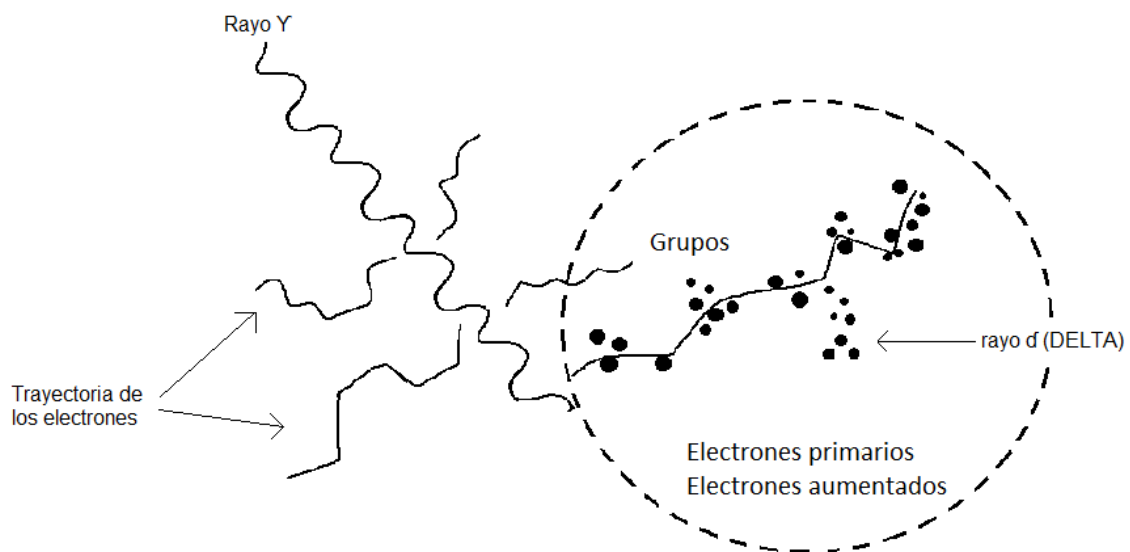


Figura 5. Esquematación de la formación de electrones primarios (Selman, 1983)

1.7 Efecto de la radiación sobre la célula:

El blanco más sensible a la radiación ionizante en la célula es el DNA, porque a diferencia de las demás moléculas no sufre recambio y por lo tanto no puede ser sustituido, porque en ésta molécula se encuentra toda la información de la que depende todo el funcionamiento. La trayectoria de una partícula cargada (un electrón o un ion) puede atravesar el DNA e ionizarlo directamente (acción directa), o ionizar las moléculas de agua en el medio, produciendo altos radicales reactivos OH^{\bullet} , que pueden atravesar el DNA y reaccionar con la molécula objetivo (acción indirecta). Otros radicales libres acuosos y especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 , los cuales son menos importantes que OH^{\bullet} para producir daño letal en el DNA debido a que su presencia es menos en el medio (Herskind & Westergaard, 1986 y Herskind & Westergaard, 1988). Hay reacciones químicas en el DNA que también producen directa o indirecta ionización por radicales OH^{\bullet} que pueden dañar una base, interrumpir la base del azúcar fosfato del DNA, resultando en una ruptura simple o doble de cadena o producir enlaces cruzados en el DNA (Hall & Giaccia, 2012)

1.8 Efecto de la radiación sobre el DNA:

Los efectos en la estructura se mostraron primero en células bacterianas con los experimentos de McGrath y Williams en 1966 y en células de mamíferos por Lett y colaboradores en 1967 en donde mostraban una disminución del tamaño del DNA al ser expuesto a radiación, que después se recuperaba por mecanismos de reparación. Es importante distinguir entre la integridad estructural y la solidez funcional: aunque el DNA puede parecer una cadena continua, el correcto orden de las bases puede no mantenerse.

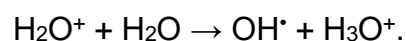
En 1962 Nygaard y Potter escribieron “la inhibición de la síntesis de ADN por la radiación ionizante, un fenómeno bien establecido,” pero el mecanismo era aún desconocido. En 1970 Okada realizó estudios *in vivo* e *in vitro* en células de

mamífero que mostraban un patrón bastante uniforme. Con dosis menores a 1,000 rads, la incorporación de timidina tritiada (es un método basado en la capacidad que tienen las células de incorporar al ADN el nucleótido timidina con el hidrógeno substituido con tritio (^3H) solamente durante la fase S del ciclo celular) disminuía rápidamente a una tasa del 50% aproximadamente. En estudios más detallados revelaban que la disminución de la síntesis de DNA es dependiente del tiempo. A pesar de la dosis, la máxima disminución ocurre a las 2-3 horas después de la irradiación, la magnitud de la disminución está relacionada a la dosis. Subsecuentemente, la reducción de la tasa de síntesis en las irradiadas supera a las no irradiadas (Grosch & Hopwood, 1979).

La probabilidad de que un electrón primario de baja transferencia lineal de energía (LET por sus siglas en inglés) interactúe con la molécula de DNA en su camino es baja, pero una interacción directa de ésta clase es posible (Nikjoo *et al*, 2002). A lo largo de la trayectoria del electrón primario son formados electrones secundarios con baja energía produciendo grupos de ionizaciones. Si uno de estos grupos se forma cerca de la molécula de DNA, pueden ocurrir varios daños en segmentos localizados de DNA a los cuales se les refiere como grupos de daño o sitios locales de múltiples daños conocido como LMDS por sus siglas en inglés (Locally Multiply Damaged Sites) (Ward *et al*, 1985; Goodhead 1994).

El agua es el mayor constituyente de las células (~ 80%). Por lo que conocer la radiólisis del agua, es fundamental para la comprensión de los efectos radiobiológicas (Azzam *et al*, 2012).

La radiólisis implica la absorción de energía por la molécula de agua, provocando su disociación. En cuanto ésta toca a otra molécula no cargada de agua como resultado se obtiene la liberación de OH^* de acuerdo a la reacción:



Otras reacciones producen radicales hidrógeno (H^*) peróxido de hidrógeno y agua. Se cree que la especie reactiva más eficiente por su vida relativamente larga de (10^{-5} s) es el radical OH ; como un agente oxidante, puede extraer un átomo de

hidrogeno de la desoxirribosa, componente del DNA creando un radical de DNA (Roots and Okada 1972).

Además los radicales libres pueden reaccionar con otras moléculas y causar lesiones en zonas distantes del lugar de interacción primaria. En el caso de que actúen sobre moléculas no fundamentales como carbohidratos, lípidos o proteínas, pueden producir efectos transitorios ya que se resintetizan inmediatamente. Si la acción de los radicales libres es sobre el DNA, puede producirse:

- Roturas de la cadena (simples o dobles).
- Alteración o destrucción de las bases.
- Alteración o destrucción de los azúcares del DNA.
- Lesiones múltiples locales.
- Formación de puentes entre las dos cadenas del DNA (Alegre, 2001; Thomasz *et al*, 2001)

Cuando se produce una irradiación, el tiempo entre dos eventos ionizantes es importante porque es el intervalo en el cual la célula puede activar mecanismos de reparación o de adaptación al daño, esto es, a mayor tiempo entre dos eventos subletales mayor es la probabilidad de recuperación del daño.

En la célula existen mecanismos de reparación muy eficaces que implican la participación de numerosas enzimas: endonucleasas, DNA polimerasas y ligasas, entre otras. Las rupturas dobles presentan más dificultades para los mecanismos de reparación que las rupturas simples, ya que en las primeras la cadena contralateral que podría servir como molde para iniciar la reparación, mientras en las segundas ambas cadenas están dañadas.

Los dos mecanismos principales de reparación son: por escisión y resíntesis que permite la reparación de rupturas simples, y las recombinaciones homólogas o heterólogas, que reparan las rupturas dobles (Thomas *et al*, 2001).

Las alteraciones que se producen en el DNA, genes o cromosomas pueden dar lugar a mutaciones, que son cambios en la secuencia de las bases, que representan variaciones en alguna función celular transmisible a la descendencia. En general los seres vivos presentan mutaciones espontáneas en su evolución que persisten sin daño aparente. El riesgo de la radiación está en la producción de mutaciones que alteran sustancialmente la función celular generando cáncer o alteraciones en la descendencia, cuando éstas ocurren en las células de la línea germinal. Las mutaciones pueden clasificarse como:

- Puntuales: que afectan a un gen o grupo de genes y no producen una alteración apreciable del cromosoma. Dependiendo del sitio de la mutación pueden o no afectar significativamente la estructura de la proteína resultante.
- Cromosómicas: las cuales producen graves alteraciones en la estructura del cromosoma.

(Alegre, 2001)

2. Radiosensibilidad

La radiosensibilidad es la capacidad de sufrir alteraciones ante la acción de la radiación. No todos los tejidos son igualmente radiosensibles. Existen una serie de factores que aumentan o disminuyen la radiosensibilidad celular entre los más importantes se encuentran:

1) Oxígeno. Es el radiosensibilizador más común, ya que potencia la acción de las radiaciones en todo tipo de células. Si administramos oxígeno en el momento de la

radiación, dicho efecto es maximizado. El oxígeno podría participar como radiosensibilizador a través de la formación de radicales libres. Se ha observado que varios de los cambios químicos que se producen como resultado de la irradiación son reversibles si el oxígeno no está presente.

2) Radiosensibilizadores químicos. Existe una amplia gama de sustancias químicas que actúan aumentando el efecto de la radiación sobre los tejidos por ejemplo, pirimidinas halogenadas, análogos de la purina, vitamina K, entre otros.

3) Hipertermia. Los tejidos experimentan un aumento en la respuesta a la radiación cuando se aplica conjuntamente con calor produciendo vasodilatación y por tanto un aumento en el aporte de sangre y con ello aumento de oxígeno (Bastías, 2001).

4) División celular. Las células en etapa de división son más sensibles, en particular si la exposición es durante la síntesis del DNA, esto porque se bloquea este proceso y causa que la célula entre en apoptosis o muerte celular (Roldán *et al.*, 2003).

Adicionalmente existen factores clínicos relevantes que pueden determinar si una célula experimenta radiosensibilidad o radioresistencia (que es la oposición que pone la célula a los cambios ante la acción de radiación), por ejemplo en células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC) se muestran algunos factores que podrían aumentar el efecto de la radiación como pueden ser un volumen pequeño del tumor o la incapacidad de reparar los daños provocados en la célula o disminuirlo como que el tumor tenga un gran tamaño o que pueda reproducirse más rápido de lo que es atacado, entre otros (ver figura 6).

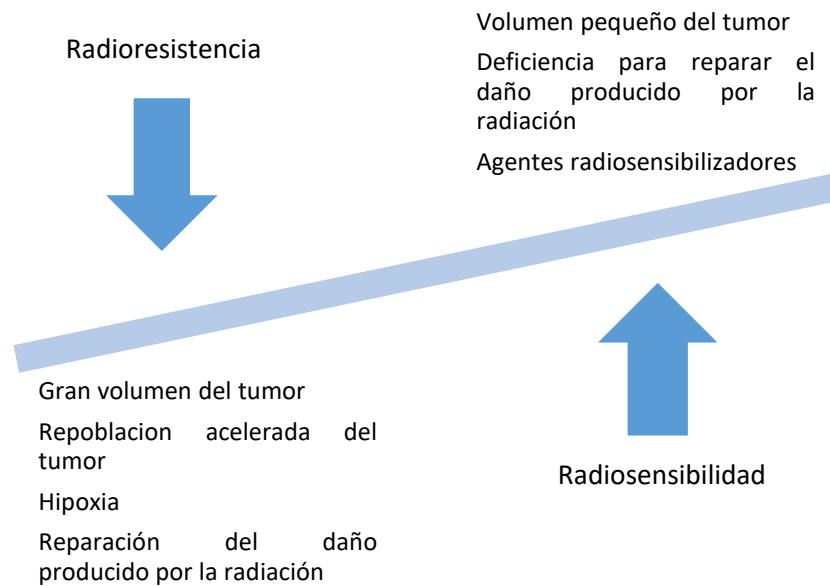


Figura 6. Factores que indican si una célula es radioresistente o si presenta radiosensibilidad en células no pequeñas de cáncer de pulmón (Willers *et al*, 2014).

3. Ley de Bergonie y Tribondeau

Bergonie y Tribondeau formularon que: “*La Radiación Ionizante es más eficaz sobre las células que son activamente mitóticas, no están diferenciadas y tienen por delante un largo futuro de divisiones*” a la cual denominaron sensibilidad inherente (Roldan *et al*, 2003).

Por lo cual las células que se dividirán o se encuentran en ese proceso son un buen blanco para la radiación, lo cual ha apoyado a la implementación de la radiación ionizante como terapia para el tratamiento de cáncer.

4. Efectividad de la combinación de radioterapia y quimioterapia:

Estudios que demuestran la efectividad de tratamientos de radiación combinados con agentes quimioterapéuticos en cáncer, diseñados con el objetivo de eludir mecanismos de acción e interacción de la respuesta generada en el área de estudio y que proveen bases racionales para la selección de horarios de

administración que pueden hacer más eficiente los tratamientos, necesariamente involucran evaluación de respuesta celular, de la respuesta del tumor y del daño temprano y tardío generado en el tejido normal.

Los tratamientos de radioterapia y quimioterapia tienen una gran variación en su efectividad dependiendo del tipo de tumor y su localización dentro del cuerpo.

Se ha mostrado mejoras con la combinación de tratamientos en el control local y regional de la enfermedad, y posiblemente en la enfermedad distante, pero se requieren estudios de la tolerancia del tejido normal de varios factores en varios tejidos (Barendsen & Rijswijk, 1977)

5. Radiosensibilizadores

5.1 ¿Qué son?

Los radiosensibilizadores son sustancias que aumentan la respuesta de las células a la irradiación potenciando la misma (Puppin *et al*, 2005)

Comúnmente son antineoplásicos con diferentes formas de acción: aneuploidógenos como Vinorelbina, alquilantes bifuncionales cisPtM o análogos de base que se incorporan al DNA como bromodesoxiuridina (BrdU) y la difluorodesoxicidina (dFdC).

5.2 ¿Cómo actúan?

De manera general estos agentes ejercen su actividad citotóxica a través de los medios comunes tales como la interrupción de la función del DNA en la codificación de proteínas, por mencionar alguna, la inhibición de la replicación del DNA, o una combinación de los mismos (Lee *et al*, 2013).

Debido a que la fisiología de los nucleósidos es generalmente hidrófila y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática, su incorporación a la célula se

produce principalmente a través de los acarreadores de transporte de membrana nucleósido-específico (Galmarini *et al*, 2001)

Las características comunes en el metabolismo de las drogas son objeto de las interacciones de los análogos de nucleósidos. La mayoría de estos agentes son moléculas hidrófilas y por lo tanto requieren proteínas transportadoras especializadas para entrar en las células. Una vez dentro, son activados por los pasos metabólicos intracelulares a sus derivados trifosfato. Los derivados activos de los análogos de nucleósidos pueden ejercer la actividad citotóxica mediante su inclusión y alteración de las macromoléculas de DNA y RNA o interfiriendo con varias enzimas implicadas en la síntesis de ácidos nucleicos, tales como DNA polimerasas y la ribonucleótido reductasa. Estas acciones resultan en la inhibición de la síntesis de DNA y la muerte celular por apoptosis (ver figura 7) (Galmarini *et al*, 2002).

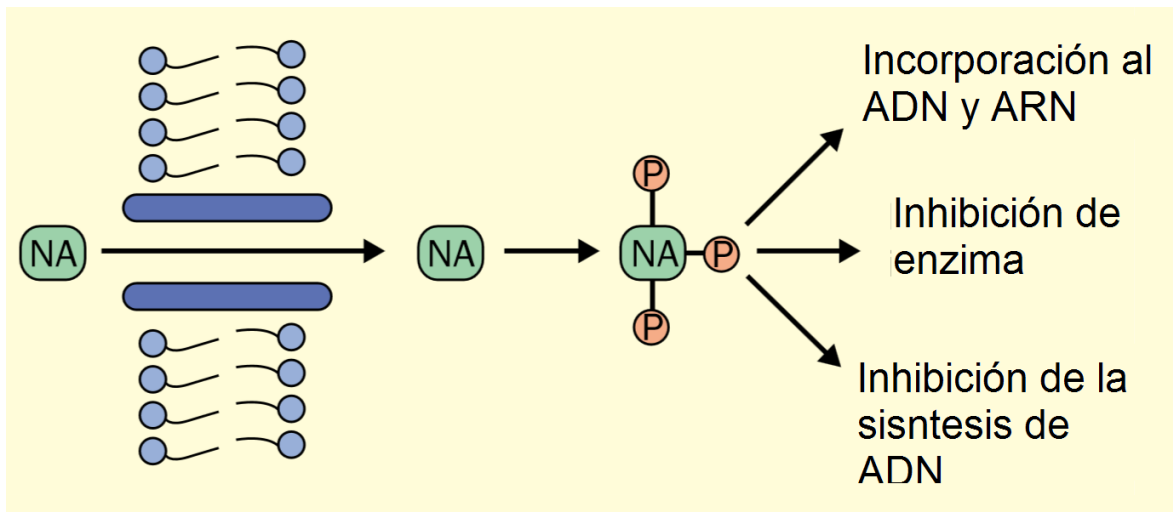


Figura 7. Esquemización del modo de entrada, síntesis de los nucleósidos y su posible modo de acción (Galmarini *et al* 2002).

Se ha demostrado que algunos de éstos químicos trabajan sinérgicamente con la radiación, una característica que se explota clínicamente para mejorar la regresión del tumor (Lee *et al*, 2013)

6. Antecedentes

6.1 Difluorodesoxicitidina

La difluorodesoxicitidina (*dFdC* ó 2',2' difluorodesoxicitidina ó *gemcitabina*) es un fármaco desarrollado por Ely Lilly el cual llamaron gemcitabina y es comercializada bajo el nombre de gemzar, una droga anticancerígena ampliamente prescrita para cáncer de pulmón, páncreas y ovario. Es un nucleósido fluorinado que debe someterse a la fosforilación intracelular a su forma difosfato y trifosfato activo, que inhibe la síntesis de ADN que conduce a la apoptosis (Brown *et al*, 2015; Boudewijn *et al*, 1991; Grunewald *et al.*, 1992; Noble *et al.*,1997). Difiere del nucleótido de desoxicitidina en las modificaciones en la posición 2' a la mitad de la molécula de azúcar, teniendo dos átomos de flúor o un grupo hidroxilo en ésta posición respectivamente (ver figura 8).

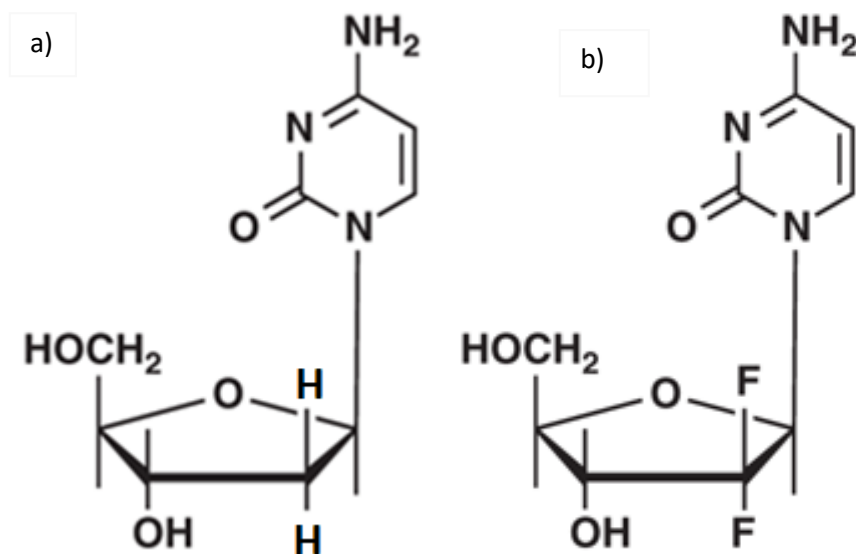


Figura 8. Formula estructural de a) desoxicitidina (H, H) y b) difluorodesoxicitidina (F, F) (Guchelaar *et al.*, 1996)

Entre los tratamientos para lo que es utilizada se encuentran tratamientos de cáncer de seno, de cabeza y cuello, vejiga, ovario, pulmón y páncreas entre otros (Barton, 1999; Braakhuis *et al.*, 1991; Grunewald *et al.*, 1992; Noble & Goa 1997).

6.2 *Mecanismo de acción:*

El transporte de membrana de la difluorodesoxicidina está mediado por el equilibrador de difusión facilitada humana (hENT) o transportadores de nucleósidos concentrativo (hCNT). La incorporación de la difluorodesoxicidina está aparentemente mediada por los transportadores hENT1, hENT2 y hCNT1 pero no por hCNT2. La difluorodesoxicidina también parece ser un sustrato para hCNT3. Se activa intracelularmente por la desoxicidina quinasa, lo que añade un fosfato a la posición 5' de la ribosa que conduce a la desoxicidina monofosfato (dFdCMP). La fosforilación subsiguiente produce los metabolitos activos de difosfato de difluorodesoxicidina (dFdCDP) y trifosfato (dFdCTP), que se dirigen a ADN y ARN y se presume responsable del efecto citotóxico.

La dFdCDP interfiere con la enzima ribonucleótido reductasa, causando el agotamiento de los desoxinucleótidos trifosfato necesarios para la síntesis de ADN, y esto podría desempeñar un papel en la apoptosis influyendo en la reparación del ADN. Al mismo tiempo, varios mecanismos de auto-potenciación se han descrito, incluyendo la inhibición de dCMP-desaminasa y CTP-sintetasa, que conducen a un aumento de los niveles intracelulares de compuesto activo.

La inactivación de la difluorodesoxicidina se produce a través de la desaminación de la gemcitabina en sí o de dFdCMP a los metabolitos 2', 2'-difluoro-2' desoxiuridina (dFdU) o 2', 2' monofosfato-difluoro-2' desoxiuridina (dFdUMP). La desaminación es causada por las enzimas desoxicidina desaminasa y desoxicidilato desaminasa, respectivamente. La dFdU es 1000 veces menos activo que la gemcitabina.

La principal acción de la difluorodesoxicidina es la incorporación competitiva de dFdCTP y dCTP en el ADN, después de lo cual la ADN polimerasa es capaz de sumar un solo nucleótido más antes de que haya fragmentación del ADN y la muerte celular. Esta llamada de terminación de cadena impide el reconocimiento y la escisión de la exonucleasa difluorodesoxicidina. La actividad citotóxica de la difluorodesoxicidina se ha correlacionado con la formación de dFdCTP, su

incorporación en el ADN, y su inhibición de la síntesis de ADN. La difluorodesoxicidina induce una detención de la fase S, y desencadena la apoptosis tanto en las células leucémicas humanas como en los tumores sólidos. Sin embargo, todavía no está claro por qué mecanismo(s) la difluorodesoxicidina conduce a la muerte celular. Recientemente, se demostró que la difluorodesoxicidina puede inhibir la topoisomerasa I (Top 1). También se encontraron células Top 1-deficientes para ser resistente a la difluorodesoxicidina, lo que sugiere que la inducción de rupturas de ADN mediadas por Top 1 puede desempeñar un papel en la citotoxicidad de la difluorodesoxicidina (ver figura 9) (Pauwels *et al.*, 2005).

Adicionalmente estudios anteriores indican que la incorporación de la difluorodesoxicidina inhibe la polimerasa α y la polimerasa ϵ (Huang *et al.* 1991), además de evidencia indirecta de que incrementa las especies reactivas de oxígeno, por ejemplo una reducción significativa de la difluorodesoxicidina es asociada con la inhibición del crecimiento por el captado de N-acetil-L-cisteina; una correlación positiva entre el nivel basal de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la sensibilidad a la difluorodesoxicidina en 10 líneas celulares de cáncer de páncreas sugiriendo así que la producción de ROS tanto por la dFdC como por la radiación tienen un efecto sinérgico (que actúan en conjunto) en la inhibición de células de cáncer pancreático (Donadelli *et al.*, 2007). Recientemente en el grupo donde se realizó esta tesis, se hizo un estudio del efecto genotóxico y citotóxico de la dFdC, determinando la cinética de inducción de micronúcleos y la reducción de la frecuencia de eritrocitos policromáticos en sangre periférica de ratón *in vivo*. Se propuso que la citotoxicidad temprana es debida a la alteración de la posesión de desoxinucleótidos, causada por la inhibición de la nucleótido reductasa y la tardía al bloqueo de la síntesis de ADN por inhibición de la polimerasa y la topoisomerasa. Esta última inhibición se relacionó con la producción de rupturas en el ADN y de micronúcleos subsecuentemente (Morales-Ramírez *et al.*, 2017).

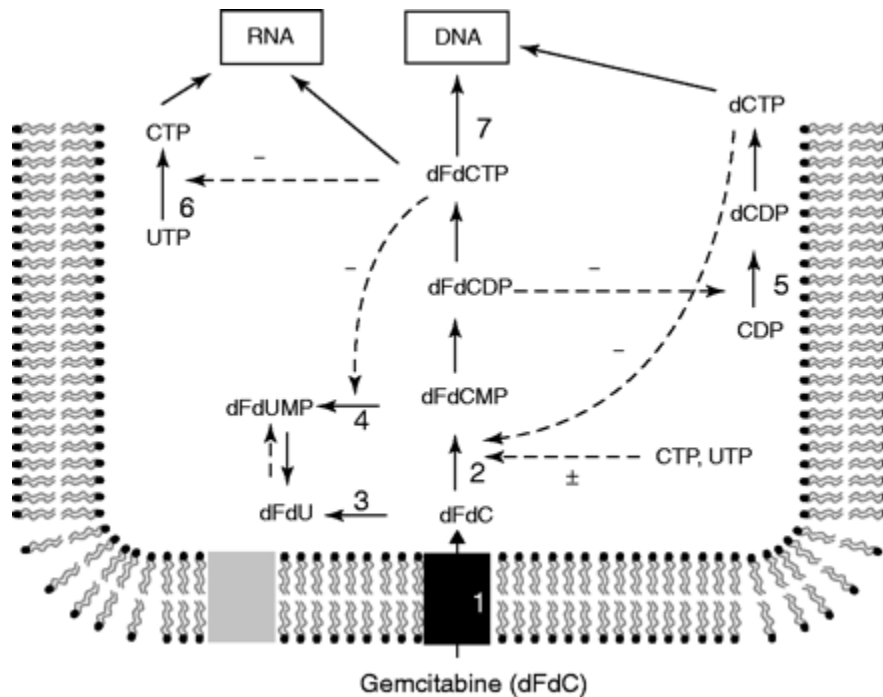


Figura 9. Metabolismo y mecanismo de acción de la difluorodesoxicitidina. 1) Difusión facilitada por los transportadores de nucleósidos humanos (hNT); 2) deoxicitidina quinasa (dCK); 3) deoxicitidina deaminasa (dCDA); 4) desoxicitidilato deaminasa; 5) ribonucleótido reductasa; 6) CTP-sintetasa y 7) ADN polimerasa.

6.3 Evidencia de actividad radiosensibilizadora:

Este agente ha mostrado acción radiosensibilizadora en sistemas in vitro e in vivo (Doyle *et al*, 2001). Se ha reportado un efecto radiosensibilizador en varios sistemas, que dependiendo de la línea celular probada, la concentración usada y el horario de administración es la respuesta obtenida, en las siguientes tablas se muestran algunos ejemplos de evaluación del efecto radiosensibilizador de la gemcitabina. Al parecer, la radiosensibilización por la difluorodesoxicitidina se produce en tumores indiferenciados pero no en los bien diferenciados

Tabla 1. Estudios realizados <i>in vitro</i> en diferentes líneas celulares.			
Referencia	Modelo experimental	Dosis	Resultados
Buchsbaum <i>et al</i> , 2002	Células de carcinoma pancreático humano (BxPC-3 y MiaPaCa-2)	IC(50) de difluorodesoxicitidina día 1 por 24 h seguido de 3 Gy de una fuente ⁶⁰ Co al segundo día	Inducción de apoptosis e inhibición de la proliferación. También una regresión de MiaPaCa-2 durante 250 días e inhibición del tumor BxPC-3
Lawrence <i>et al</i> 1996	Líneas celulares de cáncer pancreático humano (Panc-1 y BxPC-3.)	Para BxPc-3 una dosis de 10 nM de difluorodesoxicitidina al día Para Panc-1 100 nM de difluorodesoxicitidina al día Y radiación de 1-2 Gy/min con una fuente de ⁶⁰ Co	Se produjo una relación de mejora de 1.7 a 1.8 La radiosensibilización es dosis, tiempo- dependiente para cada una
Sangar <i>et al</i> , 2004	Líneas celulares TCC ((MGH-U1 y su subclon S40b) Y línea celular de fibroblasto humano HF19	0.01 y 0.3 μM de difluorodesoxicitidina 12 horas antes de la irradiación, después de su exposición las células son lavadas con PBS y se agregó medio fresco. Irradiados en hielo con radiación gamma 2 Gy con una fuente de ⁶⁰ Co	Hubo mejor respuesta a radiosensibilización con la dosis de 0.3 μM, matando el 50% de las células. En ambas líneas celulares después de la irradiación, no hay un bloque G1 / S se produjo y se acumuló en las células G2 / M. Además se observó un bloque de G2 / M: este alcanzó un máximo de 8 horas tanto en S40b y MGH-U1 y persistió durante 12 y 8 horas para S40b y MGH-U1, respectivamente
Supiot <i>et al</i> , 2007	Líneas celulares de mieloma múltiple (LP1, RPMI 8226, U266)	Las células se incubaron por 24 h con difluorodesoxicitidina a dosis de 0-40 nM después de lo cual se lavaron y se colocaron en nuevo medio. Se irradiaron a una dosis de 1Gy/min (con una fuente de ⁶⁰ Co para	No hubo una diferencia significativa en la respuesta entre las tres líneas celulares con respecto a la proliferación y la supervivencia clonogénica. Por otra parte las tres líneas celulares mostraron una detención de más del 70 % en la fase S con concentraciones de 5-10

		radiación gamma (baja-LET) y alpha-RIT (alta-LET))	nM de gemcitabina.
Fechner et al, 2003	Líneas celulares de cáncer de vejiga (RT112, RT4, T24, SUP)	Radiación (2, 4, 10 Gy) 1) difluorodesoxicitidina y radiación simultáneamente a las 6, 12, 24, 72 h 2) incubación con difluorodesoxicitidina a las 3, 6, 12, 24 h y radiación a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 h Para la radiación se utilizó radiación de haz de electrones (E-beam)	Sin efecto radiosensibilizador

Lawrence y colaboradores (1996) sugieren que el aumento de la sensibilidad de la célula a la radiación provocada por la incorporación de la difluorodesoxicitidina no depende de la concentración intracelular de dFdCTP ni de los niveles relativos de dFdCDP/ dCTP si no más a bien a la disminución de la piscina de dATP.

Por otro lado Sangar y colaboradores (2004) proponen que hay varios factores que intervienen en la acción radiosensibilizadora de la difluorodesoxicitidina, que no sólo es la detención de la replicación en la fase S o en la fase G1 ni con el estado de p53.

Supoit y colaboradores (2007) reportaron, además de los resultados mostrados en la tabla 1, que sorpresivamente la combinación de difluorodesoxicitidina con radiación de alta-LET muestra un menor efecto que el presentado solo por la radiación, y que por lo tanto la acción radiosensibilizadora de ésta puede variar de acuerdo a la LET.

Por lo tanto podemos inferir que son varios factores los que participan para la radiosensibilización por la difluorodesoxicitidina los cuales no se tienen entendidos del todo hasta el momento.

Tabla 2. Estudios realizados <i>in vivo</i>.			
Referencia	Modelo experimental	Dosis	Resultados
Joschko <i>et al.</i> (1997)	Ratón desnudo con xenoinjerto de carcinoma escamoso.	1) 2.3mg/kg dFdC diario +radiación. 2) 430mg/kg una vez a la semana + radiación. 3) 50/100/160 mg/kg 2 veces a la semana + radiación. difluorodesoxicitidina 30 min antes de la radiación. Radiación (rayos X): 2 Gy diarios, la 2ª dosis de 6-7 h después (total de 40 Gy).	1) Respuesta: DER 1.6 2) Respuesta: DER 2.6 3) Respuesta: DER 3.3 (160 mg/kg) DER 2.2 (100mg/kg) DER 2.4 (50 mg/kg)
Henk <i>et al.</i> (2006)	Carcinoma indiferenciado (L44) en hembras BN. Carcinoma de células escamosas (L42) en hembras WAG/Rij. Tumor de próstata (MLL) en machos Copenhagen.	Radiación 24 h después de la administración de difluorodesoxicitidina en dosis de 10 a 90 mg/kg en un volumen de 2 a 3 ml. Con dosis única de radiación de 10 Gy para el tumor L44, tumor MLL de 20 y 30 Gy y para tumor L42 con 15 Gy de rayos X (200 kV, 20 mA, 0,5 mm de Cu).	Mejora la respuesta de radiación en tumores no diferenciados, pero no para tumores bien diferenciados.
Mason <i>et al.</i> (1999)	Ratón C3Hf/Kam con tumores SA-NH.	1) 25 mg/kg 24 h antes de la radiación. 2) 12.25 mg/kg 24 h antes del 1er y 3er día de la radiación 3) 12.5 mg/kg 24 h antes de cada radiación (3,5,7Gy) radiación diaria, por 5 días Para la radiación se utilizó una fuente de ¹³⁷ Cs	Respuesta para el retraso del crecimiento del tumor: 1.34-1.46 para los 3 horarios Respuesta para los sobrevivientes: 0.96 (única dosis), 1.09 y 1.23 de 2 dosis y 2 dosis diarias mejor respuesta con difluorodesoxicitidina que la respuesta normal, hubo ganancia con una única dosis (1.4)
Cividalli <i>et al.</i> (2001)	Ratón CD3D2F1 con adenocarcinoma mamario.	30, 60 o 120 mg/kg. 1) difluorodesoxicitidina a 20 min, 4 h y 24 h antes de la radiación. 2) 4 administraciones de difluorodesoxicitidina cada 3 días, dFdC 24 h antes de la radiación (20, 30, 40 Gy). Utilizando rayos x.	Nivel del umbral 60 mg/kg efecto potencial para ambos horarios, mayor con el segundo horario.
Grégoire <i>et al.</i> (1999)	Ratón C3H.	150 mg/kg. Única dosis 3 o 48 h antes de la radiación (14.45 Gy) para la cual utilizaron p(45) + Be y p(65) + Be neutrones producidos en el ciclotrón	Respuesta: 1.09 (difluorodesoxicitidina 3h antes de la radiación). Respuesta: 1.1 (dFdC 48h antes de la radiación).

		isócrono "CYCLONE".	
--	--	---------------------	--

Henk y colaboradores (2006) reportan no haber obtenido una mejora con los 30 mg/kg de difluorodesoxicidina en la piel del pie del ratón, por el contrario, observaron protección, por eso y la investigación que realizaron proponen aplicar la dosis completa de radiación y tratar de mejorar el control local con una dosis relativamente baja de difluorodesoxicidina para que ésta funcione como radiosensibilizador.

Mason y colaboradores (1999) hacen referencia a que la respuesta radiosensibilizadora de la difluorodesoxicidina es dependiente del intervalo de la administración de ésta y la radiación local del tumor, además proponen que hay otro mecanismo implícito: la reoxigenación de las células tumorales hipóxicas que podría estar jugando un papel en la mejora de la respuesta radiosensibilizadora de la difluorodesoxicidina.

Grégoire y colaboradores (1999) hacen mención de no haber encontrado diferencias sustanciales en cuanto a los intervalos que hay entre la administración de la difluorodesoxicidina y la radiación por lo que proponen que éste no es un factor que altere la radiosensibilidad provocada por la difluorodesoxicidina.

Por lo que nuevamente se sugieren más estudios pues el modo de acción de la difluorodesoxicidina como radiosensibilizador no se tiene del todo comprendido.

Tabla 3. Estudios clínicos			
Referencia	Modelo experimental	Dosis	Resultado
Pattaranutaporn <i>et al</i> , 2001	Paciente con fase IIIB de carcinoma cervical.	300 mg/m ² de difluorodesoxicidina una vez a la semana y una dosis de 50 Gy en 5 semanas (de una fuente de ¹³⁷ Cs).	Control del 84,2 % de supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global del 100%.
Verma <i>et al</i> , 2009	Pacientes de cáncer avanzado de cuello uterino.	150 mg/m ² por semana y 50 Gy en 5 semanas (de una fuente ⁶⁰ Co).	Respuesta completa del 70% de los casos y una respuesta parcial en un 20 % mientras que un caso no mostró ninguna respuesta en el grupo de difluorodesoxicidina.
Bustamante-Valles <i>et al</i> , 2006	15 pacientes en etapa IVa de carcinoma epidermoide originado en mucosas de cabeza y cuello.	50mg/m ² de difluorodesoxicidina semanal asociada a radioterapia (rayos X), 3,960cGy en 22 fracciones de 180cGy, con incremento de 2,880 cGy en 16 fracciones de 180cGy.	Respuesta Global (87%). Respuesta completa (60%).

Atasoy <i>et al</i> , 2011	24 pacientes de carcinoma pancreático.	75 mg/m ² /semana de difluorodesoxicidina fue infundida por 30 min 1 vez a la semana por 5 semanas. La radiación fue administrada con un acelerador lineal de alta energía utilizando 6-18 MV de fotones con una dosis total de 4500 cGy en 25 fracciones.	En un seguimiento de 36 semanas, hubo supervivencia libre de progresión y libre de metástasis a distancia por al menos 22 semanas. La terapia con difluorodesoxicidina sólo se terminó en 4 pacientes ya que los demás presentaron efectos secundarios. Los pacientes con respuesta local y sin progreso de la enfermedad gracias a la quimiorradioterapia revelaron una supervivencia media de 39 semanas en contraste a las 36 evaluadas. Además el dolor disminuyó 50% en los pacientes.
Chahuan <i>et al</i> , 2008	80 pacientes con células escamosas de cabeza y cuello.	100 Mg /m ² via intravenosa una vez a la semana 1- 2 h antes de la radiación por 6 semanas. 2Gy 5 días a la semana con un total de 64 Gy administrada por una unidad de telecobalto.	Las tasas de respuestas completas y parciales fueron 42,5% y 57,5%, respectivamente para Radiación solamente el 62,5% y 37,5%, respectivamente, para el grupo radiación y difluorodesoxicidina no hubo diferencia significativa en las tasas de respuesta al final del tratamiento, pero la supervivencia libre de enfermedad en los tres años fue mejor en el grupo radiación y difluorodesoxicidina (63,3% vs 20%). Nueve de los 17 pacientes con respuesta completa en la radiación desarrolló una recaída mientras que no se observaron recaídas en el grupo en combinación.
Tseng <i>et al</i> , 2015	41 pacientes con sarcoma de tejidos blandos en extremidades o tronco.	Dosis de 700 mg/m ² (por medio de infusiones de 10 mg/m ² /min en los días 1, 8, 22, 29, 43 y 50) en combinación con dosis fija de haz externo radioterapia de 50 Gy (en 25 sesiones durante 5 semanas). Cuando ambos eran el mismo día, la	Solo 35 completaron el estudio de los cuales 4 pacientes experimentaron toxicidad nivel 4, se obtuvo necrosis tumoral del 90% en 17 pacientes mientras 15 obtuvieron una respuesta completa. Hubo supervivencia de 5 años libre de recurrencia, la

		<p>difluorodesoxicidina fue administrada 4 horas antes que la radiación.</p>	<p>supervivencia libre de metástasis a distancia, y las tasas de supervivencia fueron del 85%, 80% y 86%, respectivamente.</p>
--	--	--	--

En cuanto a las ventajas que tienen para usar difluorodesoxicidina, Verma y colaboradores (2009) destacan su fácil administración, además de que es bien tolerado y en la quimioterapia concurrente.

Bustamante-Valles (2009) hace mención de la eficiencia de la quimioradioterapia ya que ofrece un mejor control locorregional y una supervivencia de 5 años e intervalo libre de enfermedad.

Chahuan y colaboradores (2008) no encontraron efecto radiosensibilizador pero sí efectos tóxicos como mucositis, náuseas, vómito, además de que algunos casos presentaron reacciones en la piel como eritema grado 1 y 3, descamación, ampollas, exudación o pérdida de peso, en un total de 80 personas.

Por otro lado, se sabe que en parte la acción radiosensibilizadora en células HT-29 se debe a la alteración de las pozas de dATP y dTTP que tiene la difluorodesoxicidina. (Shewach *et al.*, 1994). Además Amouzegar y colaboradores reportaron en 2013 que la exposición a difluorodesoxicidina produce perturbaciones en la alberca de dNTP (desoxinucleotрифosfato) disminuyéndolo en la célula, lo que en combinación con la redistribución dentro de la fase S perjudica la reparación del daño al ADN producido por la radiación.

Van Bree *et al.*, en 2008 proponen que la incorporación de la difluorodesoxicidina con ciclopentil citosina (CPEC por sus siglas en inglés) mejora notablemente la eficacia de la difluorodesoxicidina, lo cual se muestra en un aumento de la apoptosis. Para la interacción con la radiación se observa una mejora aditiva si se utiliza una dosis radiosensibilizadora de la difluorodesoxicidina.

Si bien la dosis de difluorodesoxicidina varía e influye mucho en los resultados, el rango de la misma es bastante amplio, por lo cual deben hacerse más estudios para estimar una dosis que sea efectiva, pues ésta también influye en respuesta a la radiación que se administra.

7. Mecanismo de acción del análogo BrdU

Aunque hay evidencias positivas sobre la actividad radiosensibilizadora de la difluorodesoxicidina, no se conoce el mecanismo de su acción. Se puede pensar por la analogía con la bromodesoxiuridina (BrdU), que también es un análogo de base sustituido con un halógeno, en éste caso con un átomo de Br (ver figura 10). Una diferencia importante es que el F en la difluorodesoxicidina está incorporado en el azúcar y no a la base como el caso del átomo de Br en la BrdU.

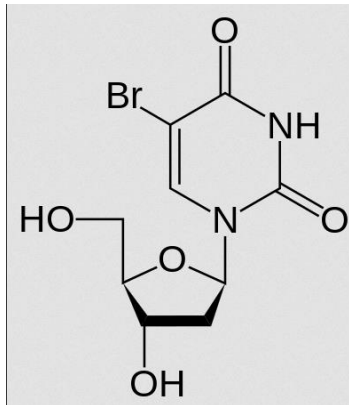


Figura10. Estructura de la bromodesoxiuridina

La BrdU es un análogo de la timidina, se sabe que reemplaza la timidina en el DNA por la similitud que tienen los radios de Van der Waals del átomo de bromo y del grupo metil (Kinsella *et al*, 1983) efecto que se ve reflejado en la tinción diferencial de las cromátidas hermanas y en la relación de la BrdU incorporada y la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) durante las divisiones de la célula (Rodríguez-Reyes & Morales-Ramírez, 2003)

Estudios previos realizados sobre la radiosensibilización de otro análogo de base sustituido con un halógeno, la BrdU, han permitido establecer la participación del átomo de bromo en ese efecto. Así un estudio reporta que la pérdida radiolítica del átomo de bromo es menor en DNA de doble cadena con respecto al de cadena sencilla (Cecchini *et al*, 2004). Posteriormente se obtuvo evidencia de que la BrdU está relacionada con la formación de enlaces intercadena principalmente en regiones con errores de apareamiento, por lo que los autores proponen que la radiosensibilización está limitada a regiones de cadena sencilla como las zonas de transcripción u horquillas de replicación (Cecchini *et al*, 2005). Estos resultados han sido confirmados y se ha obtenido evidencia adicional que los enlaces cruzados y rupturas se producen en la forma-B del DNA sustituida con BrdU (Dextraze *et al*, 2007). Por lo que es posible que los átomos de flúor de la difluorodesoxicidina tuvieran un efecto similar.

8. Importancia del problema:

La radioterapia es una de las técnicas más importantes utilizadas para el tratamiento del cáncer, junto con la cirugía y la quimioterapia, puede ayudar a evitar la amputación quirúrgica en algunos casos (González & Rabin 2011, Orth *et al*, 2014).

La asociación de la radioterapia y la quimioterapia es una alternativa útil para los pacientes, la cual en la mayoría de los casos está en fase de experimentación, con ella se pretende estandarizar nuevos protocolos que sean menos agresivos en conjunto.

Dentro de la quimioterapia aplicada hay agentes químicos que ayudan a sensibilizar a la célula ante la radiación, a éstos se les llama agentes radiosensibilizadores, que si bien muchos ya son aplicados como citosina arabinósido (ara-C, citarabina), tiopurinas 6 mercaptopurina (6-MP) y 6-tioguanina (6TG) otros siguen en fase experimental (Galmarini *et al*, 2001).

La difluorodesoxicitidina es un fármaco que tiene gran actividad antineoplásica en cánceres de cabeza y cuello. Su capacidad de radiosensibilización reportada es variable, e incluso se han encontrado datos negativos como mucositis, toxicidad hematológica, toxicidad renal, toxicidad hepática entre otras. Aunque no existe una dosis estándar de difluorodesoxicitidina asociada a radioterapia ésta va entre 10 y 300 mg/m² en diversos ensayos clínicos (Bustamantes-Valles, 2006)

En la actualidad no se ha demostrado si la difluorodesoxicitidina tiene o no un efecto radiosensibilizador, si bien hay trabajos que hablen al respecto no se ha llegado a una conclusión que permita proponer un posible protocolo para la aplicación de ésta quimioradioterapia efectiva.

9. Pregunta de investigación

¿Tiene la difluorodesoxicitidina un efecto radiosensibilizador?

¿Se puede demostrar el efecto radiosensibilizador de la difluorodesoxicitidina en células de la médula ósea de ratón, mediante el análisis de daño en el DNA usando electroforesis unicelular en gel?

10. MÉTODOLÓGÍA

Para evaluar el daño producido por la difluorodesoxicitidina la cual se administró la vía intraperitoneal 30 minutos antes de la obtención de la médula ósea y para el tratamiento en conjunto con radiación (grupo 4), de igual manera se administró 30 minutos previos a ser irradiados los ratones con 0.5 Gy para obtener la muestra inmediatamente después de ésta. Para observar el daño producido en el DNA se utilizó la técnica de electroforesis unicelular en gel (EUG).

Cada muestra consistió en 25 microlitros (μL) de la médula ósea de un fémur obtenida por arrastre con 1.0 mL de solución de Hanks.

10.1 Protocolos

Se establecieron 4 grupos de 5 individuos cada uno, con diferentes tratamientos descritos en los 3 protocolos a continuación:

10.1.1 Protocolo 1

Grupo 1: testigo

El grupo testigo no recibió tratamiento alguno por lo cual se obtuvo la muestra inmediatamente.

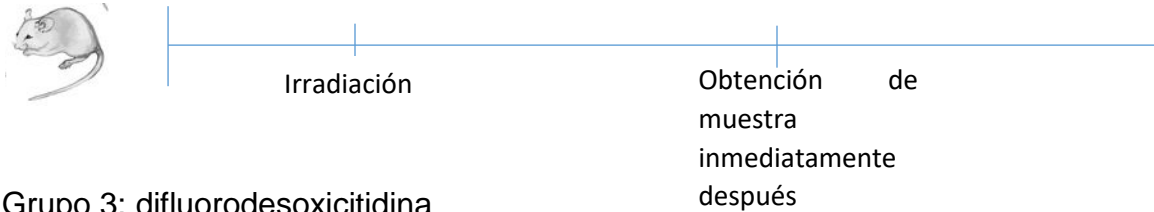


Tiempo 0

Obtención de muestra

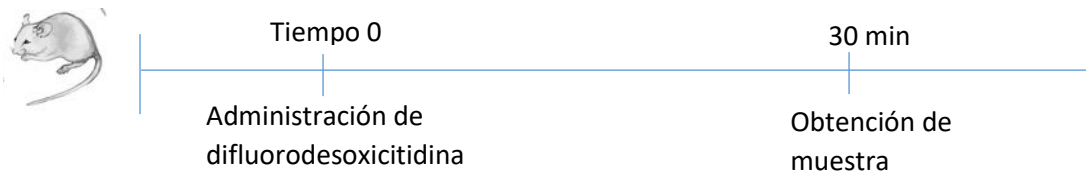
Grupo 2: radiación

El segundo grupo fue irradiado con una dosis de 0.5 Gy de una fuente de cobalto 60 después de lo cual se obtuvo la muestra.



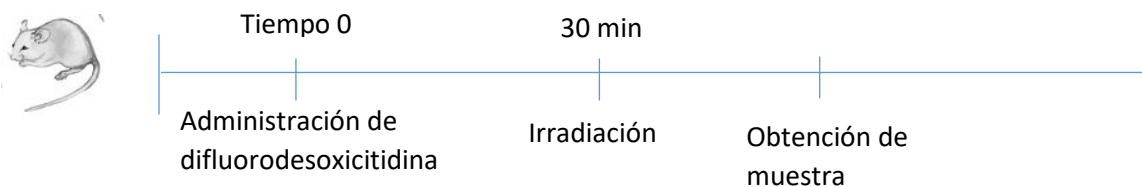
Grupo 3: difluorodesoxicitidina

A los ratones del tercer grupo se les administró difluorodesoxicitidina a una dosis de 30 μ mol/kg en 0.2 mL en agua por vía intraperitoneal



Grupo 4: difluorodesoxicitidina + radiación

Los ratones del grupo experimental fueron tratados con una dosis de difluorodesoxicitidina de 30 μ mol/kg 30 minutos antes de ser irradiados con una dosis de 0.5 Gy, después de lo cual se obtuvo la muestra inmediatamente



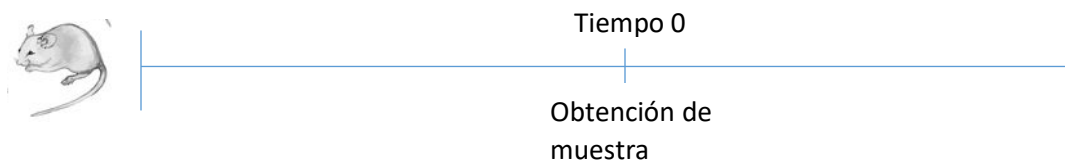
Se realizó un segundo experimento en el cual se cambiaron las dosis administradas de nuestros agentes, la dosis de la difluorodesoxicitidina se redujo a la tercera parte de la incorporada la primera vez y la radiación se redujo a la mitad de la administrada en el primer protocolo. De igual manera se realizó un segundo

protocolo que se siguió para nuestros cuatro grupos que se describe a continuación.

10.1.2 Protocolo 2

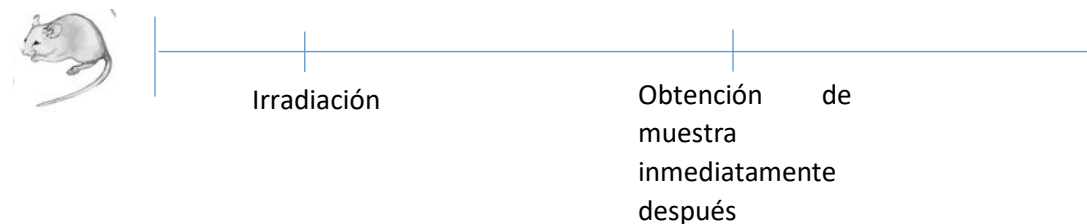
Grupo 1: testigo

El grupo testigo no recibió tratamiento alguno por lo cual se obtuvo la muestra inmediatamente.



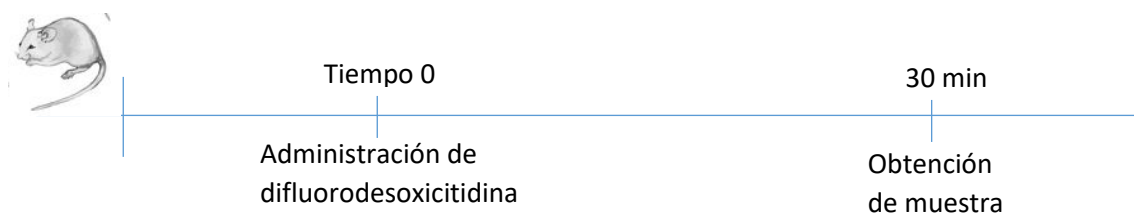
Grupo 2: radiación

Nuestro segundo grupo fue irradiado con una dosis de 0.25 Gy de una fuente de cobalto 60 después de lo cual se obtuvo la muestra.



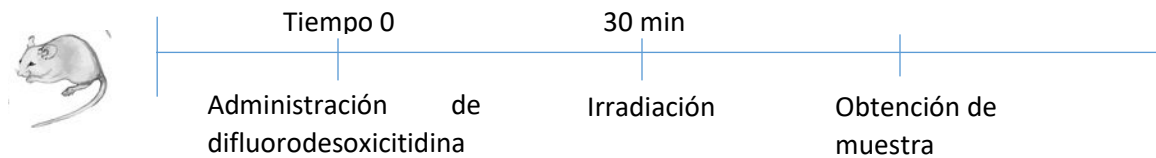
Grupo 3: difluorodesoxicidina

A los ratones del tercer grupo se les administró 0.2 mL de difluorodesoxicidina vía intraperitoneal siendo ésta de una dosis de 10 μ mol/kg



Grupo 4: dFdC + radiación

Los ratones de nuestro grupo problema fueron tratados con una dosis de difluorodesoxicidina de $10\mu\text{molas/Kg}$ 30 minutos antes de ser irradiados con 0.25 Gy , después de lo cual se obtuvo la muestra inmediatamente.

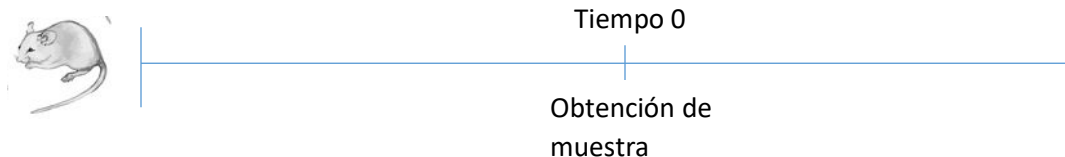


Se realizó un tercer protocolo en el cual se hizo la variación en la administración de la difluorodesoxicidina usando como dosis para los 3 grupos la del anterior protocolo ($30\mu\text{molas/Kg}$) el cual se describe a continuación.

10.1.3 Protocolo 3

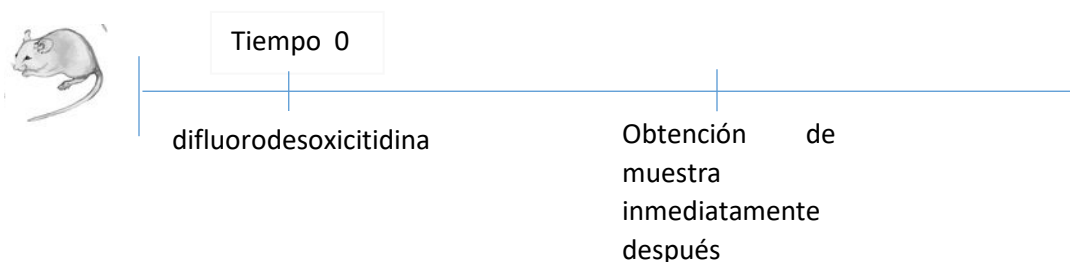
Grupo 1: testigo

El grupo testigo no recibió tratamiento alguno por lo cual se obtuvo la muestra inmediatamente.



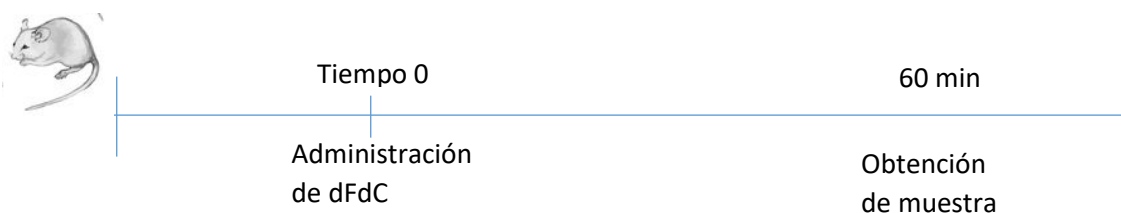
Grupo 2: tiempo 0 difluorodesoxicidina

Se les administró 0.2 mL de difluorodesoxicidina vía intraperitoneal siendo ésta de una dosis de $10\mu\text{molas/Kg}$ inmediatamente después se obtuvo la muestra lo más rápido posible.



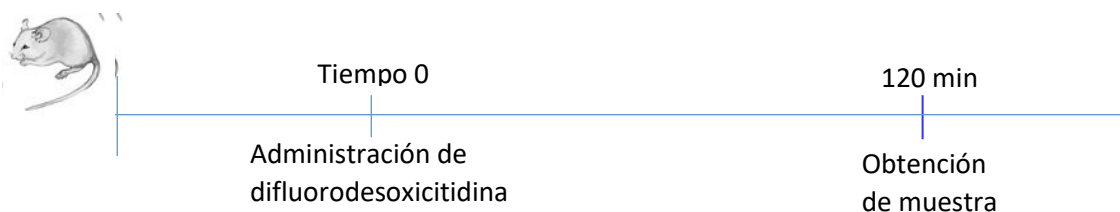
Grupo 3: difluorodesoxicitidina a los 60 minutos

Se administró 0.2 mL de difluorodesoxicitidina vía intraperitoneal siendo ésta de una dosis de 10 μ mol/Kg, después de 60 minutos se obtuvo la muestra.



Grupo 4: difluorodesoxicitidina a los 120 minutos

Los ratones fueron tratados con una dosis de difluorodesoxicitidina de 10 μ mol/Kg 120 minutos antes de obtener la muestra.



10.2 Animales:

Se usaron ratones machos de la cepa ICR de 2 a 3 meses de edad, con un peso aproximado de 30 gramos. Los organismos permanecieron 3 días alimentados con

comprimidos Purina para pequeños roedores y agua *ad libitum* bajo condiciones controladas de temperatura y de circulación de aire.

10.3 *Modelo biológico experimental*

Células de la médula ósea de ratón, que están en división continua y pueden incorporar la difluorodesoxicidina que es un análogo de base.

10.4 *Difluorodesoxicidina:*

La difluorodesoxicidina (de Sigma) se disolvió en H₂O y se administró mediante una inyección intraperitoneal de 0.2 mL a una dosis de 30 μ mol/kg y 10 μ mol/kg de peso corporal, lo cual se obtuvo por medio de las diferentes diluciones hechas.

10.5 *Irradiación*

Los animales se irradiaron en forma individual en el Gamacell que es una fuente de Cobalto (⁶⁰Co) a una dosis de 0.5 Gy y .025 Gy de radiación gamma (γ). Para cada caso fueron colocados dosímetros para comprobar la dosis recibida.

10.6 Procedimiento

Se realizó electroforesis unicelular en gel bajo condiciones alcalinas.

Electroforesis unicelular en gel (EUG):

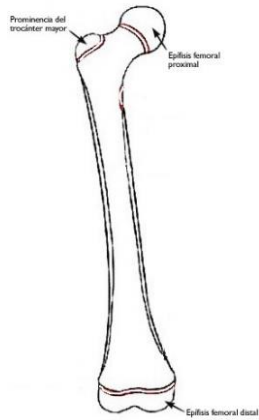
Para evaluar el daño en células individuales Östling y Johanson (1984) desarrollaron un método en el que después de una lisis y un corrimiento de electroforesis son procesadas para una tinción fluorescente que al ser vistas bajo el microscopio éstas se asemejan a un cometa con cabeza y cola (Klaude *et al.*, 1996).

El Ensayo de Cometa o electroforesis en gel de células individuales, es un método sensible que bajo condiciones alcalinas detecta rupturas simples de cadena del DNA y sitios álcali lábiles. En esta técnica, las células son embebidas en un gel de agarosa en un portaobjetos, sometidas a lisis alcalina y luego corridas por electroforesis durante un corto tiempo (40 min) bajo condiciones alcalinas (pH > 13). Las células con mayor daño del DNA muestran una migración aumentada desde el núcleo hacia el ánodo. Las ventajas de esta técnica incluyen: (a) los datos son colectados al nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación; (b) se requieren sólo pequeños números de células y (c) virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada (Di Giorgio *et al.* 2001).

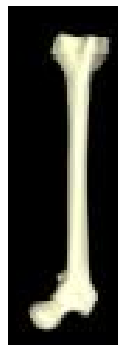
10.6.1 Manejo de las muestras

Una vez obtenido el fémur de cada ratón se realizaron tres cortes (marcados en la imagen) para obtener por arrastre la médula ósea introduciendo un mililitro de solución de Hanks el cual fue depositado en un tubo de centrifuga, se mantuvieron en hielo para impedir la reparación de lesiones en el DNA.

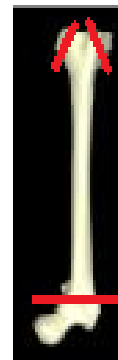
Para prevenir lesiones adicionales al DNA causadas por los efectos de la luz se trabajó con luz tenue.



Muerte por dislocación cervical



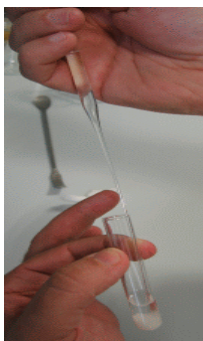
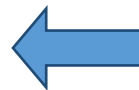
Extracción del femúr



Realizar cortes



inyectar la solución de Hanks (1ml) para que salga la médula por goteo



Resuspender



Tomar 25 μ l, con 1ml de sol. de Hanks. En hielo

10.6.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras colectadas fueron centrifugadas durante 10 min a 2500 rpm a 5°C. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 µL de agarosa de punto de fusión bajo (APFB) al 0.5%. Esta mezcla fue colocada en una laminilla, que contenía previamente una capa de agarosa de punto de fusión normal (APFN) al 0.75 %, y se distribuyó con ayuda de un cubreobjetos.

Las laminillas fueron refrigeradas durante 5 min, una vez solidificada la agarosa, se les retiró el cubreobjetos por deslizamiento y se aplicó otra capa de 100 µL de APFB y se refrigeraron por 5 min más. Transcurrido el tiempo se les quitó el cubreobjetos y se sumergieron en solución de lisis a 4°C durante al menos 1 hr. Posteriormente las laminillas fueron transferidas con cuidado a una cámara de electroforesis y se sumergieron en buffer para electroforesis (pH<13) a 4 °C durante 40 min para permitir el desenrollamiento del DNA y la expresión de sitios lábiles al álcali. El corrimiento electroforético se realizó durante 40 min a 23 volts y 300 miliamperes. Finalmente, las laminillas se enjuagaron con buffer es Tis-HCl pH 7.5 y se deshidrataron con metanol para su análisis posterior. La tinción se efectuó con 70 µl de bromuro de etidio a una concentración de 20 µg/mL, de cada laminilla se analizaron 50 nucleoides, para cada tratamiento se analizaron 2 laminillas para obtener un total de 100 nucleoides analizados en total.



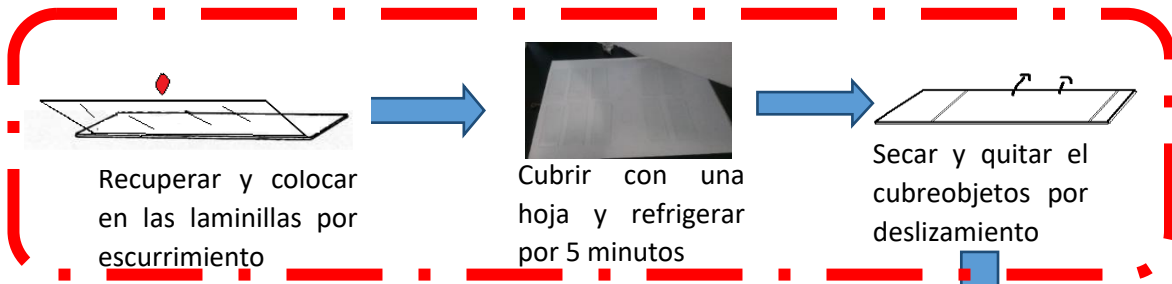
Añadir 100µl de APFB y resuspender



Retirar sobrenadante



Centrifugar a 2500 rpm por 10 min a 5°C



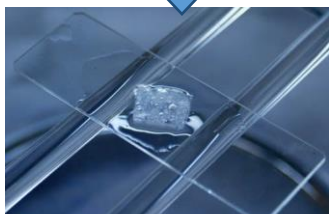
Ecurrir las laminillas levemente y agrega hielo alrededor de la cámara y cubrir. Esperar 40 minutos. Hacer corrimiento por 40 minutos



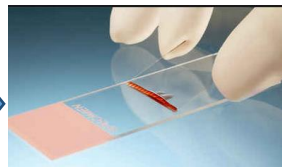
Colocar en solución de electroforesis y cubrir la caja copplin con papel aluminio.



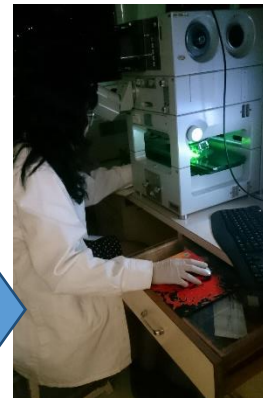
Repetir el procedimiento



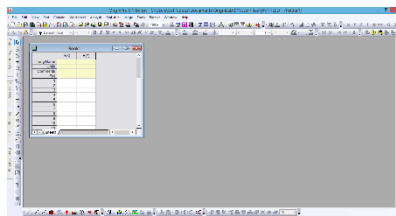
Ecurrir, y lavar con solución trizma y metanol, 4 veces cada uno con diferencia de 3 minutos.



Añadir 70µl de bromuro de etidio a cada laminilla



Analizar bajo microscopio de fluorescencia (COMET IV)



Ordenar los datos y analizar con el programa Origin

10.7 *Estadística*

Para determinar si había diferencia significativa entre los grupos se utilizó la prueba estadística de t-Student contrastando los resultados obtenidos para cada grupo con los resultados obtenidos del grupo testigo y con el grupo al cual se le administró la difluorodesoxicitidina junto con la radiación para lo cual se realizó una tabla para cada experimento.

10.8 *Dosímetros*

La irradiación recibida por los ratones se comprobó por medio de dosímetros suministrados por el laboratorio de luminiscencia del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares para los cuales se realizó un estudio para determinar la dosis basados en su experiencia.

Hay varios tipos de dosímetros, éstos van en función de lo que se desea evaluar, por ejemplo los que miden frecuencias o longitudes de onda.

Nosotros usamos los dosímetros LiF: Mg,Cu,P+PTFE que son hechos con fluoruro de litio activado con magnesio, cobre y fósforo y PTFE. Son dosímetros de termoluminiscencia, los cuales tienen un peso molecular similar al tejido, esto nos ayuda a garantizar una mayor precisión en la lectura.

De un stock de dosímetros que tienen ellos se localizó un grupo que fuera lo suficientemente grande para completar el número de dosímetros que necesitaríamos.

El lote que se obtuvo no había sido expuesto a la radiación, se les dio su tratamiento estándar de borrado, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y en seguida se procedió a tomar sus lecturas de fondo.

Posteriormente los dosímetros se colocaron en portadosímetros de plástico para separarlos por grupos e irradiar los correspondientes a dosis de 0.5 Gy, 1.0 Gy, 1.5 Gy y 2 Gy; teniendo la relación del acomodo de éstos así como del grupo testigo, seguido de eso se realizaron las lecturas, se hicieron los ajustes necesarios y se obtuvieron los dosímetros para su utilización en los experimentos.

Los dosímetros de termoluminiscencia se leen viendo el reflejo de los fotones que son activados al administrar temperatura, los cuales son equivalentes a la dosis de radiación recibida.

La lectura de los dosímetros se llevó a cabo en el equipo lector de TL Harshaw Mod. 4000.

Después de ser leídos los dosímetros, éstos son sometidos a un tratamiento estándar de borrado, el cual consiste en calentar 240°C por 10min, seguido de 100°C por 2 horas.

10. Resultados.

Los resultados se obtuvieron mediante el análisis de las laminillas, que se realizó con el programa comet IV, en el cual se contabilizaron 100 nucleoides por ratón en 2 laminillas (50 por laminilla). Para el conteo de los nucleoides el microscopio cuenta con una cámara que transmite la imagen en vivo a una computadora con dicho programa. La imagen al microscopio se visualiza a color (ver figura 11) mientras la cámara la transmite a blanco y negro (ver figura 12).

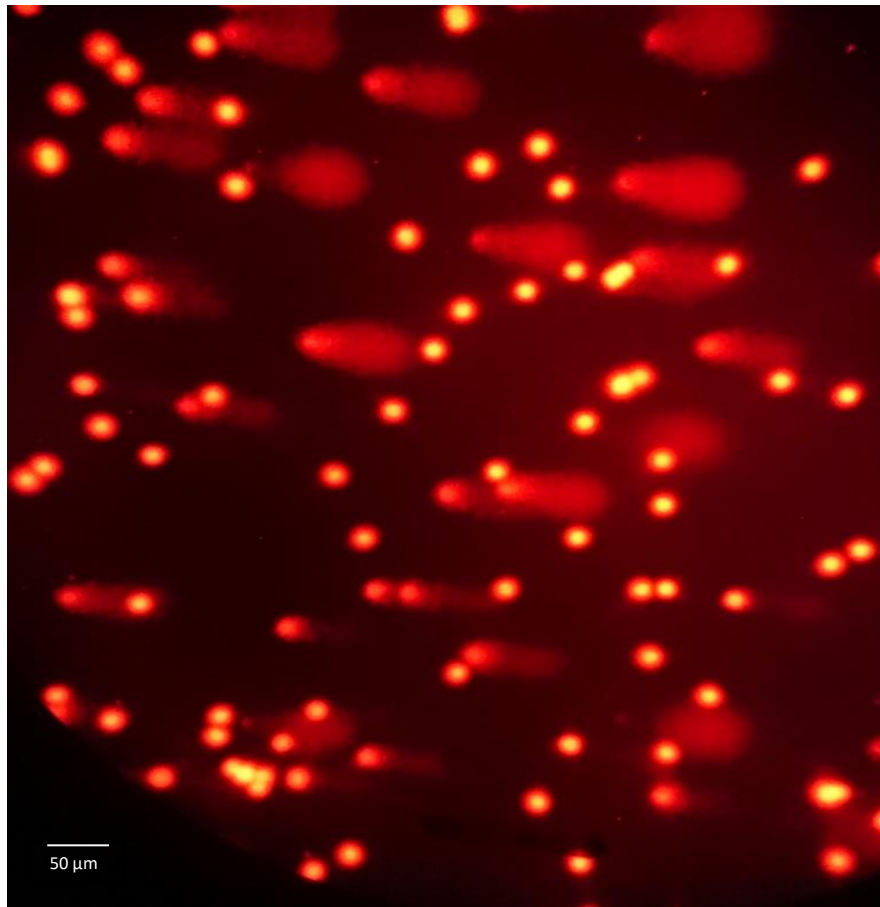


Figura 11. Vista al microscopio de los cometas.

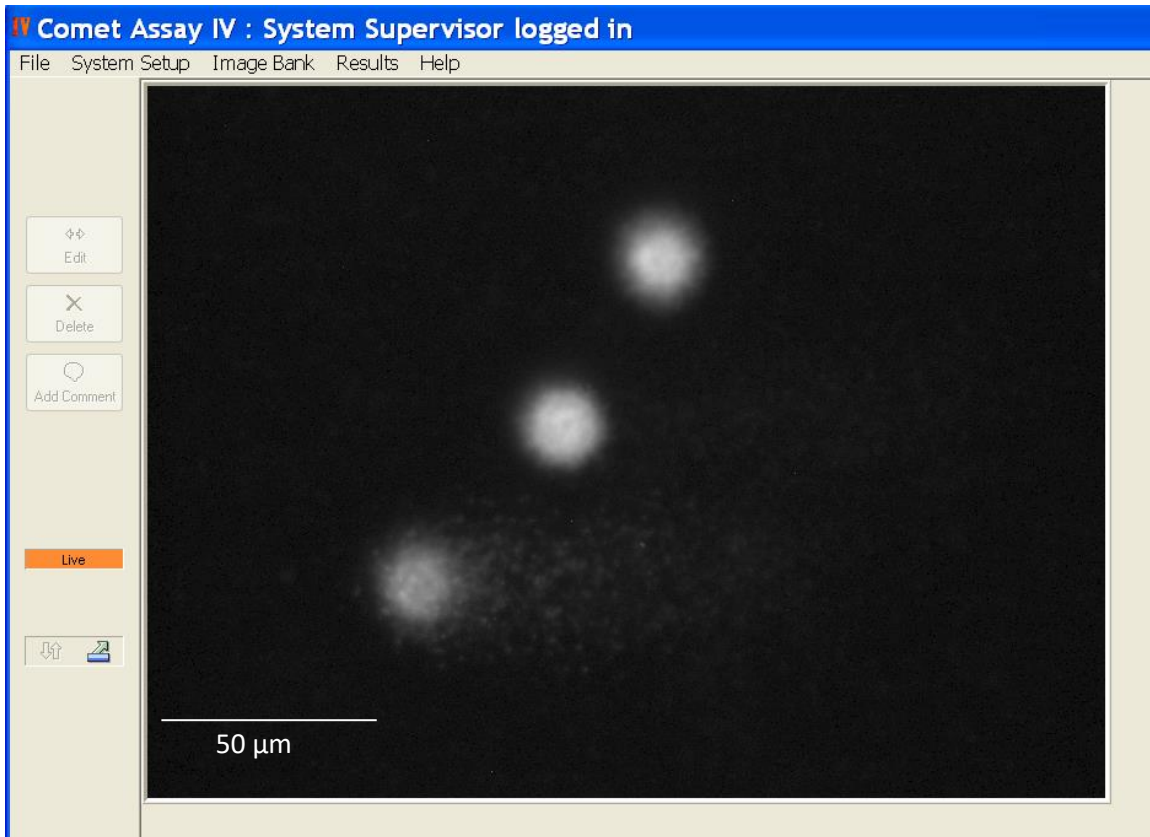


Figura 12. visualización de cometas con el programa comet IV.

El programa transmite una imagen del microscopio en vivo a la computadora para que de forma manual el nucleoide sea identificado, marcado (ver figura 13 b) y contabilizado al mismo tiempo que éste va creando una base de datos con la longitud de la cauda de los nucleoides. La figura 13 muestra un nucleoide no dañado lo cual se infiere por la usencia de la cauda, ya que la cauda está formada por los fragmentos que migran al hacer el corrimiento de electroforesis. En contraste la figura 14 muestra un nucleoide dañada con cauda, en el cual se puede ver la semejanza que tiene a un cometa.

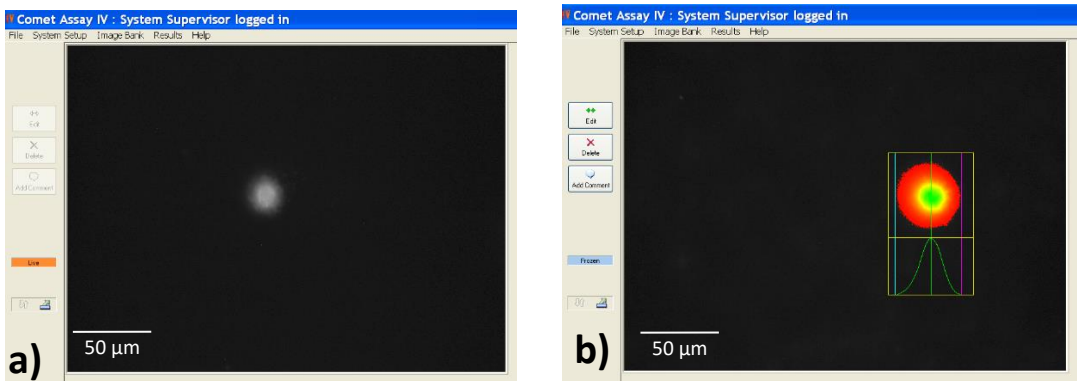


Figura 13. Nucleoide no dañado **a)** no marcado y nucleoide **b)** marcado en el programa comet IV.

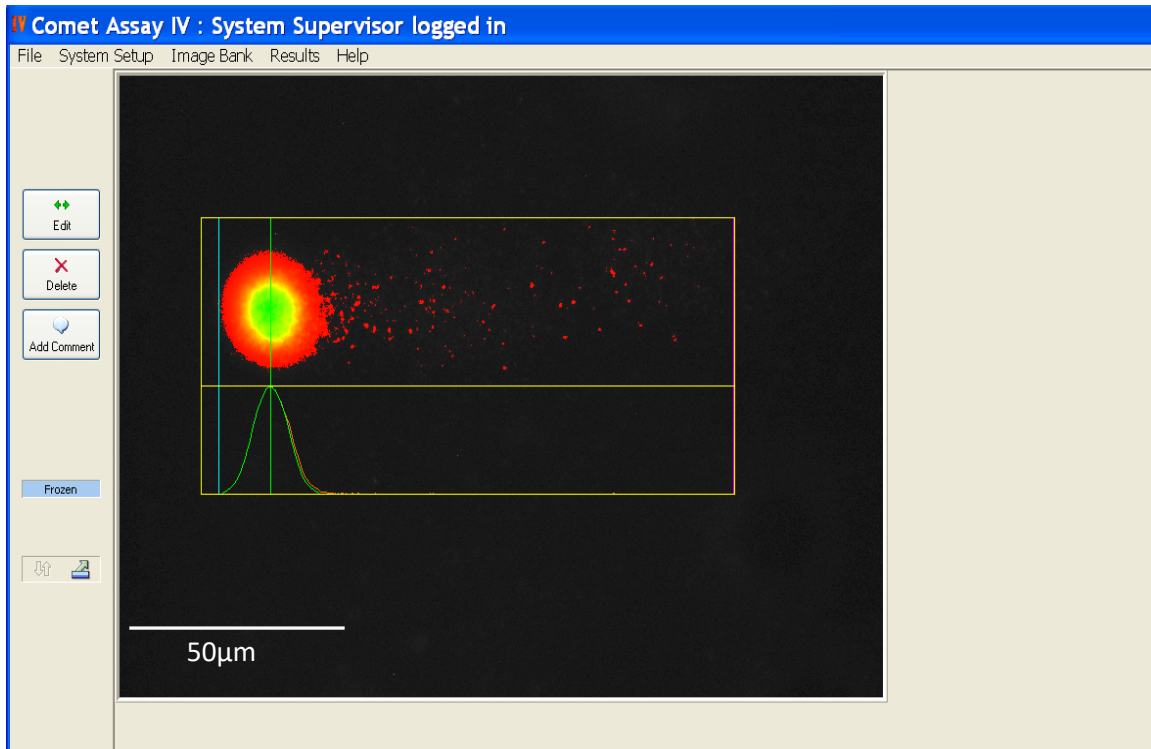


Figura 14. Nucleoide dañado, marcado en el programa comet IV.

Los criterios que fueron tomados en cuenta para evaluar los nucleoides fueron:

Forma definida (ver figura 15)

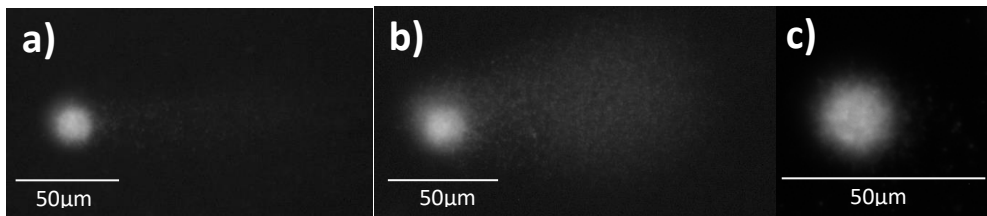


Figura 15. **a)** cometa pequeño, **b)** cometa mediano y **c)** célula no dañada

No interfiriera otra célula cerca (ver figura 16)

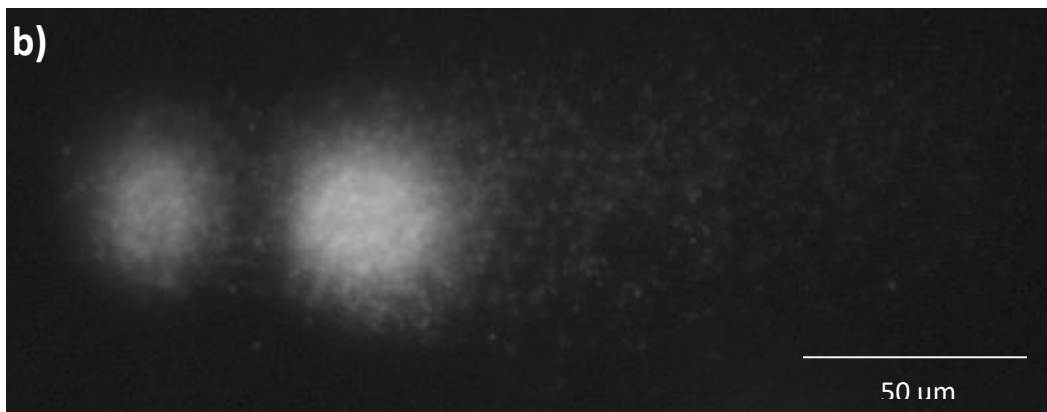
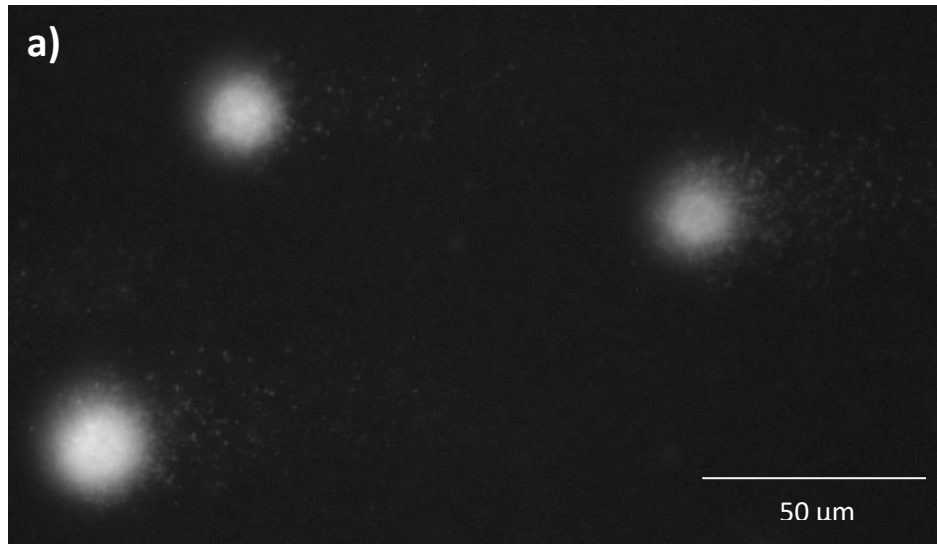


Figura 16. Ejemplo de cometas **a)** cometas distanciados entre sí que pueden identificarse, **b)** cometas juntos que no se distinguen entre sí.

Durante la irradiación de los organismos se utilizaron dosímetros de termoluminiscencia que fueron colocados de forma individual previos a la irradiación para verificar la dosis que recibió cada uno (ver tabla 4). Los dosímetros están registrados con un número proporcionado por el laboratorio de luminiscencia del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por lo cual la numeración no es continua. El registro muestra que las dosis recibidas están dentro del rango esperado de acuerdo al promedio, marcado en el protocolo 1 (0.5 Gy).

Tabla 4. Lecturas de dosímetros para los grupos 2 y 4 del protocolo 1		
Número de dosímetro	Grupo	Dosis (Gy)
1	2	0.46
2	2	0.45
3	2	0.47
5	2	0.55
6	2	0.46
Promedio:		0.48±0.04
7	4	0.60
8	4	0.49
10	4	0.49
11	4	0.42
12	4	0.50
Promedio:		0.5±0.06

Una vez obtenidos los resultados del programa comet IV se analizaron en el programa origin, en la figura 17 se muestran los resultados para los 4 grupos evaluados. Para interpretar las gráficas se consideró que las células de más de 20 μm indican daño, aunque en el caso del grupo testigo éstas son las correspondientes a las células que se encontraban en síntesis durante la toma de la muestra. Para los demás grupos se puede apreciar el aumento del daño tanto en frecuencia como en cantidad de daño producido con respecto al grupo testigo. El grupo tratado con radiación y el grupo tratado con difluorodesoxicitidina muestran mayor cantidad de daño lo cual se ve reflejado en la forma de la gráfica que se inclina hacia la derecha indicando caudas más grandes. Por otra parte el daño se ve reflejado en porcentaje; en el grupo al cual se le administró la difluorodesoxicitidina el porcentaje de células no dañadas corresponde a un 27% indicando entonces que el 73% restante tiene un daño. El grupo tratado con radiación muestra células sin daño correspondientes al 35% y las células con daño al 65%. En el grupo al cual se le administraron ambos agentes

(difluorodesoxicitidina + radiación) se muestra una forma similar a los efectos de ambos grupos, pero tomando en cuenta el daño producido no se observa un efecto sinérgico ni siquiera aditivo, ya que se esperaba que el daño producido fuese la suma del daño que produjo cada agente por separado que determinase un efecto radiosensibilizador. El porcentaje de daño fue del 65%, es decir, tiene un alto grado de similitud al daño reportado para el grupo al que sólo se le administró la difluorodesoxicitidina, lo cual nos indica que no hubo siquiera un efecto aditivo ya que éste valor no aumentó. Paradójicamente podría indicarnos un efecto radioprotector puesto que el daño producido es ligeramente menor al esperado de la suma de ambos agentes.

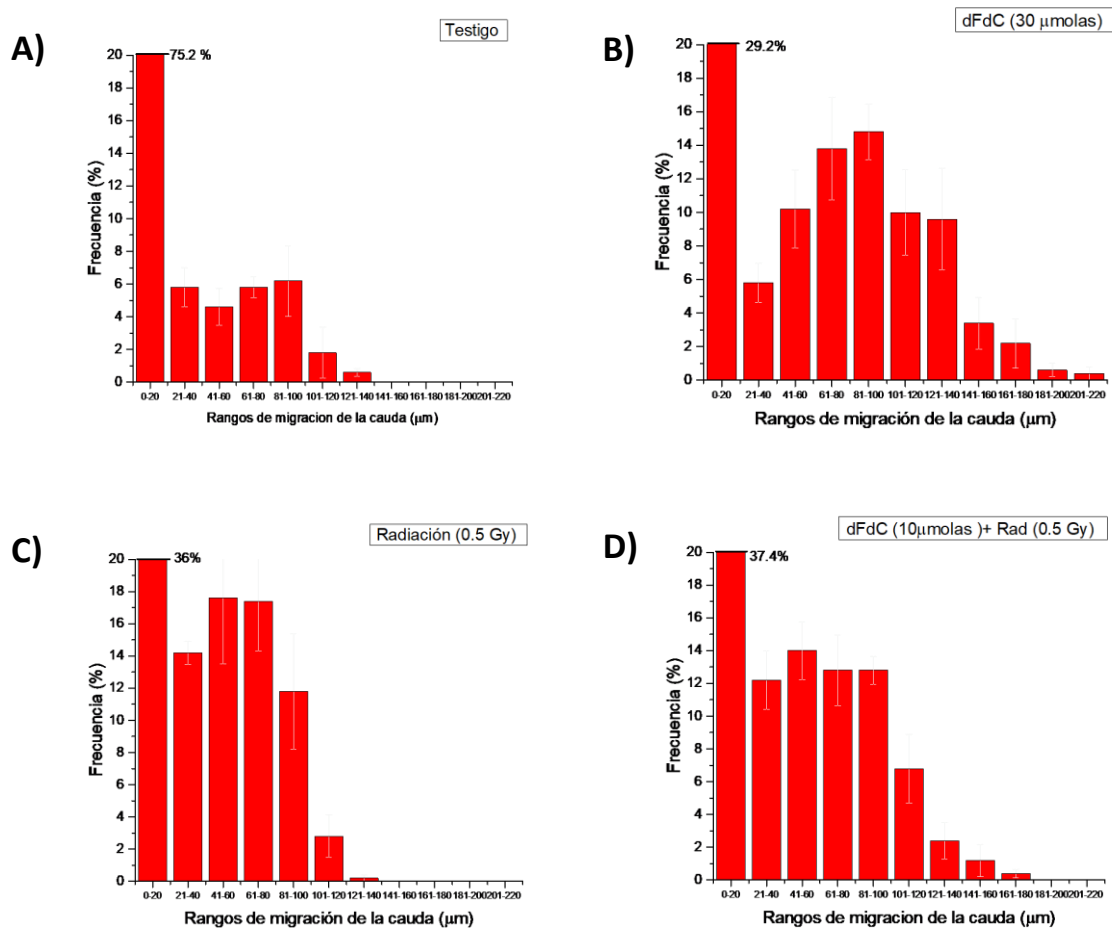


Figura 17. Gráficas de frecuencias de daño y error estándar. La suma de las barras corresponde al 100%. **A)** Grupo testigo **B)** Grupo tratado con 30 µmol de difluorodesoxicitidina **C)** Grupo tratado con 0.5 Gy **D)** Grupo tratado con 30 µmol de difluorodesoxicitidina y 0.5 Gy de radiación.

En la Tabla 5 se muestran los datos estadísticos y el cálculo de la tasa de radiosensibilización. Para establecer si había diferencia significativa entre los grupos se utilizó la prueba estadística de t-Student. Los resultados indican que todos los grupos tratados fueron estadísticamente mayores que el valor testigo. Asimismo, se comparó la significatividad del grupo con el tratamiento combinado con los grupos con tratamiento simple. Los resultados indican que solamente el tratamiento con radiación resultó significativo. En la segunda columna se muestra el incremento de células dañadas, más de 20 μm con respecto al testigo sin tratar. Se confirma que la suma de los tratamientos individuales es mayor que el valor del tratamiento combinado, es decir, que no hubo efecto ni sinérgico ni aditivo. Por otro lado se debe destacar que en este caso no podría mostrarse un efecto radiosensibilizador, pues eso significaría que dicho efecto se reflejaría en el porcentaje de daño presentado que excedería el 100%. La tasa de sensibilización que es equivalente al cociente del tratamiento combinado entre la suma de tratamientos independientes resultó ser 0.44, es decir que el efecto combinado es 60% menor que el tratamiento esperado por la suma de tratamientos, resultados que nos permiten corroborar lo antes mencionado.

Tabla 5. PORCENTAJE DE CÉLULAS CON UN LARGO DE CAUDA MAYOR A 20 MICRAS EN LOS GRUPOS CONTROL Y TRATADOS CON RADIACIÓN (0.5 Gy), dFdc (30 μm) O AMBAS

Tratamiento	% Células con caudas mayores de 20 micras	Incremento	Diferencia	Tasa de Sensibilización
Control	24.8 \pm 9.5			
dFdc	70.8 \pm 10.9 *, NS	46.0		
Radiación	64.0 \pm 20.7 ^{ns, **}	39.2		
dFdc + Rad	62.6 \pm 3.6*	37.8	-47.4	0.4437

* Significativo vs control; ** significativo vs dFdc-Rad. ns: no significativo vs control; NS no significativo vs dFdc-Rad; prueba t de Student $p < 0,05$

Del mismo modo para el segundo experimento en el que se utilizó el protocolo 2, para corroborar la dosis de irradiación recibida se utilizaron dosímetros de termoluminiscencia ya que tienen un rango de sensibilidad amplio y dentro de los valores utilizados, que van desde 0.01 Gy hasta 2 Gy; para poder ser utilizados los dosímetros por segunda vez, éstos fueron borrados por medio de un tratamiento de calor tiempo antes de ser utilizados. La mayoría de nuestros datos muestran valores cercanos al marcado en el protocolo 2 (0.25 Gy) o con una muy pequeña diferencia en comparación con el valor esperado.

Tabla 6. Resultados de dosímetros para los grupos 2 y 4 del protocolo 2.		
Número de dosímetro	Grupo	Dosis (Gy)
1	2	0.23
2	2	0.24
3	2	0.26
5	2	0.28
6	2	0.26
Promedio	0.25±0.01	
7	4	0.31
8	4	0.26
10	4	0.25
11	4	0.26
12	4	0.27
Promedio	0.27±0.02	

La figura 18 muestra los resultados de un segundo experimento de acuerdo con el protocolo 2, para lo cual se bajaron las dosis de nuestros agentes, tratando de obtener un resultado apenas notorio cuando fuesen administrados por separado y que nos permitiera determinar la acción en conjunto de una manera más precisa. Se observa que en el grupo testigo persiste cierto daño debido a las células que

se encontraban en división, nuestro grupo tratado con radiación muestra un daño correspondiente al 25%, con una forma similar a la del primer experimento; la gráfica correspondiente a difluorodesoxicitidina (dFdC) de igual manera que en el primer experimento muestra células con una cauda más grande indicando un grado mayor de daño correspondiendo 32%; mientras la gráfica para el grupo con el tratamiento combinado de dFdC mas radiación tiene daño en el 36% de las células evaluadas lo que nos afirma que hay un daño producido por ambos agentes pero no es suficiente para ser considerado como radiosensibilizador tomando en cuenta nuestros valores esperados.

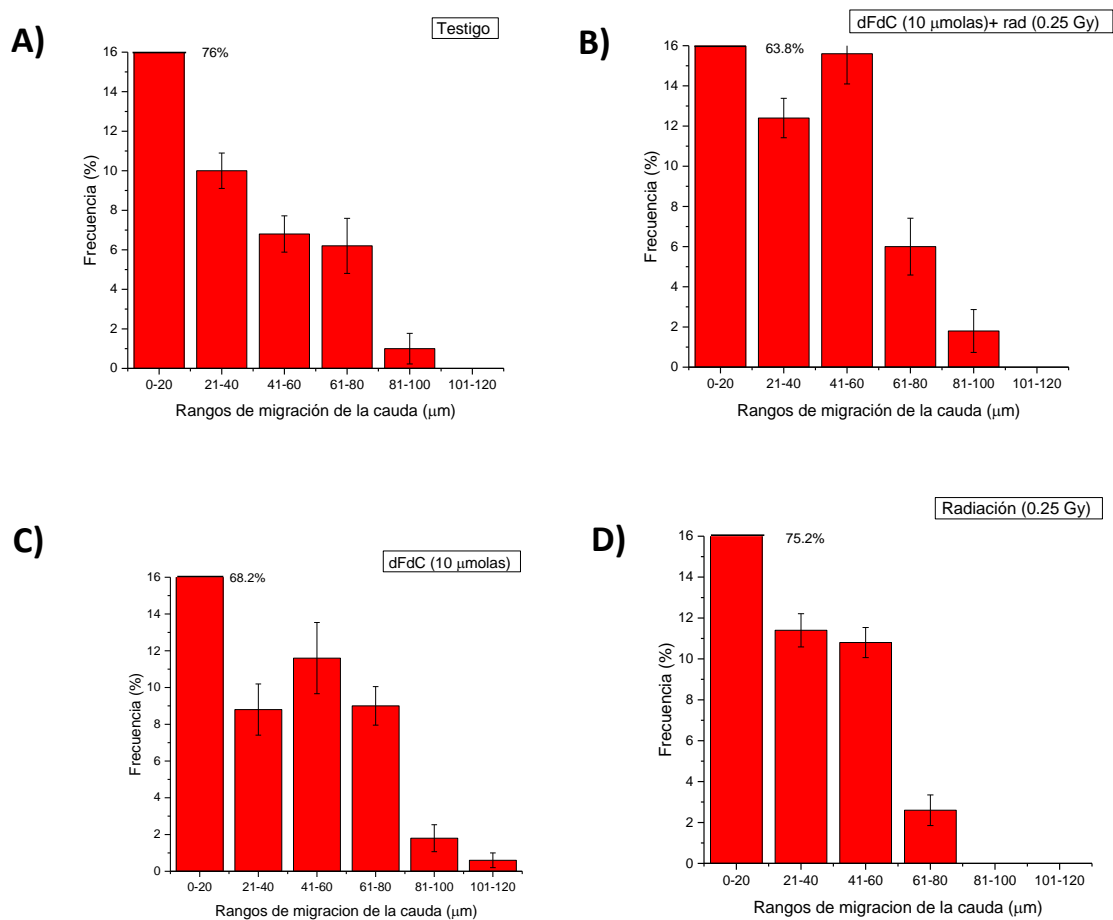


Figura 18. Gráficas de frecuencias de daño y error estándar **A)** Grupo testigo **B)** Grupo tratado con 10 µmol de dFdC y 0.25 Gy **C)** Grupo tratado con 10 µmol de dFdC **D)** Grupo tratado con 0.25 Gy de radiación.

Por otra parte, tomando en cuenta los valores de la tabla 7 son más bajos debido a que las dosis fueron más bajas, lo cual puede mostrarnos más sensibilidad de la prueba realizada, cabe destacar que el procedimiento fue el mismo aplicado para el anterior experimento, las únicas variantes fueron las dosis. Se muestra que entre los datos de los grupos probados por separado son bastante lejanos unos de otros, aunque se muestra un ligero aumento el grupo problema (dFdC + radiación), el cual sobrepasa un poco de la suma de los grupos evaluados por separado, lo cual podría tomarse como un efecto aditivo, aunque no como radiosensibilizador que el aumento es muy bajo.

Tabla 7. PORCENTAJE DE CÉLULAS CON UN LARGO DE CAUDA MAYOR A 20 MICRAS EN LOS GRUPOS CONTROL Y TRATADOS CON RADIACIÓN (0.25 Gy), dFdC (10µm) O AMBAS

Tratamiento	% Células con caudas mayores de 20 micras	Incremento	Diferencia	Tasa de Sensibilización
Control	24.0 ±6.2			
dFdC	33.0 ± 6.1 *	9.0		
Radiación	24.8 ± 1.5 ^{ns, **}	0.8		
dFdC + Rad	36.2 ± 5.8*	12.2	2.4	1.2

Ns no significativo; * Significativo vs control; ** significativo vs dFdC-Rad. Student t test p<0,05

Adicionalmente en este caso se contabilizaron las células que tuvieron un daño mayor al 95 % según Aristizábal (2009) quien presentó la siguiente clasificación del daño según la morfología de los daños (ver figura 19)

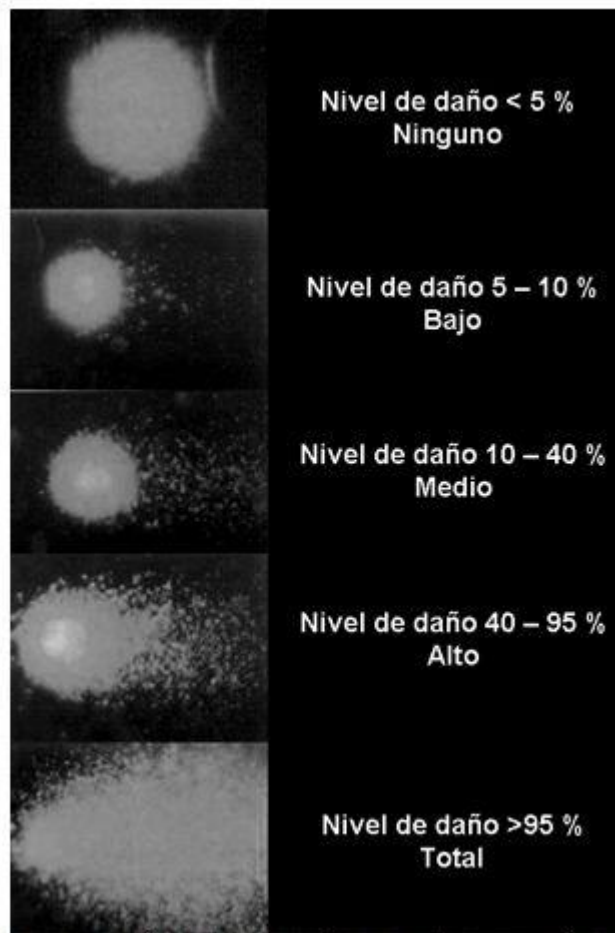


Figura 19. Nivel de daño según Aristizábal

Se contabilizaron el número de células con el daño mayor al 95% según lo antes mencionado, a lo que nosotros llamamos “nubes” que se obtuvieron por cada 100 analizadas por ratón, ya que por carecer de forma de acuerdo a lo establecido en la imagen previa, no se contabilizaron dentro de los resultados previos, gracias a lo cual obtuvimos los siguientes resultados al ser evaluados con una prueba de $t < 0.02$ o al testigo:

TABLA 8. PORCENTAJE DE NUCLEOIDES DESINTEGRADOS O “NUBES”	
	% Nubes
Testigo	9 ± 1.7
dFdC	15.4 ± 3.3 *
Rad	13.8 ± 3.9 *
dFdC + Rad	19.2 ± 5.2 *

*Estadísticamente significativos respecto al testigo

La tabla 8 muestra un resultado significativo en contraste con el grupo testigo que se puede inferir como el efecto resultado de la acción aditiva de la difluorodesoxicitidina, misma que se infiere por el incremento con respecto al valor esperado por la suma de la adición de ambos agentes por separado.

Adicionalmente se realizó un tercer experimento con la dosis de 10µmol/Kg, esta vez se variaron los tiempos en los cuales fue recolectada la muestra después de haber administrado la difluorodesoxicitidina, siguiendo el protocolo número 3. En la imagen 20 se muestra que, como en los experimentos anteriores, el grupo testigo muestra cierto porcentaje de daño correspondiente a las células que se encuentran en etapa de síntesis de DNA. El grupo al que se evaluó inmediatamente después de la administración de difluorodesoxicitidina (aproximadamente 5 minutos) puede apreciarse un nivel de daño mayor que en todos los grupos tratados. El grupo al cual se tomó la muestra 60 minutos después de la administración de la difluorodesoxicitidina, puede observarse que aunque el efecto de la droga es menor, es significativamente mayor que del grupo testigo. Finalmente, el grupo al que se tomó la muestra a los 120 minutos aunque es en el que se observa la menor respuesta, se ve que ésta es mayor que la del testigo aunque no estadísticamente significativa.

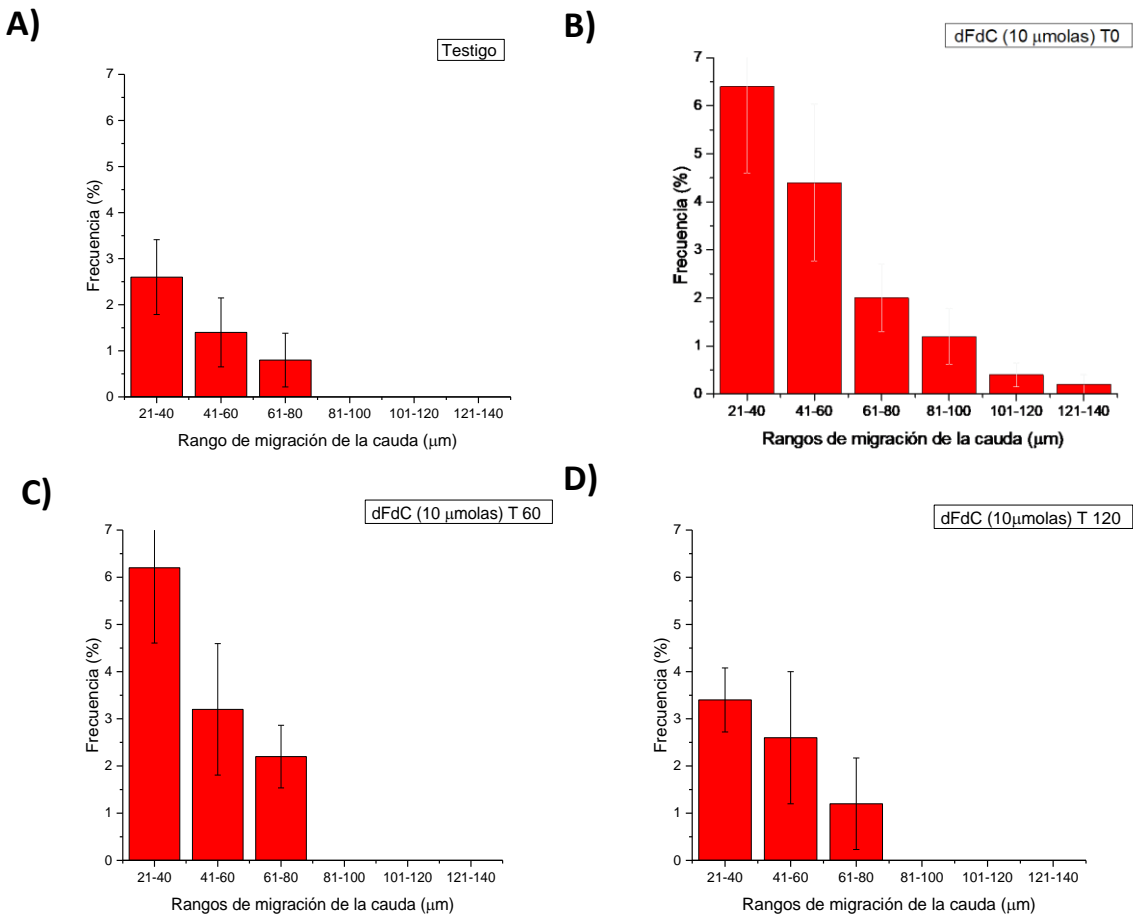


Figura 20. Gráficas de frecuencias de daño y error estándar **A)** Grupo testigo **B)** Grupo tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en *T0 **C)** Grupo tratado con 10μmol de difluorodesoxicitidina en *T60 **D)** Grupo tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en *T120.

*T (tiempo) Adicionalmente se eliminó la barra correspondiente a células no dañadas para hacer más notorio el efecto.

Tabla 9. Efecto del tiempo postratamiento sobre la frecuencia de cometas con migración de la cauda mayor de 21 μm

Tiempo postratamiento	% caudas mayores de 20 μm	n
Testigo		5
5 minutos	1.63 ± 1.70	5
60 minutos	1.13 ± 1.55	5
120 minutos	0.4 ± 1.18	5

Para hacer más notorios los resultados se graficaron los resultados obtenidos menos los valores del grupo testigo para cada grupo por separado que se muestran en la figura 21.

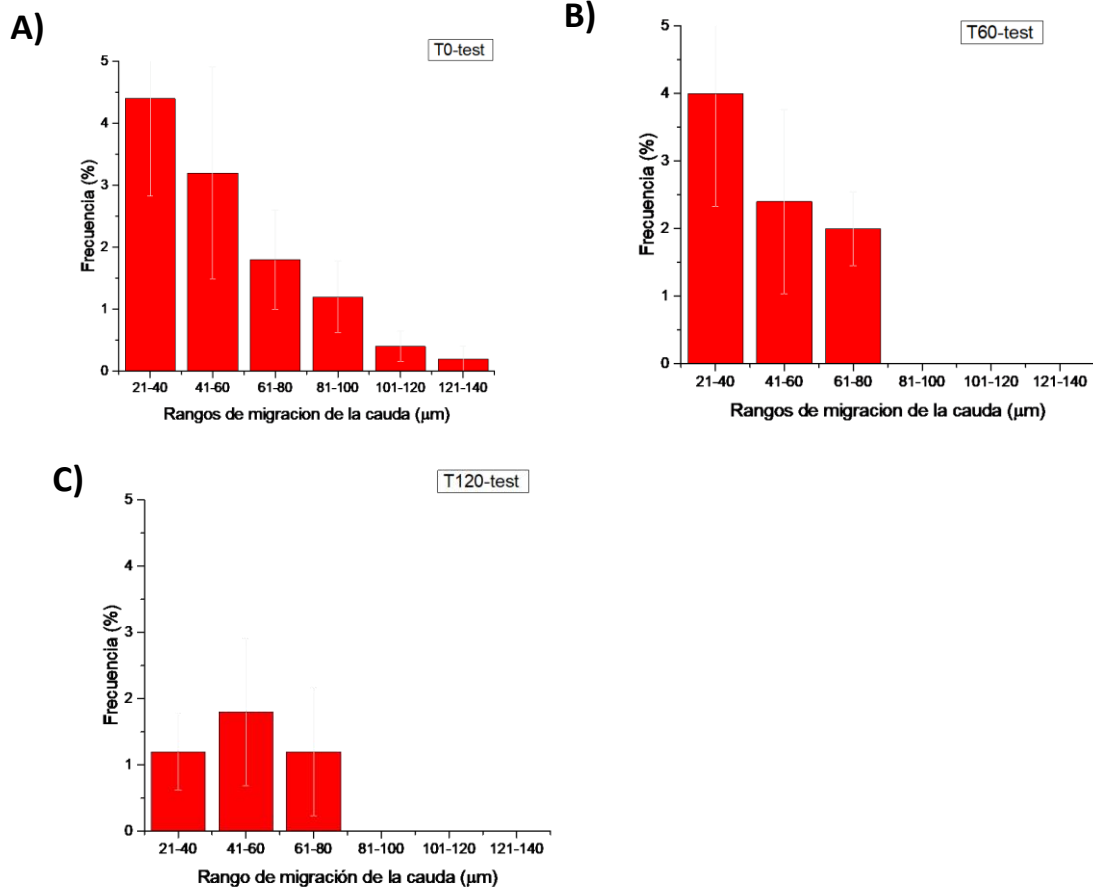


Figura 21. Graficas de frecuencias de daño y error estándar **A)** Grupo tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en *T0 menos grupo testigo **B)** Grupo tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en *T60 menos grupo testigo **C)** Grupo tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en *T120 menos grupo testigo. *T (tiempo) Adicionalmente se eliminó la barra correspondiente a células no dañadas para hacer más notorio el efecto.

En contraste con los resultados presentados anteriormente se encontró que dos ratones del primer grupo, el que fue tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en el grupo evaluado inmediatamente (T0) no presentaron respuesta alguna, es decir que no presentaron actividad, ya que incluso los testigos presentaron cierto daño y en el grupo evaluado en 60 min (T60) fue un individuo el que no mostró respuesta, por lo cual en la figura 22, el grupo de T0 y T60 fueron graficados omitiendo esos datos. Se muestra un aumento de daño de 3.65% en la gráfica del grupo evaluado en T0, mientras el T60 muestra un aumento de daño de 2.65%.

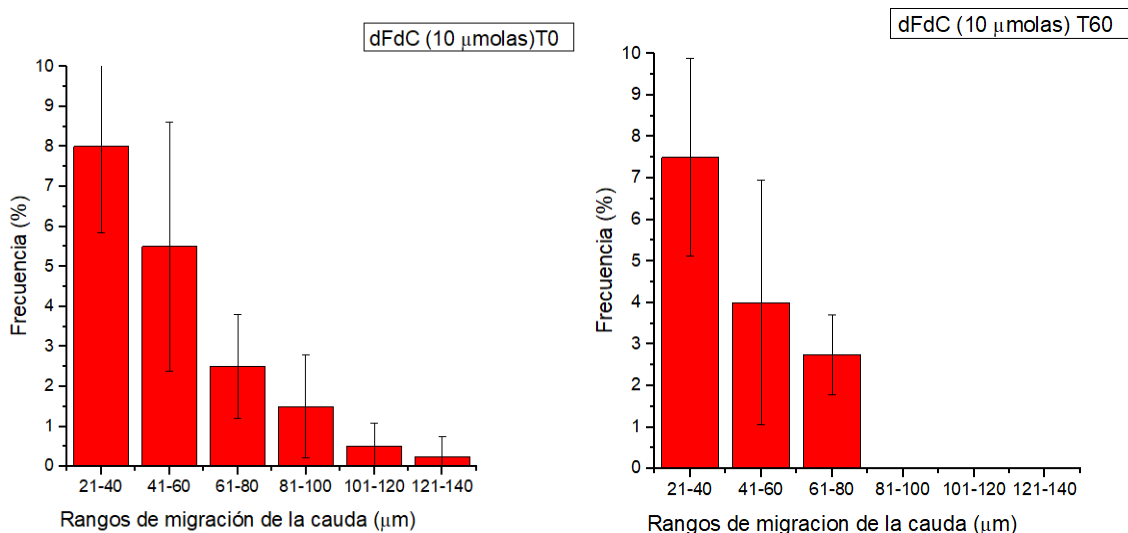


Figura 22. Graficas de frecuencias de daño y error estándar **A)** Grupo tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en *T0 menos los individuos que no presentaba daño **B)** Grupo tratado con 10 μmol de difluorodesoxicitidina en *T60 menos el individuo que no presentó daño. Se eliminó la barra correspondiente a células no dañadas para hacer más notorio el efecto.

Para entender mejor los resultados obtenidos se contrastó en una tabla mostrando el porcentaje de daño obtenido para cada grupo (ver tabla 10). En el cual se ve el efecto de ambos agentes en una dosis que puede considerarse como alta, 30 μmol/Kg en caso de la difluorodesoxicitidina y 0.5 Gy por el porcentaje de daño producido motivo por el cual se eligió la dosis de 10 μmol/Kg para observar mejor el efecto que tiene la difluorodesoxicitidina junto con la radiación teniendo como supuesto que entre menor daño produjeran ambos agentes por separado más notable podría ser el efecto que estos tuviesen en conjunto, sin embargo si bien el efecto se ve aumentado, sigue sin ser significativo para asumir una radiosensibilización.

Tabla 10. Contraste de los resultados de los protocolos 1 y 2 para definir dosis		
Grupo Tratado	Dosis 30 μ molas/Kg y/o 0.5 Gy	Dosis 10 μ molas/Kg y/o 0.25 Gy
Grupo testigo	25%	25%
Grupo tratado con difluorodesoxicitidina	73%	32%
Grupo tratado con radiación	65%	25%
Grupo tratado con difluorodesoxicitidina y radiación	65%	36%

Con el mismo propósito de la tabla 10, se realizó la tabla 11 en la cual se ven los horarios probados en los cuales se administró la difluorodesoxicitidina y en donde se muestra que el horario donde esta obtuvo mayor cantidad de daño en una concentración de 10 μ molas/Kg fue en el grupo al que se le administró la difluorodesoxicitidina y se obtuvo la muestra lo más rápido posible (T0).

Tabla 11. Contraste de tiempos evaluados en el protocolo 3			
Grupo testigo	T0min	T60min	T120 min
4.8%	15%	12%	7%

11. DISCUSIÓN

La actividad de la difluorodesoxicitidina incluye tres posibles vías de acción, los efectos sobre el metabolismo de nucleótidos antes de su incorporación al DNA, el efecto inhibitorio sobre enzimas relacionadas con la reparación y síntesis del DNA durante su incorporación al DNA. Así, la difluorodesoxicitidina después de su incorporación por medio de los transportadores de nucleótidos (Mackey *et al.*, 1998), puede inhibir la ribonucleótido reductasa, causando una disminución de las pozas de desoxinucleótidos y de esa misma manera aumentando la posibilidad de su propia incorporación (heinemann *et al.*, 1990). Recientemente se ha reportado que la difluorodesoxicitidina y la 2',2'-difluoro-2'-deoxiuridina (dFdU), que es un producto de la deaminación de la dFdC, inhiben la timidilato sintetasa (Honeywell *et al.*, 2015), una enzima que cataliza la síntesis de dTMP y cuya inhibición causa deficiencia de timidina-monofosfato y muerte celular. Otra vía de acción de la difluorodesoxicitidina involucra su fosforilación en mono, bi hasta tri-fosfato el cual es incorporado en el DNA (Veltkamp *et al.*, 2008). Se ha reportado que la incorporación de difluorodesoxicitidina inhibe a las DNA polimerasas alfa y épsilon (Huang *et al.*, 1991), y a la topoisomerasa I (Pourquier *et al.*, 2002).

Finalmente, hay evidencia de que la difluorodesoxicitidina está involucrada en la producción de ROS (Maehara *et al.*, 2004), mismas que se han asociado con su potencialidad antineoplásica (Donadelli *et al.*, 2007, Donadelli *et al.* 2011, Arora *et al.*, 2013). Aunque la producción de ROS y apoptosis se asocia con el daño a la membrana mitocondrial, hay evidencias de que no está asociada con apoptosis sino con autofagia (Donadelli *et al.*, 2011). Los datos obtenidos en la presente tesis, con respecto a la inducción de rupturas tempranas o inmediatas en el DNA, parecen estar asociadas a este tipo de mecanismo, ya que la respuesta a 5 minutos de tratamiento en un sistema in vivo, difícilmente pudiera asociarse a la inhibición de las enzimas involucradas en la síntesis de DNA. En ese sentido el sistema de detección en las células de la médula ósea abre la oportunidad de determinar la respuesta tanto en células en etapa G1 como en la etapa de síntesis de DNA. De haber actuado en esta última etapa, el daño en estas células se vería incrementado específicamente. Los datos indican que el daño afectó un porcentaje mucho mayor de células, produciendo lesiones de diferentes tamaños, de lo que se puede inferir que el daño no es específico de alguna etapa del ciclo celular. Se requiere hacer más estudios en el sistema de médula ósea para confirmar éstos resultados.

Una de las primeras correlaciones que se observaron fue entre la radiosensibilización y la alteración en el pool de nucleótidos, particularmente la reducción de la poza de dATP, pero de igual forma las de los demás nucleótidos

(Shewach *et al.*, 1994; Shewach & Lawrence, 1995), esto a través de la inhibición de la ribonucleótido reductasa (Shewach & Lawrence, 1996). Obteniéndose una reducción de hasta el 85% de la poza de dATP (Robinson & Shewach, 2001). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la radiosensibilización y el efecto de la difluorodesoxicidina sean efectos concomitantes, pero no vinculados directamente.

Con respecto a la posible dependencia de la radiosensibilización por difluorodesoxicidina de alguna etapa de ciclo celular, inicialmente se concluyó por los resultados obtenidos en células en crecimiento exponencial, que la difluorodesoxicidina prácticamente mataba las células en cualquier etapa del ciclo celular y que la radiosensibilización causada antes, durante y después de irradiación era extremadamente efectiva (Rockwell & Grindey, 1992). En células normales de yeyuno subrogadas en ratones se determinó la cinética de síntesis de DNA y la redistribución en el ciclo celular de las criptas. Observaron que la radiosensibilización ocurre en un intervalo de 3h y está asociada con la inhibición de la síntesis de DNA (Grégoire *et al.*, 1997). En un estudio llevado a cabo en células de hámster Chino y de carcinoma de colon observaron que la difluorodesoxicidina no radiosensibiliza a las células en G1 o en la transición G1/S, pero observan una radiosensibilización substancial en la fase S (Latz *et al.*, 1998) lo cual podría explicar el efecto obtenido en el protocolo 3.

Una variable que se exploró es la diferencia de radiosensibilización entre células normales, de cánceres diferenciados que aún preservan células con características del tejido normal y no diferenciados que ya no presentan características del tejido que les dio origen, estos cánceres tiene un pronóstico más grave. Midiendo el retraso del crecimiento de los tumores implantados en ratas, observaron que hay radiosensibilización en los tumores indiferenciados de pulmón y próstata y no en los tumores diferenciados de pulmón y en células normales de piel (Kal *et al.*, 2006).

Con respecto a la posibilidad de que la apoptosis juegue un papel crucial en el mecanismo de radiosensibilización, ésta fue descartada en células de cáncer de colon, de cabeza y cuello y de pulmón que difieren sustancialmente en su sensibilidad a la inducción de apoptosis por radiación. Aunque observaron que hay una dependencia de la apoptosis, ésta depende del tipo celular más que de una propiedad general de la difluorodesoxicidina (Lawrence *et al.*, 2001).

Otro de los genes que han sido explorados en su posible correlación con la radiosensibilización con difluorodesoxicidina es el p53. Uno de los primeros estudios fue desencadenado por la observación de que una línea celular que no era capaz de progresar a la etapa S y no mostraba radiosensibilización por dFdC, se atribuyó a que expresaba p53 tipo silvestre (Salem *et al.*, 2012). La comparación de líneas celulares tipo silvestre y mutante para p53, mostraron radiosensibilización y reducción del pool de nucleótidos. Pero las células mutantes siguen progresando por el ciclo celular por 72 h en cambio las tipo silvestre sufren

bloqueo en G1 a las 24 hs. Dado que ambas mostraba radiosensibilización, se concluyó que p53 no estaba relacionado con este fenómeno (Pauwels *et al.*, 2005). Un estudio posterior confirmó esta conclusión (Robinson & Shewach, 2001).

Los mecanismos de reparación de diferentes tipos de daño también han sido explorados como responsables de la radiosensibilización por difluorodesoxicidina, usando líneas celulares deficientes o no en estos mecanismos. En el caso del mecanismo de unión de extremos no-homólogos se demostró que este mecanismo no está involucrado (Van Putten *et al.*, 2001). En el caso de reparación de rupturas dobles concluyeron que ni la inducción ni la reparación de éste tipo de lesiones esta involucrados en la radiosensibilización por difluorodesoxicidina (Grégoire *et al.*, 1998).

Recientemente se ha relacionado la reparación por recombinación homóloga (RRH) con la radio-sensibilización causada por la difluorodesoxicidina, basándose en que células deficientes en RRH no se puede inducir radio-sensibilización a pesar de una reducción de dATP y la acumulación de células en la fase S. Además la supresión parcial del gen XRCC3 disminuye significativamente la radio-sensibilización (Im *et al.*, 2015), mismo que ocurre mediante la supresión molecular del gen RAD51 (Kobashigawa *et al.*, 2015). Ambos genes relacionados con la reparación por recombinación homóloga. Basándose en estos antecedentes se propuso que el evento causal de la radiosensibilización es daño tardío en el ADN y que la reparación por recombinación homóloga es requerida, lo cual se demostró observándose un incremento sinérgico de daño entre 24 y 48 horas después de los tratamientos con difluorodesoxicidina y radiación y se observó que este efecto sinérgico es eliminado por la supresión del gene XRCC3 (IM *et al.* 2016).

Aspectos médicos de la difluorodesoxicidina

Los estudios preclínicos (Lawrence *et al.*, 1999) y clínicos (Gregor 1997) son muy consistentes con el hecho de que la difluorodesoxicidina es un eficiente radiosensibilizador, tanto por el tratamiento con fuentes externas (Eisbruch *et al.*, 2001) como por radiofármacos (Cardillo *et al.*, 2002). Clínicamente se ha probado exitosamente en carcinoma hepatocelular (Cuneo *et al.*, 2014), glioblastoma multiforme (Sigmond *et al.*, 2009), sin embargo aún no se tienen establecidos los horarios y las dosis en las que deben ser administradas para mostrar una radiosensibilización efectiva.

También se ha probado en modelo experimentales en cáncer de páncreas (Morgan *et al.*, 2008), sarcoma de tejido suave (Murphy *et al.*, 2008) cáncer de cabeza y cuello (Eisbruch *et al.*, 2001), y en cáncer avanzado de células no pequeñas de pulmón (Gregor 1997), para tener una aproximación de los tratamientos que deben emplearse es necesario la experimentación con varios

modelos por cual nosotros contribuimos en la presente tesis a mostrar un estudio con células de la médula ósea de ratones *in vivo* .

12. Conclusiones y perspectivas

Se ha probado que la difluorodesoxicidina es un eficiente radiosensibilizador en células de diferentes tipos celulares e incluso en distintos tipos de cáncer, sin embargo en la presente tesis dicho efecto no fue observado por el tratamiento agudo (dosis alta), que podría afectar el metabolismo de los nucleótidos. Es posible que su principal efecto sea a través de la incorporación al DNA, mediante un tratamiento crónico a este efecto.

La difluorodesoxicidina tiene varios efectos sobre la célula, la inhibición del metabolismo de los nucleótidos y de la síntesis de DNA. Sin embargo en la presente tesis con el tratamiento agudo, fue más notable su acción rápida causando daño sobre el DNA, sugiriendo que fue por medio de radicales libres. Vía sobre la que hay otras evidencias, pero de la que no se sabe cuál es el mecanismo. Se sabe que ROS están presentes en la célula de manera constante en balance con antioxidantes. Las ROS son capaces de oxidar macromoléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos a las cuales cede un electrón produciendo otras especies reactivas, a través de mecanismos y de intermediarios aún desconocidos (Ríos, 2003).

Se requieren hacer más estudios para administrar de manera crónica la dosis de la difluorodesoxicidina para que se incorpore al DNA, y de esta forma causar un efecto radiosensibilizador mediante la inhibición de la síntesis de DNA lo que permitirá tener una aproximación a la dosis que debe ser administrada para tener un efecto radiosensibilizador eficiente así como disminuir daños producidos por la difluorodesoxicidina.

Anexo: Preparación de soluciones

Agarosa de bajo punto de fusión (APFB) 0.5% Esta solución se preparó en fresco en cada experimento. Se disolvieron 0.125 g de APFB en 25 mL de buffer salino de fosfatos libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} . (PBS) filtrado y la solución se mantuvo a 38 °C hasta el momento de su uso.

Agarosa de punto de fusión normal (APFN) 0.75%. Se disolvieron 0.1875 g de APFN en 25 mL PBS filtrado

Buffer alcalino de electroforesis (pH 13-14). para 1400 mL - Solución de NaOH 10 N: Se preparó con 20 g de NaOH disueltos completamente en agua y aforados a 50 mL. - Solución de EDTA 200 mM: se disolvieron 14.89 g de EDTA en agua y se aforaron a 200 mL. Esta solución se puede almacenar a temperatura ambiente.

Procedimiento: A 1351 mL de agua se agregaron 42 mL de la solución 10 N de NaOH y 7 mL de la solución 200 mM de EDTA. Se mezcló perfectamente y se midió el pH. Esta solución se preparó en fresco en cada experimento

Buffer Tris-HCl (pH 7.5) para 500mL: 24.25 g de tris fueron disueltos en 480 mL de agua y se ajustó el pH a 7.5 con HCl absoluto. Se aforó a 500 mL con agua, se filtró. Se almacenó a temperatura ambiente.

Buffer salino de fosfatos (PBS) para 500 mL de solución: NaCl: 4 g KCl: 0.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.7g KH_2PO_4 : 0.1 g

Procedimiento: Se disolvieron todos los reactivos en aproximadamente 250 mL de agua, mediante agitación mecánica hasta disolución completa. Después se aforó a 500 mL y se guardó en refrigeración. La solución se filtró antes de ser usada.

Stock de bromuro de etidio Para obtener una solución de 200 µg/mL, se pesó 0.001 g de bromuro de etidio y se disolvió en 5 mL de agua filtrada, se agitó hasta incorporación completa y se guardó a temperatura ambiente en un frasco protegido de la luz.

Bromuro de etidio para tinción Para la tinción se preparó una solución 1:10 (20 µg/mL), que consistió en lo siguiente: se tomaron 0.5 mL del stock de bromuro de etidio y se agregaron 4.5 mL de agua filtrada, se mezcló perfectamente y se refrigeró en un recipiente protegido de la luz.

Solución concentrada de lisis para 500 mL de solución: NaCl: 73.05 g EDTA: 18.6 g Tris: 0.6 g N-lauril sarcosinato de sodio: 5 g

Procedimiento: Se disolvió el NaCl en 300 mL de agua, después se adicionó el EDTA y el tris, se agitó hasta la completa disolución. Se ajustó el pH a 10 con NaOH y se agregó el N-lauril sarcosinato de sodio. Una vez homogénea, la solución se llevó al aforo de 500 mL con agua. Finalmente la solución se filtró y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Solución final de lisis para 200 mL: Esta solución se preparó en fresco en cada experimento. Se midieron 178 mL de la solución concentrada de lisis y se incorporaron 2 mL de Tritón X-100, después se agregaron 20 mL de DMSO y se homogeneizó la solución. Esta preparación se guardó en el refrigerador a 4 °C hasta su uso. Nota: siempre adicionar los reactivos en el orden mencionado.

Solución de Hanks (pH 7.4) para un litro de solución: NaCl: 8 g KCl: 0.4 g Na₂HPO₄·2H₂O: 0.06 g KH₂PO₄: 0.06 g NaHCO₃: 0.35 g EDTA: 7.44 g Glucosa: 1.0 g Rojo de fenol: 0.02 g

Procedimiento: Los reactivos se disolvieron en 800 mL de agua mediante agitación mecánica. Después se ajustó el pH con NaOH y por último se aforó a un litro con agua. Se almacenó en un recipiente protegido de la luz y en refrigeración. La solución se filtró antes de ser usada.

Solución 1: 8 de dimetilsulfóxido (DMSO): agua (H₂O)

Esta solución se preparó en fresco en cada experimento. Se mezclaron 100 µl de DMSO y 700 µl de agua filtrada para obtener una solución 1:8.

Nota: el agua utilizada para la preparación de todas las soluciones fue bidestilada y desionizada.

13. Bibliografía:

Agudelo A., Ortega O., Quintero P., Ondo A., Plazas M.C. & Garzón R. Evaluación del efecto de la hipoxia en la supervivencia de células tumorales y endoteliales sometidas a radiaciones ionizantes. Sociedade Brasileira DE Proteção Radiológica - SBPR, 17 (2013) 11.

Alegre B. N. Reacción celular ante la radiación. Radiobiología. 1 (2001) 9-11.

Amounzegar H.F., Hamed A. E., Kalaghchi B. & Esmati E. Concurrent Chemoradiation with weekly gemcitabine and cisplatin for locally advanced cervical cancer. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 14 (9) (2013) 5385-5389.

Araújo M. S.M. & Reyes T. P.J. Radiaciones ionizantes y efectos sobre la materia. Ciencia e Ingeniería Neogranadina, 12 (2002) 31-39.

Aristizábal M.F.A. evaluación del daño en el ADN en dos poblaciones colombianas de agricultores y floricultores. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 12 (1) (2009) 7-16.

Arora, S., Bhardwaj A, Singh S, Sanjeev K, Srivastava SK, McClellan S, Nirodi CS, Piazza GA, Grizzle WE, Owen LB, Singh AP. An undesired effect of chemotherapy. Gemcitabine promotes pancreatic cancer cell invasiveness through reactive oxygen species-dependent, nuclear factor KB and hypoxia-inducible factor 1ff-mediated up-regulation of CXCR4. Journal of Biological Chemistry 288 (2013) 21197–21207.

Atasoy M. B., Dane F., Kefel ü,Ae.,Ça Lar H., Asim C NG, Turhal S N, Abacio U & Ye En C. Concomitant chemoradiotherapy with low-dose weekly gemcitabine for nonmetastatic unresectable pancreatic cancer. Turk Journal Gastroenterol, 22 (1) (2001) 60-64.

Azzam E., Jay-Gerin J., & Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Letters. 327 (2014) 48–60.

Barendsen G. & Rijswijk. Effectiveness of combined radio and chemotherapy in the treatment of experimental tumors and evaluation of some factors influencing response. Radiobiological research and radiotherapy. Proceeding of a symposium Vienna 22-26 nov- 1976. International Atomic Energy Agency (1977) Vol 1 de 2

Barton-Burke M: Gemcitabine: a pharmacologic and clinical overview (review). Cancer Nurs 22 (1999)176–183.

Bastías-Villa M.E. La radioterapia en relación con la hipoxia tumoral y la anemia. Radiobiología, 1 (1) (2001) 7-8.

Boudewijn J. M. Braakhuis, Guus A. M. S. van Dongen, Jan B. Vermerken & Gordon B. Snow. Preclinical in Vivo Activity of 2',2'-Difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) against Human Head and Neck Cancer. Cancer Research, 51 (1991) 211-214

Braakhuis B.J., van Dongen G.A., Vermorcken J.B., Snow G.B. Preclinical in vivo activity of 2,2-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) against human head and neck cancer. Cancer Res 51 (1991) 211–214.

Brown K., Weymouth-Wilson A. & Linclau B. A Linear Synthesis of Gemcitabine. Carbohydrate Research, 406 (2015) 71-74

Buchsbaum D.J., Bonner J.A., Grizzle W.E., Stackhouse M.A., Carpenter M., Hicklin D.J., Bohlen P. & Raisch K.P. Treatment of pancreatic cancer xenografts with Erbitux (IMC-C225) anti-EGFR antibody, gemcitabine, and radiation. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 54 (2002) 1180–1193

Bustamante-Valles F. d T., Calva-Espinosa A. L., Gallegos-Hernandez J. F., Villalobos-Valencia R., Castruita A. L. Silva J. A. & Flores- Díaz R. Tratamiento concomitante con gemcitabina y radioterapia en pacientes con carcinoma epidermoide locorregionalmente avanzado de cabeza y cuello. Estudio fase II. Gaceta Médica de México, 142 (2) (2006) 91-94.

Cardillo T.M., Blumenthal R., Ying Z. & Gold D.V. Combined gemcitabine and radioimmunotherapy for the treatment of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*. 97(3) (2002) 386-392.

Cecchini S., Girouard S., Huels M.A., Sanche L. & Hunting D.J. Single-strand-specific radiosensitization of DNA by bromodeoxyuridine. *Radiation Research*. 162 (2004) 604-615.

Cecchini S., Girouard S., Huels M.A., Sanche L. & Hunting D.J. Interstrand cross-links: a new type of gamma-ray damage in bromodeoxyuridine-substituted DNA. *Biochemistry*. 44 (2005) 1932-1940.

Chauhan A., Singh H., Sharma T., & Manocha K. K. Gemcitabine concurrent with radiation therapy for locally advanced head and neck carcinomas *African Health Sciences*. 8 (3) (2008) 149-155.

Cividalli A., Livdi E., Ceciarelli F., Fontana G., Altavista P., Cruciani G. & Danesi D.T. Combined use of gemcitabine and radiation in mice. *Anticancer Research*. 21 (2001) 307–312.

Conde M. Protección y seguridad en los departamentos de radiodiagnóstico médico, normas que debe cumplir. (Tesis de pregrado) (1999) Universidad Veracruzana. Veracruz. México.

Cuneo K.C., Davis M.A., Feng M.U., Novelli P.M., Ensminger W.D. & Lawrence T.S. Low dose rate radiosensitization of hepatocellular carcinoma in vitro and in patients. *Translational Oncology*. 7(4) (2014) 472-478.

Dextraze M.E., Wagner J.R. & Hunting D.J. 5-Bromodeoxyuridine radiosensitization: conformation-dependent DNA damage. *Biochemistry*. 46 (2007) 9089-9097.

Di Giorgio M., Taja M., Nasazzi N., Bustos N., Cavalieri H. & Bolgiani A. El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones. *Memorias del "5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety"*. Recife, Brasil, 29 abril al 4 mayo del 2001

Donadelli, M., Costanzo, C., Stefania Beghelli, S., Scupoli, M.T., Dandrea, M., Bonora, A., Piacentini, P., Budillon, A., Caraglia, M., Aldo Scarpa, A. & Palmieri, M. Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 (2007) 1095 – 1106.

Donadelli M., Dando I., Zaniboni T., Costanzo C., Dalla Pozza E., Scupoli M.T., Scarpa A., Zappavigna S., Marra M., Abbruzzese A., Bifulco M., Caraglia M. & Palmieri M. Gemcitabine/cannabinoid combination triggers autophagy in pancreatic cancer cells through a ROS-mediated mechanism. *Cell Death Disease* 2(4) (2011) 2-12

Doyle T.H., Mornex F. & McKenna W.G. The Clinical Implications of Gemcitabine Radiosensitization. *Clinical Cancer Research*. 7 (2001) 226-228.

Eisbruch A., Shewach D.S., Bradford C.R., Littles J.F., Teknos T.N., Chepeha D.B., Marentette L.J., Terrell J.E., Hogikyan N.D., Dawson L.A., Urba S., Wolf G.T. & Lawrence T.S. Radiation concurrent with gemcitabine for locally advanced head and neck cancer: a phase I trial and intracellular drug incorporation study. *Journal Clinical Oncology*. 19(3) (2001) 792-799

Fechner G., Perabo F.G.E., Schmidt DH, Haase L., Ludwing E., Schueller H., Blatter J., Miller S.C., & Albers P. Preclinical evaluation of a radiosensitizing effect of gemcitabine in p53 mutant and p53 wild type bladder cancer cells. *Urology*. 61 (2003) 468–473

Gallego D. E.. Las radiaciones ionizantes: una realidad cotidiana . *Revista salud ambiental*, 10 (1-2) (2010) 6-23.

Galmarini C.M., Mackey J.R. & Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies . *Leukemia*, 15 (2001) 875-890.

Galmarini M.C., Mackey R. J. & Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *The Lancet Oncology*, 3 (2002) 415-424.

Goodhead, D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *International Journey of Radiation Biology* 65:(1994) 7-17.

González S. G. & Rabin L. C. Para entender las radiaciones. Uruguay: DIRAC. (2011). pp 32

Guchelaar H.J., Richel D.J. & Van Knapen A. Clinical, toxicological and pharmacological aspects of gemcitabine. *Cancer Treatment Reviews* 22 (1996) 15-31

Gregor A. Gemcitabine plus radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Seminars in Oncology*. 3 (8) (1997) 39-41.

Grégoire V., Beauduin M., Rosier J.F., De Coster B., Bruniaux M., Octave-Prignot M. & Scalliet P. Kinetics of mouse jejunum radiosensitization by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and its relationship with pharmacodynamics of DNA synthesis inhibition and cell cycle redistribution in crypt cells. *Br J Cancer*. ;76(10) (1997) 1315-1321.

Grégoire V., Beauduin M., Bruniaux M., De Coster B., Octave Prignot M. & Scalliet P. Radiosensitization of mouse sarcoma cells by fludarabine (F-ara-A) or gemcitabine (dFdC), two nucleoside analogues, is not mediated by an increased induction or a repair inhibition of DNA double-strand breaks as measured by pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Radiation Biology*. 73(5) (1998) 511-520

Gregoire V., Cvilic S., Beauduin M. De Coster B., Gueulette J., Octave-Prignot M. & Scalliet P. Effect of gemcitabine on the tolerance of the lung to single-dose irradiation in C3H mice. *Radiation Research*. 151 (1999) 747–749

Grosch D. & Hopwood Biological effects of radiations. Segunda Edición. Academic Press. United States of America. (1979) pp59-61

Grunewald R, Kantarjian H, Du M, Faucher K, Tarassoff P, Plunkett W Gemcitabine in leukemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study. *Journal of Clinical Oncology* 10 (1992) 406–413.

Güerci A. A. M, Zúñiga V. L. A. & Marcos D. R. El valor predictivo del ensayo cometa en la evaluación de la radiosensibilidad individual en sangre periférica. *Theoria*. 15 (2) (2006) 41-52

Hall, E.J.; Giaccia, A.J. Radiobiology for the Radiologist, 7th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA. (2012) p. 576.

Heinemann V, Xu Y.Z, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Inhibition of ribonucleotide reduction in CCRF-CEM cells by 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Molecular Pharmacology* 38 (1990) 567-572.

Henk B. K., Sherif Y. El S. & Angeliqué D. B.-V. R. Gemcitabine as a Radiosensitizer in Undifferentiated Tumors. *Anticancer Research*, 26 (2006) 136-146.

Hertel W. L., Boder B. G., Stan K.J., Rinzel M. S. & Poore AfG. Evaluation of the Antitumor Activity of Gemcitabine (2',2'-Difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Research*; 54 (1990) 4417-4422.

Herskind, C.; Westergaard, O. Inactivation of a single eucaryotic gene irradiated in vitro in transcriptionally active chromatin form. *Radiation. Research.* 106 (1986) 331–344.

Herskind, C.; Westergaard, O. Variable protection by OH scavengers against radiation-induced inactivation of isolated transcriptionally active chromatin: The influence of secondary radicals. *Radiation Research.* 114 (1988) 28–41.

Honeywell R.J., Ruiz van Haperen V.W., Veerman G., Smid K. & Peters G.J. Inhibition of thymidylate synthase by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (Gemcitabine) and its metabolite 2',2'-difluoro-2'-deoxyuridine. *International Journal Biochemical Cell Biology* 60 (2015) 73-81.

Huang, P., Chubb, S., Hertel, L.W., Grindey, G.B., and Plunkett, W. Action of 2',2'-Difluorodeoxycytidine on DNA Synthesis. *Cancer Research.* 51, (1991). 6110-6117

Huber R., Braselmann H., Geinitz H., Jaehnert I., Baumgartner A., Thamm R., Figel M., Molls M. & Zitzelsberger H. Chromosomal radiosensitivity and acute radiation side effects after radiotherapy in tumour patients a follow-up study . *Radiation Oncology*, 6 (2011) 32-40.

Im M.M., Flanagan S.A., Ackroyd J.J. & Shewach D.S. Drug metabolism and homologous recombination repair in radiosensitization with gemcitabine. *Radiation Research*. 183(1) (2015)114-123.

Im M.M., Flanagan S.A., Ackroyd J.J., Knapp B., Kramer A. & Shewach D.S. Late DNA Damage Mediated by Homologous Recombination Repair Results in Radiosensitization with Gemcitabine. *Radiation Research*. 186(5) (2016) 466-477.

Joschko M.A., Webster L.K., Groves J., Yuen K., Palatsides M., Ball D.L. & Millward M.J. Enhancement of radiation-induced regrowth delay by gemcitabine in a human tumor xenograft model. *Radiation Oncology Investigations* 5 (1997) 62–71

Kal H.B., El Sharouni S.Y.& Barten-van Rijbroek A.D. Gemcitabine as a radiosensitizer in undifferentiated tumors. *Anticancer Research*. 26 (2006) 139-415.

Kinsella J. T., Russo A., Mitchel B. J., Rowland J., Jenkins J., Schwade J., Myers E. C., Collins M. J., Speyer J., Kornbith, Smith B., Kufra C. & Glastein E. A phase I study of intermittent intravenous bromodesoxyuridine (BrdU) with conventional fractionated irradiation. *Radiation Oncology Biology Physics*, 10 (1983) 69-76.

Klaude M., Eriksson S., Nygren & Ahnström G. The comet assay: mechanism and technical consideration. *Mutation Research*, 363 (1996) 89-96.

Kobashigawa S., Morikawa K., Mori H. & Kashino G. Gemcitabine Induces Radiosensitization Through Inhibition of RAD51-dependent Repair for DNA Double-strand Breaks. *Anticancer Research*. 35(5) (2015) 2731-2737

Latz D., Fleckenstein K., Eble M., Blatter J., Wannemacher M.& Weber K.J. Radiosensitizing potential of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine) within the cell cycle in vitro. *International Journey of Radiation Oncology Biology Physics*. 41(4) (1998) 875-882.

Lawrence T.S., Eisbruch A., McGinn C.J., Fields M.T. & Shewach D.S. Radiosensitization by gemcitabine. *Oncology (Williston Park)* 10(5) (1999) 55-60.

Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, Hertel LW, Shewach DS. Radiosensitization of pancreatic cancer cells by 2,2-difluoro-2-deoxycytidine. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 34 (1996) 867–872

Lawrence T.S., Davis M.A., Hough A. & Rehemtulla A. The role of apoptosis in 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine)-mediated radiosensitization. *Clinical Cancer Research*. 7(2) (2001) 314-9).

Lee W M, Parker B W & Xu B. New insights into the synergism of nucleoside analogs with radiotherapy. *Radiation oncology*, 8 (2013) 223- 233.

Mackey J.R., Mani R.S., Seiner M., Mowles D., Young J.D., Belt J.A., Crawford C.R. & Cass C.E. Functional nucleoside transporters are required for gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Research* 58 (1998) 4349-4357.

Maehara S., Tanaka S., Shimada M., Shirabe K., Saito Y., Takahashi K. & Maehara Y. Selenoprotein P, as a predictor for evaluating gemcitabine resistance in human pancreatic cancer cells. *International Journal of Cancer* 112 (2004) 184-189.

Mason K.A., Milas L., Hunter N.R., Elshaikh M., Buchmiller L., Kishi K., Hittelman K. & Ang K.K. Maximizing therapeutic gain with gemcitabine and fractionated radiation. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 44 (1999) 1125–1135.

Medina A.S.M. & Reyes T.P.J. Radiaciones ionizantes y efectos sobre la materia. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 12 (2002) 31-39.

Mercado H. La física de las radiaciones y la dosimetría. *Cinvestav*, 0, (2007) 38-43.

Montoya V.H.H. *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia (2008) pp282.

Morales-Ramirez P., Vallarino-Kely T. & Cruz-Vallejo V. Genotoxicity kinetics in murine normoblast as an approach for the in vivo action of difluorodeoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* 79 (5) (2017) 843-853

Morgan M.A., Parsels L.A., Kollar L.E., Normolle D.P., Maybaum J. & Lawrence T.S. The combination of epidermal growth factor receptor inhibitors with gemcitabine and radiation in pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 14(16) (2008) 5142-5149.

Murphy J.D., Lucas D.R., Somnay Y.R., Hamstra D.A. & Ray M.E. Gemcitabine-mediated radiosensitization of human soft tissue sarcoma. *Translational Oncology*. 1(1) (2008) 50-56.

Nikjoo, H., C.E. Bolton, R. Watanabe, M. Terrissol, P. O'Neill, and D.T. Goodhead. Modelling of DNA damage induced by energetic electrons (100 eV to 100 keV). *Radiation Protection Dosimetry* 99 (2002)77-80.

Noble S., K.L. Goa. Gemcitabine. A review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lungcancer and pancreatic cancer. *Drugs* 54 (1997) 447–472.

Orth M., Lauber K., Niyazi M., Friedl A., Li M., Maiöfer C., Schürttrumpf L., Ernst A., Niemöller O. & Belka C. Current concepts in clinical radiation oncology. *Radiation and Environmental Biophysics*, 53 (2014) 1-29.

Ortega A. X. & Jorba B. J. Radiaciones ionizantes: utilización y riesgos II. 2da Ed. Barcelona: Servei de Publicacions de la UPC. (1996) pp 576.

Pattaranutaporn P., Thirapakawong C., Chansilpa Y., Therasakvichya S., leumwananontachai N. & Thephamongkhol K. Phase II study of concurrent gemcitabine and radiotherapy in locally advanced stage IIIB cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology* 81 (2001) 404-407.

Pauwels B., Korst E.C.A., Lardon F. & Vermorken J.B. Combined Modality Therapy of Gemcitabine and Radiation. *The Oncologist*, 10 (2005) 34-51.

Pauwels B., Korst A.E., Andriessen V., Baay M.F., Pattyn G.G., Lambrechts H.A., Pooter C.M., Lardon F. & Vermorken J.B. Unraveling the mechanism of radiosensitization by gemcitabine: the role of TP53. *Radiation Research*. 164(5) (2005) 642-650.

Pourquier P, Gioffre C, Kohlhagen G, Urasaki Y, Goldwasser F, Hertel LW, Yu S, Pon RT, Gmeiner WH, Pommier Y. Gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine), an antimetabolite that poisons topoisomerase I. *Clinical Cancer Research* 8 (2002) 2499–2504.

Puppin C., D'Aurizio F., D'Elia V.A., Cesaratto L., Tell G., Russo D., Filetti S., Ferretti E., Tosi E., Mattei T., Pianta A., Pellizzari L., & Damante G. Effects of Histone Acetylation on Sodium Iodide Symporter Promoter and Expression of Thyroid-Specific Transcription Factors. *Endocrinology*, 146 (9), (2005) 3967-3975.

Rios de M. Ma. del C. El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva*. 2(1) (2003) 17-28

Robinson BW & Shewach DS. Radiosensitization by gemcitabine in p53 wild-type and mutant MCF-7 breast carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research*. 7(8) (2001) 2581- 2589

Rockwell S. & Grindey G.B. Effect of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the viability and radiosensitivity of EMT6 cells in vitro. *Oncology Research*. 4(4-5) (1992) 151-155.

Rodríguez-Reyes R. & Morales-Ramírez P. Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU. *Mutagenesis*, 18 (1) (2003) 65-72.

Roldán T., Aramburu V., Leguizamón G. & Hoffman C. Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes. *Ciencia*, 1 (2003) 321-331.

Ross M. H. & Pawlina W. *Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana 5ta edición-2da reimpresión. (2008) pp992.

Roots, R., & Okada S. Protection of DNA molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and SH compounds. *International Journal of Radiation Biology Research* 21 (1972) 329-342.

Salem S.D., Abou-Tarboush F.M., Saeed N.M., Al-Qadasi W.D., Farah M.A., Al-Buhairi M., Al-Harbi N., Alhazza I. & Alsbeih G. Involvement of p53 in gemcitabine mediated cytotoxicity and radiosensitivity in breast cancer cell lines. *Genes*.498(2) (2012) 300-307.

Sangar VK., Cowan R, Margison GP, Hendry JH & Clarke N.W. An evaluation of gemcitabines differential radiosensitising effect in related bladder cancer cell lines. *British Journal of Cancer* 90 (2004) 542 – 548.

Selman J. Elements of radiobiology. Chicago Illinois: Universidad de California. (1983) pp 311

Shewach D.S., Hahn M.T., Chang E., Hertel W.L. & Lawrence T. Metabolism of 2',2'-Difluoro-2'.-Deoxycytidine and Radiation Sensitization of Human Colon Carcinoma Cells'. *CANCER RESEARCH*, 54,(1994). 3218-3223

Shewach D.S. & Lawrence T. S. Radiosensitization of human tumor cells by gemcitabine in vitro. *Seminars in Oncology*. 22 (1995) 68-71.

Shewach D.S. & Lawrence T. S. Gemcitabine and radiosensitization in human tumor cells.*Investigational New Drugs* 14(3) (1996) 257-263.

Sigmond J., Honeywell R.J., Postma T.J., Dirven C.M., de Lange S.M., van der Born K., Laan A.C., Baayen J.C., Van Groeningen C.J., Bergman A.M., Giaccone G., Peters G.J. Gemcitabine uptake in glioblastoma multiforme: potential as a radiosensitizer. *Annals of Oncology*. 20(1) (2009) 182-187.

Supiot S., Thillays F., Rio E., Gouard S., Morgentern A., Bruchertseifer F., Mahé M. Chatal J., Davodeau F & Chérel M. Gemcitabine radiosensitizes multiple myeloma cells to low let but no high let irradiation. *Radiotherapy and Oncology*, 83 (2007) 97- 101

Thomasz E., Bomben A.M., Gómez Parada I.M., Larcher A.M., Pérez M. Del R., Arias C., Hernández D.G., Kay, J.M., Sajaroff P.M., Spano F., Morelo E.E., Feld D. & Saraví M. Radioprotección en las aplicaciones médicas de las radiaciones

ionizantes . Argentina: Autoridad Regulatoria Nuclear – Cámara de Instituciones de Diagnóstico Médico. (2001).

Tseng W W, Zhou S, To A. C, Thall F. P., Lazar J. A., Pollock E. R., Lin P. P., Cormier N. J, Lewis O. V., Feig W. B, Hunt K.K., Ballo T. M. Patel S., & Pisters W. T. P. Phase I adaptive dose-finding study of neoadjuvant gemcitabine combined with radiation therapy for patients with high-risk extremity and trunk soft tissue sarcoma. *Cancer*, 121 (20) (2015) 3659-3667.

Van Bree C., Rodermond HM, Leen R., Medema JP & van Kuilenburg A.B.P.. Cyclopentenyl cytosine increases gemcitabine radiosensitisation in human pancreatic cancer cells. *British Journal of Cancer*, 98 (7), (2008) 1226-1233.

Van Putten J.W.G., Groen H.J.M., Smid K., Peters G.J.& Kampinga H.H. End-joining deficiency and radiosensitization induced by gemcitabine. *Cancer Research*. 61(4) (2001) 1585-1591.

Veltkamp S.A., Pluim D., van Eijndhoven M.A.J., Bolijn M.J., Ong F.H.G., Govindarajan R., Unadkat J.D., Beijnen J.H. & Schellens J.H.M. New insights into the pharmacology and cytotoxicity of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine. *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (2008) 2415-2425.

Verma K.A., Arya K.A., Kumar M., Kumar A., Gupta S., Sharma D & Rath GK. Weekly cisplatin or gemcitabine concomitant with radiation in the management of locally advanced carcinoma cervix: results from an observational study. *Gynecology Oncology* , 20 (4), (2009) 221-226.

Ward, J.F., W.F. Blakely, and E.I. Joner. Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide. *Radiation Research* 103 (1985) 383-392.

Willers H., Azzoli G. C., Sant L. W. & Xia F. Basic Mechanisms of Therapeutic Resistance to Radiation and Chemotherapy in Lung Cancer. *National Institutes of Health*, 19 (3) (2014) 16.

