

# Tratamiento del cáncer de páncreas con ultrasonidos de baja intensidad: una revisión bibliográfica.

Jesús Frutos Díaz-Alejo<sup>1, 2, a</sup>, Julie Earl<sup>2</sup>

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Grupo de Epidemiología Molecular y marcadores predictores de tumores, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Carretera de Colmenar Km 9,100. 28034 Madrid, España.

a. jefrudi@hotmail.es

**Palabras clave:** cáncer pancreático; tratamiento; ultrasonidos; LIUS; estroma; nuevo concepto

## Resumen

El cáncer pancreático es una de las principales causas de muerte en Oncología, asociándose normalmente a un mal pronóstico y a una pobre respuesta al tratamiento. Actualmente, su diagnóstico y prevención resulta complicado, debido a la inexistencia de métodos y marcadores biológicos precisos y sensibles para esta enfermedad, y a que el paciente no refiere síntomas claros y específicos. En la mayoría de las ocasiones solo se diagnostica en estadios avanzados del tumor. A lo anterior, se suma un escaso arsenal terapéutico, que suele ir encaminado a paliar los síntomas de la enfermedad. La mayoría de las mutaciones que promueven la carcinogénesis pancreática no son tratables; y, además, el complejo carácter metabólico de las células en este tipo de tumor y el denso estroma que se forma alrededor del mismo impiden la entrada del fármaco y, por consiguiente, su efecto. Así, en nuestra línea de investigación (de tipo "proof of concept") se presenta una alternativa terapéutica naciente para este tipo de patología mediante el uso de los llamados ultrasonidos de baja intensidad (LIUS, Low Intensity Ultrasounds), de manera totalmente novedosa, estudiando el efecto de dichos ultrasonidos a nivel celular y molecular e intentando extrapolar los resultados a la clínica en beneficio de los pacientes. Este trabajo consiste en una extensa revisión de la literatura sobre los aspectos clave de nuestra investigación: el cáncer de páncreas y sus aspectos clínicos y moleculares, por un lado, y los ultrasonidos, por otro. Como conclusión, se incluye una discusión que relaciona todo el contenido de la revisión teórica con nuestro trabajo y nuestras observaciones experimentales preliminares, así como el futuro de nuestro proyecto y los pasos a seguir en el desarrollo del mismo.

**Cita:** Frutos Díaz-Alejo, Jesús; Earl, Julie (2020) Tratamiento del cáncer de páncreas con ultrasonidos de baja intensidad: una revisión bibliográfica. *dianas* 9 (2): e202009fa06. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202009fa06](http://www3.uah.es/dianas?e202009fa06) <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa06>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Copyright:** © Frutos-Díaz-Alejo J, Earl J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Cáncer de páncreas

El páncreas es un órgano esencial en el sistema digestivo y endocrino, produciendo hormonas (como insulina, glucagón o somatostatina) y liberándolas al torrente sanguíneo o secretando jugo pancreático al intestino. Histológicamente, el páncreas puede clasificarse en distintos tipos de regiones, como los acinos secretores de enzimas digestivas, las células ductales secretoras de bicarbonato, las células centroacinares, los islotes pancreáticos secretores de hormonas y las células estrelladas. La mayoría de los tumores malignos pancreáticos son adenocarcinomas, y más raramente, tumores de tipo neuroendocrino (que pueden secretar hormonas como insulina o glucagón) o carcinomas de tipo acinar (que secretarán enzimas digestivas) [1].

El adenocarcinoma de células ductales pancreáticas es el tipo de carcinoma más frecuente. Este tumor es un grave problema en sanidad, con alrededor de 367000 nuevos casos anuales diagnosticados alrededor del mundo y aproximadamente 359000 fallecimientos cada año. Posee una tasa de mortalidad del 98%. [2]. En países desarrollados, el cáncer pancreático es actualmente el cuarto en lo que respecta a fallecimientos en varones (tras pulmón, colorrectal y prostático) y en mujeres (tras mama, colorrectal y pulmón), y se prevee que podría convertirse en la segunda causa de muerte en la próxima década. En Europa, las muertes por esta clase de tumores han aumentado en estos últimos 5 años en un 20%. [3]. Esta patología se asocia con un pronóstico extremadamente pobre por varias razones. En primer lugar, se diagnostica en estadios avanzados de la enfermedad, normalmente debido a la no presencia de síntomas o a la presencia de síntomas inespecíficos, una falta de biomarcadores sensibles y específicos para la patología y dificultad en el estudio por imagen del tumor. Asimismo, estos tumores son muy agresivos, con crecimiento vascular y perineural, estableciendo metástasis a distancia en muy poco tiempo. Además, el cáncer pancreático se caracteriza por una destacada resistencia a las opciones más convencionales de tratamiento, incluyendo quimioterapia, radioterapia o tratamientos moleculares como la inmunoterapia.

Por último, estos tumores poseen un fenotipo altamente mutagénico, con alteraciones génicas y epigenéticas muy abundantes y un microambiente y estroma tumoral muy denso [1].

Más del 80% de los tumores pancreáticos se deben a mutaciones que ocurren de forma esporádica, mientras que el 10% se deben a mutaciones heredadas que se encuentran en la línea germinal (como BRCA2, p16, ATM y mutaciones en genes de reparación de DNA) que aumentan el riesgo de sufrir esta patología. Sin duda, la mutación predominante en más del 90% de tumores pancreáticos es la ocurrida en KRAS. También podemos destacar otras mutaciones como en p53, CDKN2A y SMAD4 (en un 50-80%) [4-7]. Otras mutaciones frecuentes afectan a mecanismos de reparación del DNA, incluyendo algunos que actúan en el control de la aminación/desaminación del genoma, y otros encargados en el mantenimiento general del DNA (como BRCA, dando fallos en la reparación de *mismatch repairs*) [8].

Todos los factores mencionados anteriormente hacen que la supervivencia global a los 5 años sea menor al 7%, y, dentro de estos pacientes, podemos observar que un 10-20% de ellos han sido sometidos a agresivos tratamientos quirúrgicos, consiguiendo una supervivencia a los 5 años del 15-25% [9]. Los lugares más frecuentes de establecimiento de metástasis (ordenados por frecuencia) son hígado, pulmón, hueso, cerebro, músculo, corazón, pleura, estómago, ombligo, riñón, apéndice, cordón espermático y próstata [10]. Pese a que se ha investigado en distintas áreas observando cierto progreso (como en combinaciones quimioterapéuticas, mejores cuidados perioperatorios y cirugías más seguras), el efecto global en su pronóstico no ha cambiado, observando unos ratios de incidencia y mortalidad muy similares en los últimos 20 años [11].

### Factores de riesgo

La edad es el mayor determinante del cáncer pancreático. La mayoría de los pacientes son diagnosticados con más de 50 años, con un pico de incidencia en la séptima y octava década de vida. Normalmente afecta a pacientes con una edad media de 71 años en hombres y 75 en mujeres [2]. Los factores de riesgo más importantes a tener en cuenta en esta patología son el tabaco, la diabetes mellitus de tipo II y la pancreatitis crónica, siendo todos ellos causantes de un 25-33% de los casos de cáncer pancreático. En términos de factores de riesgo prevenibles, el tabaco es el más importante. Los fumadores poseen de dos a tres veces mayor riesgo de desarrollar cáncer pancreático [2]. La obesidad y la baja actividad física también se asocian al desarrollo de cáncer de páncreas (en conjunción con el desarrollo de diabetes mellitus de tipo II) [12]. La diabetes mellitus es tanto un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad como una consecuencia del establecimiento de un tumor primario en estadios tempranos, observando el aumento en un 200% del riesgo de padecer cáncer [13]. Algunos factores nutricionales (incluyendo la alta ingesta de grasas saturadas y carnes rojas procesadas, y el bajo consumo de vegetales y frutas) se asocian con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer pancreático [14, 15]. Asimismo, se ha observado una asociación entre el desarrollo de enfermedad y el consumo elevado de alcohol, pero no se ha observado dicho riesgo en pacientes con consumo moderado del mismo, ya que el alto consumo de alcohol se relaciona con la pancreatitis crónica, la cual incrementa el riesgo de cáncer en más de 10 veces [16, 17]. La pancreatitis crónica es la causante del 5% de estos tumores. Por último, se ha observado la existencia de agentes biológicos que pueden aumentar el riesgo de causar carcinogénesis pancreática, como *Helicobacter pylori*, el virus de la hepatitis B y el virus de la inmunodeficiencia humana [7].

### Fisiopatología y rutas de señalización implicadas

El tumor pancreático muestra una señalización autocrina y paracrina anormal, mediante la modificación de cascadas que promoverán la proliferación, migración, invasión y metástasis. Cabe destacar la complejidad de las vías de señalización en estas células cancerígenas, con vías interconectadas en numerosos nodos de convergencia. Por ejemplo, muchas moléculas como TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor alpha*, factor transformante de crecimiento alfa), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*, factor de crecimiento similar a insulina 1), FGF (*Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento de fibroblastos) y HGF (*Hepatocyte Growth Factor*, factor de crecimiento de hepatocitos), por mediación de sus respectivos receptores de tipo tirosina quinasa (como FGFR y HGFR) activan múltiples vías de señalización que potencian la autosuficiencia mitogénica (la célula se divide en ausencia de factores de crecimiento o los sintetiza ella misma de manera exacerbada) y promueven la migración e invasión. Además, se activan simultáneamente vías anti-apoptóticas que promueven la supervivencia celular, como STAT-3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*, transductor de señal y activador de la transcripción 3), el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y AKT (proteína serin-treonin quinasa). Además, genes activos durante el desarrollo como Wnt, SHH y NOTCH se encuentran reactivados en los tumores pancreáticos [18].

En las células pancreáticas alteradas se potencia la actividad de los EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*, receptor de factor de crecimiento epitelial, implicados en proliferación, diferenciación, migración, angiogénesis, supervivencia, activación de *docking proteins* en membrana y presentación de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento). Además, esto se agrava debido a la formación de heterodímeros entre HGFR y EGFR (como los formados por HER2-HER3), multiplicando el número de

ligandos que se unirán a dichos receptores, produciendo una señalización desmesurada [18-20]. Todo esto está dirigido por el oncogén KRAS mutado y la pérdida de la expresión del supresor tumoral p16 [21]. Asimismo, el cáncer pancreático muestra alteraciones metabólicas e insensibilidad a inhibidores de crecimiento, mayormente debido a la expresión de distintas isoformas de TGF- $\beta$  mutadas que promueven interacción entre las células tumorales, el microambiente y el estroma tumoral que llevarán al desarrollo de metástasis. Cabe destacar su participación en la activación de la vía canónica de las MAPK (vía Ras-Raf-MEK-ERK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*), de Src (proteína tirosina quinasa) y AKT (que activará a mTOR, aumentando la supervivencia, crecimiento y metabolismo celular) [22].

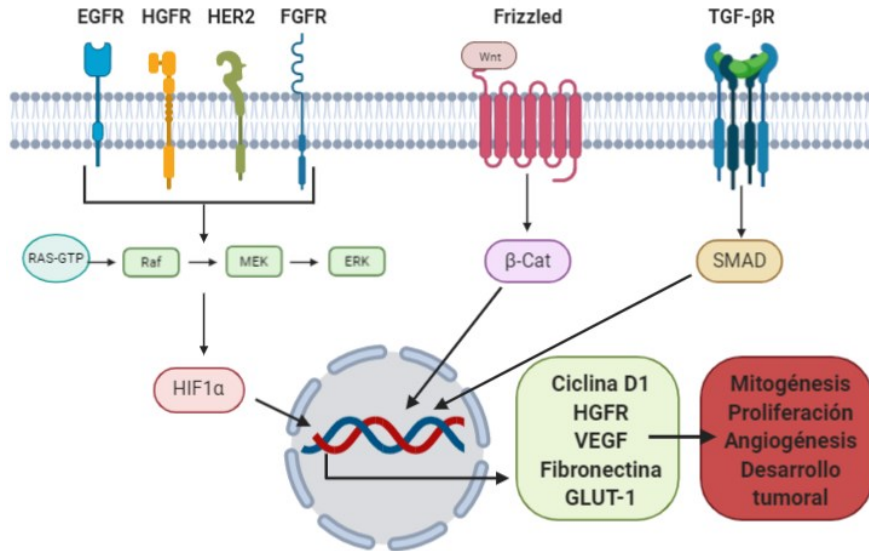


Figura 1.- Principales vías de señalización desreguladas en las células tumorales pancreáticas. Podemos destacar las vías Wnt (por aumento de Wnt y su receptor Frizzled), la vía canónica/clásica de las MAPK (estimulada por la sobreexpresión de receptores y sus correspondientes ligandos, como EGFR, HGFR y la interacción de éstos con HER2, así como el aumento de FGFR) y el aumento de TGF- $\beta$ R. Todas ellas promueven la expresión de distintos genes que, en última instancia, favorecen el desarrollo tumoral.

### Metabolismo tumoral pancreático

Los cambios metabólicos, la adaptación al microambiente tumoral y los procesos dirigidos por los oncogenes son claves en la carcinogénesis. El cáncer pancreático destaca por un microambiente altamente hipóxico, debido principalmente a la expresión de KRAS mutado [23, 24].

Las células tumorales pancreáticas se han adaptado a la supervivencia en estas condiciones debido a varios mecanismos, principalmente guiados por HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible Factor 1-alpha*, factor de hipoxia inducible 1-alfa) y KRAS mutado [25], los cuales favorecen el cambio metabólico (efecto Warburg). Estas células presentan altos niveles de autofagia, un proceso que consiste en la autodegradación de orgánulos celulares y macromoléculas [26]. Otro proceso muy activo en los tumores pancreáticos es la macropinocitosis, siendo uno de los mecanismos que permiten el transporte de proteínas extracelulares hacia el interior celular [27]. Este proceso, junto con la degradación lisosomal asociada, es necesario para cumplir los requerimientos nutricionales de la célula, como el alto consumo de glutamina, así como de otros aminoácidos empleados en el metabolismo celular [28].

Las estrategias emergentes contra esta patología se centran en actuar contra dianas importantes encargadas de este cambio metabólico en las células tumorales, como por ejemplo la PKM2 (Piruvato Quinasa isoforma M2), transportadores de lactato y los mediadores en el proceso de autofagia [29].

Las células pancreáticas cambian su metabolismo hacia la llamada glicolisis aeróbica (en la cual se produce la fermentación de la glucosa aun en presencia de oxígeno, no empleando la cadena transportadora de electrones mitocondrial para producir ATP), produciendo lactato, el cual se convierte en un importante nutriente en el microambiente tumoral, y además posee distintas funciones, destacando la función proinflamatoria [29]. De este modo, se consigue limitar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que se disminuye la oxidación de piruvato en el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa posterior en la mitocondria [30]. La captación de glutamina se encuentra incrementada puesto que estas células dependen de este aminoácido en su metabolismo para sintetizar proteínas, ácidos nucleicos y mantener el equilibrio REDOX [30]. La captación de glucosa y su uso también se incrementa, induciendo la expresión de GLUT1 (*Glucose Transporter 1*, transportador de glucosa 1), HK1 (hexoquinasa 1) y HK2 (hexoquinasa 2) [31]. También aumenta la síntesis de ácidos grasos empleando glutamina en vez del piruvato proveniente de la glucosa, debido a la activación de enzimas inducidas por la hipoxia [32, 33].

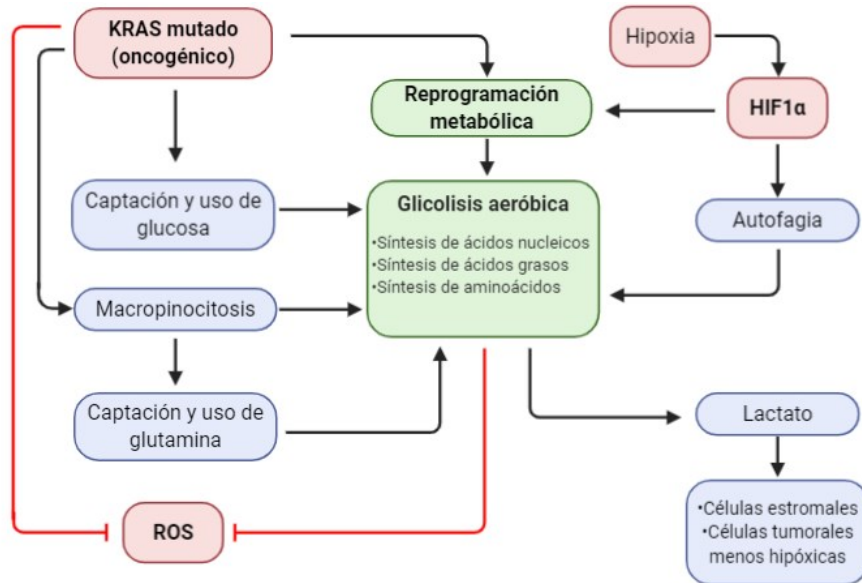


Figura 2.- Reprogramación metabólica (efecto Warburg) de las células tumorales pancreáticas.

### Microambiente y estroma tumoral

Los tumores pancreáticos poseen un abundante y denso estroma, dando lugar a un ambiente hipóxico. Este estroma está compuesto por matriz extracelular (ECM) y proteínas de la misma, como colágeno, fibronectina y laminina. Además, podemos distinguir las proteínas no-colagenosas (no pertenecen a la matriz, tales como glicoproteínas, proteoglicanos y glucosaminoglicanos). Otros factores en el estroma que median la interacción entre las células tumorales con la ECM son los factores de crecimiento, osteopontina, periostina y distintas proteínas ácidas ricas en cisteína [34].

Con respecto a los elementos celulares que conforman el estroma, podemos destacar las células estrelladas pancreáticas, encargadas de producir la ECM, contribuyendo al reclutamiento de células inmunes, endoteliales y neuronales [34]. Las células del sistema inmune más importantes que participan en el tumor son las células T, siendo la mayoría T CD4+ reguladoras (impiden el ataque inmune sobre el tumor), células supresoras derivadas de la línea mieloide, macrófagos y mastocitos [35, 36]. Además, se realiza una señalización intercelular bidireccional entre las células tumorales y las células estrelladas, demostrado tanto en ensayos *in vitro* e *in vivo*, contribuyendo cada tipo celular a la proliferación y migración del otro, además de inhibir la apoptosis [37]. Un fenómeno importante en esta patología es que las células estrelladas favorecen complicaciones diabéticas al promover la apoptosis del páncreas endocrino (concretamente los islotes β-pancreáticos)

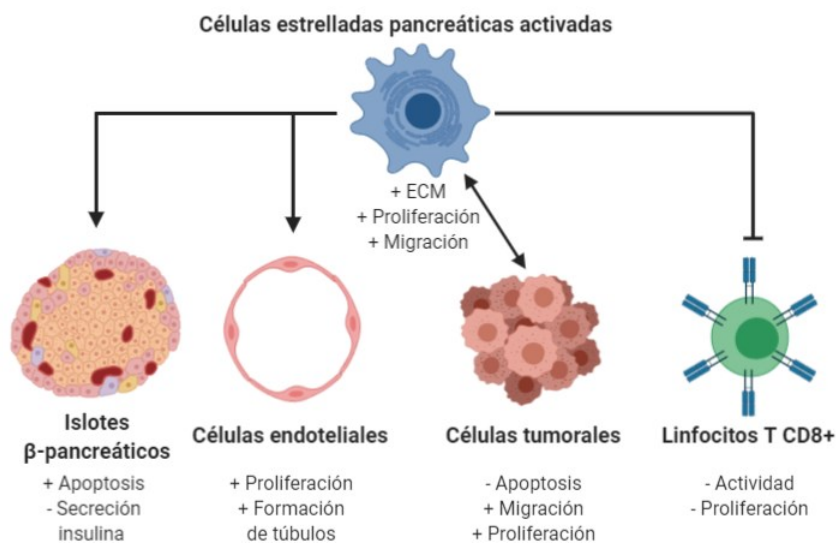


Figura 3.- Principales funciones de las células pancreáticas estrelladas en los distintos tipos celulares del tumor pancreático.

Las células estrelladas pueden inhibir la apoptosis de las células cancerosas, incrementando su supervivencia y promoviendo la formación de un nicho tumoral importante en la quimiorresistencia. Otra función importante de estas células es que pueden viajar desde el tumor primario a distintos sitios metastásicos, donde contribuyen al establecimiento y crecimiento de las metástasis. Asimismo, las células

estrelladas pueden interactuar con otras células estromales. Un ejemplo es la potenciación de la proliferación de las células endoteliales y la formación del tubo endotelial (favoreciendo la angiogénesis), todo ello gracias a la acción de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de crecimiento vasculoendotelial) y HGF, ambos secretados por las células estrelladas [37, 38]. También contribuyen a la evasión inmune tumoral secuestrando linfocitos T CD8+ y disminuyendo su actividad, inhibiendo su función como supresores tumorales [39]. En conjunción con lo anteriormente expuesto, este estroma hace que sea complicado extraer biopsias de calidad, pudiendo no observar las glándulas neoplásicas con pequeñas muestras. Además, este estroma posee una gran presión interna y densidad gracias a la alta cantidad de elementos que se encuentran en él, impidiendo la entrada de agentes quimioterapéuticos en las células neoplásicas [40-42].

### Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico suele ser tardío, la media de supervivencia de los pacientes suele ser de sólo 6-9 meses tras el diagnóstico para aquellos pacientes que presentan enfermedad localmente avanzada y 3 meses para aquellos con enfermedad metastásica. Ante la ausencia de tratamiento curativo, la principal meta clínica es aliviar los síntomas y frenar la progresión del tumor [1]. Los tumores pancreáticos forman lesiones sólidas que obstruyen y dilatan los conductos pancreático y biliar, siendo un signo importante para el diagnóstico. La afectación de los grandes vasos cercanos al páncreas, tales como la arteria y vena mesentérica superior, dictarán si el tumor se clasificará en resecable, localmente avanzado o irresecable. La mayoría de los pacientes presentan al diagnóstico enfermedad localmente avanzada. Menos del 20% de los pacientes poseen tumores resecables. Dentro de los que sigan el esquema de resección quirúrgica con terapia adyuvante, el 80% tendrán recaídas y fallecerán por la enfermedad. Un 50-60% presentarán enfermedad metastásica avanzada [43, 44]. Uno de los problemas más importantes en la clínica es el escaso abanico terapéutico contra el cáncer pancreático y la pobre eficacia de éste. Las mutaciones en KRAS agravan el pronóstico puesto que éstas proporcionan una alta resistencia a los fármacos [45]. El fármaco Gemcitabina es el *gold standard* para el tratamiento del cáncer pancreático. Sin embargo, la tasa de respuesta y beneficio clínico es tan sólo de un 12-23,8%, aumentando la supervivencia en 10 días. El único tratamiento dirigido aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, Agencia de Medicamentos y Alimentación) es el Erlotinib [10]. Los pacientes con lesiones con bordes resecables deben de ser incluidos en ensayos clínicos lo antes posible. Las principales opciones de tratamiento existentes se encuentran resumidas en la Tabla 1. La cirugía agresiva es la única opción potencialmente curativa para el cáncer de páncreas. A día de hoy se ha conseguido reducir la mortalidad operativa a un aceptable 5% [46, 47].

<i>Tipo de lesión/ estadio del tumor</i>	<i>Tratamiento preferencial de elección</i>
<b>Lesión con bordes resecables/ tumor localizado</b>	Ensayos clínicos/ Quimioterapia (Gemcitabina o FOLFIRINOX) + Radioterapia + Cirugía
<b>Enfermedad local avanzada</b>	Quimioterapia (Gemcitabina) ó Quimioterapia (Capecitabina) + Radioterapia
<b>Enfermedad avanzada metastásica</b>	Paliativos, <i>stent</i> duodenal y quimioterapia (Nab-Paclitaxel, Gemcitabina o FOLFIRINOX)

Tabla 1.- Principales opciones de tratamiento a seguir según el estadio del tumor pancreático.

### Ultrasonidos

La aplicación de los ultrasonidos (US) en Medicina se lleva a cabo desde hace años. Los ultrasonidos de baja potencia (1 MHz) se han empleado desde los años 50 en Fisioterapia para tratar tendinitis o bursitis. En los 80, ultrasonidos de alta longitud de onda se comenzaron a emplear para tratar los cálculos renales, reemplazando esta técnica a la litotripsia [48]. Los ultrasonidos se emplean en novedosos tratamientos (experimentales en algunos casos), solos o en combinación con fármacos, para el tratamiento del cáncer [49], diabetes [50], infartos [51] y trombosis [52]. Aun así, no se conoce demasiado sobre este tipo de energía (efectos biológicos, estandarización de dosis, beneficios y riesgos, seguridad...). Por ello, es un campo emergente en distintas especialidades que no ha desarrollado todo su potencial, necesitando más investigación para desarrollar soluciones ultrasónicas extrapolables a la clínica.

### Efectos biológicos de los ultrasonidos

Los efectos biológicos de los US dependen de la dosis y los parámetros empleados contra las células, tales como presión, intensidad, frecuencia o longitud de onda. Los ultrasonidos son una onda mecánica con un uso muy seguro, libre de radiaciones ionizantes, que puede no tener tantos efectos adversos y/o secundarios como los tratamientos farmacológicos o quirúrgicos convencionales.

El incremento de la frecuencia de los ultrasonidos potenciará sus efectos térmicos y mecanismos de acción no térmicos. Este tipo de ultrasonidos se denominan HIFU (*High Intensity Focused Ultrasounds*, ultrasonidos de alta intensidad focalizados), y normalmente poseen una intensidad mayor a 5W/cm<sup>2</sup>. Realizan su efecto a nivel de tejido por una sinergia de efectos térmicos, mecánicos y biológicos. El calor inducido mediante HIFU es el resultado de la absorción de energía por parte del tejido biológico. Se emplean en fisioterapia para tratar tejidos como hueso y tendón, mejorando la curación sin dolor. También se emplean en clínica para coagular el tejido y dar lugar a la ablación del mismo e incluso producir necrosis tumoral en lugares de complicado acceso de manera no invasiva [48, 53].

Sin embargo, en nuestro estudio nos centraremos en la otra variante, los llamados LIUS (*Low Intensity Ultrasounds*), ultrasonidos de baja intensidad con menor frecuencia de onda, los cuales poseen efectos biológicos bien definidos: la llamada cavitación celular en membrana y la activación de los cuerpos gaseosos. Estos LIUS poseen una intensidad comprendida en un rango de 0,125-3W/cm<sup>2</sup>. En clínica son útiles para estimular respuestas fisiológicas o acelerar el transporte de drogas a través de la piel [53]. Pueden dar hemorragia en vasos sanguíneos y muerte celular por distintos daños en la membrana celular, induciendo la formación de poros en dicha superficie [48]. Los ultrasonidos son capaces de abrir poros en la membrana de forma transitoria, permitiendo el paso de drogas, proteínas y genes a su través [54, 55]. De este modo, por el mecanismo de cavitación en membrana los ultrasonidos son capaces de potenciar el transporte molecular a través de membranas celulares en células vivas de manera reversible, en ensayos realizados con moléculas pequeñas, macromoléculas y material genético, observándose gran heterogeneidad entre subpoblaciones celulares adyacentes [56, 57].

### Uso de ultrasonidos de alta intensidad (HIFU) contra el cáncer pancreático

El tratamiento del cáncer pancreático mediante HIFU es un proceso totalmente no invasivo, sin cirugía, incisiones o transfusiones, teniendo de este modo menor riesgo que las prácticas habituales. Las ondas acústicas de alta intensidad solo se darán en la región seleccionada de forma focalizada, reduciendo los efectos secundarios y adversos de esta práctica como quemaduras de piel, dolor, hemorragias o molestia abdominal. Asimismo, al no producir radiación ionizante, teóricamente no habría limitación en el número de sesiones a las que puede someterse el paciente. Cabe destacar que, en estas sesiones, el paciente está consciente, ligeramente sedado, o sometido a anestesia general. Esta técnica se realiza guiándose mediante resonancia magnética o ecografía [58]. En primer lugar, el rápido aumento de temperatura produce fibrosis y necrosis en la zona tratada. Cabe destacar que en las células que han sobrevivido a la necrosis se ha demostrado que se inducirá la apoptosis, activando la degradación de su DNA mediante endonucleasas [59]. La ablación tumoral mediante HIFU es curativa en pacientes con un tumor pancreático en estadio temprano, y es un tratamiento paliativo muy eficaz en pacientes con cáncer pancreático en estadio avanzado. Esta técnica se emplea en países asiáticos como China, Japón, Corea, además de algunos países europeos, desde los años 90, obteniendo buenos resultados. Sin embargo, no ha sido aprobado por la FDA en Estados Unidos [60]. Cabe destacar que se requiere una preparación para realizar este tipo especial de técnica, además de que no todos los pacientes responden de la misma forma, ya que aquellos que tienen heridas o cicatrices (ya sean cutáneas o subcutáneas) absorberán en mayor medida la energía acústica, resultando en fuertes quemaduras [61]. Además, otro problema de esta técnica es que no hay una dosis estandarizada de HIFU, siendo un tratamiento modificado a partir de la experiencia empírica en cada uno de los pacientes. Se necesita más investigación en este campo, así como su efecto terapéutico combinando el empleo de ultrasonidos con distintos fármacos [58].

### Efecto de ultrasonidos en receptores ABC y relación con la resistencia a fármacos (MDR)

La sobreexpresión de los llamados canales ABC (*ATP-binding cassette*) son un problema de cara al tratamiento de los pacientes con cáncer. Estos canales transportan drogas muy variadas de manera activa desde el interior celular hacia el exterior, dando lugar a la llamada multirresistencia a drogas (MDR, *Multi-Drug Resistance*), disminuyendo significativamente la eficacia de los tratamientos quimioterapéuticos. La MDR en cáncer es un fenómeno que ocurre cuando las células cancerosas desarrollan resistencia a agentes quimioterapéuticos cuya estructura es muy distinta entre sí. El desarrollo de la resistencia a quimioterapia es la principal causa de fracaso en los tratamientos, afectando esto a varios tipos de tumores sólidos [62-64]. Los transportadores ABC son proteínas de membrana que poseen tanto dominios transmembrana como dominios de unión a nucleótidos. Estos últimos generan energía obtenida a partir de la hidrólisis de ATP para conseguir realizar un transporte activo en contra de gradiente a través de la membrana [62]. Dentro de esta familia se distinguen distintos miembros según pequeñas variaciones en los dominios que conforman la proteína, destacando algunos en células cancerígenas como ABCB1 (Glicoproteína P), MRP1 (*Multi-Drug Resistance-associated Protein 1*) y ABCG2. Todos transportan un amplio abanico de sustratos, como iones, azúcares, aminoácidos, lípidos, toxinas y fármacos quimioterapéuticos [65]. Tras la exposición a US, las células MDR se vuelven más sensibles a los fármacos antitumorales [66]. Aun así, no está claro el mecanismo que posibilita a los US modular a los transportadores ABC en la membrana. Por ello, se ha llegado a la conclusión de que se necesita más estudio en este ámbito, pudiendo ser una importante mejora terapéutica en clínica.

## Efecto de los ultrasonidos sobre la expresión génica y la apoptosis

Diversos estudios han demostrado que los US poseen un efecto bilateral en la expresión génica en tejidos vivos, dependiendo de la dosis a la que se someta a los mismos. En primer lugar, Tabuchi y colaboradores, en 2008, demostraron el efecto de los ultrasonidos alterando la expresión génica *in vitro*, disminuyendo la expresión de 193 genes asociados con crecimiento celular, proliferación y desarrollo, y aumentando la expresión de 201 genes relacionados con movimiento celular, cambios morfológicos y apoptosis [67]. Además, Kruse y colaboradores en 2008 demostraron que el incremento de apoptosis se ve reflejado en el aumento de la expresión de mRNA de HSP-70 (*Heat Shock Protein-70*, proteína de choque térmico 70) *in vivo* [68]. Por último, varios estudios han demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que los US inducen la muerte celular en distintos tipos de tumores. Tras la exposición a US, las células muestran las características morfológicas y moleculares más clásicas de la apoptosis, como condensación del núcleo y cambios en la posición de la cromatina, aumento de la expresión de la fosfatidilserina en membrana y expresión de BCL-2 apoptóticas (como BAX, BAD y Bak, promoviendo la activación de la vía apoptótica intrínseca mitocondrial, mediante la liberación del citocromo C al citosol y activación de las caspasas 3 y 9) [57, 69, 70].

## Discusión

Nuestra investigación es parte de un proyecto mayor con un enfoque multidisciplinar a largo plazo, cuyo objetivo es el desarrollo de una terapia basada en LIUS para tratar el cáncer pancreático. En nuestra línea nos centraremos en el hecho de que la terapia génica y especialmente la acción de los fármacos antineoplásicos necesitan la entrada de una gran cantidad de moléculas en el interior celular para desempeñar su acción. Los resultados preliminares son bastante prometedores, teniendo en cuenta la innovación que ha supuesto desarrollar los métodos empleados en el laboratorio en un corto espacio de tiempo. Las líneas celulares empleadas en el estudio son 3: Panc-1 y MiaPaCa (células epiteliales tumorales pancreáticas) y BJ-hTERT (fibroblastos inmortalizados provenientes de prepucio humano). A modo de resumen, se observaron pequeñas diferencias en la viabilidad de las células tumorales después de la exposición a LIUS, mientras que se observó una reducción en la vitalidad celular, particularmente en las células MiaPaCa. Además, se observó un aumento en la expresión del marcador epitelial EpCAM en células tumorales y una expresión reducida del marcador tumoral MUC1 en células Panc-1, así como una disminución pequeña, pero significativa, en los niveles generales de expresión de ARNm de VEGF. También se encontraron diferencias en la viabilidad de los fibroblastos BJ-hTERT después de la exposición a LIUS y una reducción significativa en la expresión del factor de activación de fibroblastos FAP. Sin embargo, nuestros resultados más esperanzadores y relevante son los obtenidos en los ensayos de migración. Hubo una reducción en la capacidad de migración de las células Panc-1 después de la exposición a LIUS (46% sin LIUS frente a 17% con LIUS). Asimismo, al estimular la migración de esta línea con TGF- $\beta$ , el cultivo tratado con LIUS sólo consiguió cerrar la herida en un 60% de su longitud. Los fibroblastos de la línea BJ-hTERT generalmente cierran la herida en unas 12-18 horas. Sin embargo, 23 horas después de la exposición a LIUS, la herida no se había cerrado completamente (sólo al 52% de su longitud). El efecto de los LIUS parece depender de la dosis, ya que entre 24-48 horas después de la exposición a los ultrasonidos se restableció la capacidad de migración de las células. Los ensayos de migración han presentado una variabilidad en la dinámica de movimiento celular, pudiendo pensar que los ultrasonidos actúan a modo de “droga”, requiriendo dosis de rescate que permitan perpetuar su efecto de disminución de la movilidad celular y cambio a un fenotipo epitelial a lo largo del tiempo, tanto en células tumorales como en fibroblastos, permitiendo la entrada de fármacos para atacar el tumor al desestabilizar el estroma y evitando la migración de las células tumorales.

Pese a ser una tecnología poco estudiada, los ultrasonidos han mostrado ser una potencial terapia para este tipo de tumores sólidos agresivos dada la dificultad de su tratamiento actual, su alta letalidad y la necesidad del desarrollo de una terapia para estos pacientes. Concebimos la idea de que los LIUS sirvan como una terapia de apoyo que favorezca el efecto de los fármacos antineoplásicos, dado que el gran problema de los tumores pancreáticos es su estroma. Confiamos en avanzar en nuestra línea y conseguir buenos resultados, tanto *in vitro*, como *in vivo* (en modelos de ratón).

## Referencias

1. Neoptolemos, J.P., Urrutia, R., Abbruzzese, J.L. and Büchler, M.W. 2018. Pancreatic Cancer. New York: Springer. 1661.
2. Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. 2015. Cancer statistics, 2015. CA Cancer J Clin, 65(1): 5-29
3. Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., et al. 2014. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. Cancer Res, 74(11): 2913-21

4. Bailey, P., Chang, D.K., Nones, K., Johns, A.L., et al. 2016. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592): 47-52
5. Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., et al. 2008. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321(5897): 1801-6
6. Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.M., Chang, D.K., et al. 2015. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, 518(7540): 495-501
7. Yeo, T.P. 2015. Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Semin Oncol*, 42(1): 8-18
8. Blackford, A., Parmigiani, G., Kensler, T.W., Wolfgang, C., et al. 2009. Genetic mutations associated with cigarette smoking in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 69(8): 3681-8
9. He, J., Ahuja, N., Makary, M.A., Cameron, J.L., et al. 2014. 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades. *HPB (Oxford)*, 16(1): 83-90
10. Tempero, M.A., Malafa, M.P., Behrman, S.W., Benson, A.B., 3rd, et al. 2014. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*, 12(8): 1083-93
11. Malvezzi, M., Carioli, G., Bertuccio, P., Boffetta, P., et al. 2018. European cancer mortality predictions for the year 2018 with focus on colorectal cancer. *Ann Oncol*, 29(4): 1016-22
12. Genkinger, J.M., Kitahara, C.M., Bernstein, L., Berrington de Gonzalez, A., et al. 2015. Central adiposity, obesity during early adulthood, and pancreatic cancer mortality in a pooled analysis of cohort studies. *Ann Oncol*, 26(11): 2257-66
13. Bosetti, C., Rosato, V., Li, D., Silverman, D., et al. 2014. Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium. *Ann Oncol*, 25(10): 2065-72
14. Larsson, S.C. and Wolk, A. 2012. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *Br J Cancer*, 106(3): 603-7
15. Rohrmann, S., Linseisen, J., Nothlings, U., Overvad, K., et al. 2013. Meat and fish consumption and risk of pancreatic cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*, 132(3): 617-24
16. Lucenteforte, E., La Vecchia, C., Silverman, D., Petersen, G.M., et al. 2012. Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol*, 23(2): 374-82
17. Tramacere, I., Scotti, L., Jenab, M., Bagnardi, V., et al. 2010. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J Cancer*, 126(6): 1474-86
18. Preis, M. and Korc, M. 2011. Signaling pathways in pancreatic cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 21(2): 115-29
19. Bublil, E.M. and Yarden, Y. 2007. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol*, 19(2): 124-34
20. Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., et al. 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev*, 20(10): 1218-49
21. Matsushita, A., Gotze, T. and Korc, M. 2007. Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Res*, 67(21): 10309-16
22. Gore, A.J., Deitz, S.L., Palam, L.R., Craven, K.E., et al. 2014. Pancreatic cancer-associated retinoblastoma 1 dysfunction enables TGF-beta to promote proliferation. *J Clin Invest*, 124(1): 338-52
23. Erkan, M., Reiser-Erkan, C., Michalski, C.W., Deucker, S., et al. 2009. Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Neoplasia*, 11(5): 497-508
24. Kong, B., Cheng, T., Wu, W., Regel, I., et al. 2015. Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress characterizes a necrotic phenotype of pancreatic cancer. *Oncotarget*, 6(31): 32154-60
25. Ye, L.Y., Zhang, Q., Bai, X.L., Pankaj, P., et al. 2014. Hypoxia-inducible factor 1alpha expression and its clinical significance in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Pancreatol*, 14(5): 391-7
26. Rosenfeldt, M.T., O'Prey, J., Morton, J.P., Nixon, C., et al. 2013. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature*, 504(7479): 296-300



27. Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., et al. 2013. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 497(7451): 633-7
28. Kamphorst, J.J., Nofal, M., Commisso, C., Hackett, S.R., et al. 2015. Human pancreatic cancer tumors are nutrient poor and tumor cells actively scavenge extracellular protein. *Cancer Res*, 75(3): 544-53
29. Cohen, R., Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Faivre, S., et al. 2015. Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*, 6(19): 16832-47
30. Ma, Z., Vocadlo, D.J. and Vosseller, K. 2013. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-kappaB activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*, 288(21): 15121-30
31. Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., et al. 2012. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3): 656-70
32. Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Bell, E.L., Mattaini, K.R., et al. 2011. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381): 380-4
33. Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E., Cross, J.R., et al. 2011. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(49): 19611-6
34. Seymour, A.B., Hruban, R.H., Redston, M., Caldas, C., et al. 1994. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*, 54(10): 2761-4
35. Clark, C.E., Hingorani, S.R., Mick, R., Combs, C., et al. 2007. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res*, 67(19): 9518-27
36. Lutz, E.R., Wu, A.A., Bigelow, E., Sharma, R., et al. 2014. Immunotherapy converts nonimmunogenic pancreatic tumors into immunogenic foci of immune regulation. *Cancer Immunol Res*, 2(7): 616-31
37. Xu, Z., Vonlaufen, A., Phillips, P.A., Fiala-Beer, E., et al. 2010. Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. *Am J Pathol*, 177(5): 2585-96
38. Patel, M.B., Pothula, S.P., Xu, Z., Lee, A.K., et al. 2014. The role of the hepatocyte growth factor/c-MET pathway in pancreatic stellate cell-endothelial cell interactions: antiangiogenic implications in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 35(8): 1891-900
39. Tang, D., Yuan, Z., Xue, X., Lu, Z., et al. 2012. High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 130(10): 2337-48
40. Jacobetz, M.A., Chan, D.S., Neesse, A., Bapiro, T.E., et al. 2013. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 62(1): 112-20
41. Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., et al. 2009. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, 324(5933): 1457-61
42. Provenzano, P.P., Cuevas, C., Chang, A.E., Goel, V.K., et al. 2012. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 21(3): 418-29
43. Bockhorn, M., Uzunoglu, F.G., Adham, M., Imrie, C., et al. 2014. Borderline resectable pancreatic cancer: a consensus statement by the International Study Group of Pancreatic Surgery (ISGPS). *Surgery*, 155(6): 977-88
44. Tempero, M., Arnoletti, J.P., Ben-Josef, E., Bhargava, P., et al. 2007. Pancreatic adenocarcinoma. *Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*, 5(10): 998-1033
45. Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., et al. 1997. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol*, 15(6): 2403-13
46. Ducreux, M., Cuhna, A.S., Caramella, C., Hollebecque, A., et al. 2015. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 26 Suppl 5(v56-v68)
47. Hartwig, W., Hackert, T., Hinz, U., Gluth, A., et al. 2011. Pancreatic cancer surgery in the new millennium: better prediction of outcome. *Ann Surg*, 254(2): 311-9

48. Miller, D.L., Smith, N.B., Bailey, M.R., Czarnota, G.J., et al. 2012. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J Ultrasound Med*, 31(4): 623-34
49. Kennedy, J.E. 2005. High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat Rev Cancer*, 5(4): 321-7
50. Prausnitz, M.R., Mitragotri, S. and Langer, R. 2004. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 3(2): 115-24
51. Sacco, R.L., Chong, J.Y., Prabhakaran, S. and Elkind, M.S. 2007. Experimental treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet*, 369(9558): 331-41
52. Polak, J.F. 2004. Ultrasound energy and the dissolution of thrombus. *N Engl J Med*, 351(21): 2154-5
53. Zhou, Y.F. 2011. High intensity focused ultrasound in clinical tumor ablation. *World J Clin Oncol*, 2(1): 8-27
54. Marmottant, P. and Hilgenfeldt, S. 2003. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936): 153-6
55. Mitragotri, S. 2005. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*, 4(3): 255-60
56. Guzman, H.R., Nguyen, D.X., Khan, S. and Prausnitz, M.R. 2001. Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. I. Quantification of molecular uptake and cell viability. *J Acoust Soc Am*, 110(1): 588-96
57. Miller, D.L. and Dou, C. 2009. Induction of apoptosis in sonoporation and ultrasonic gene transfer. *Ultrasound Med Biol*, 35(1): 144-54
58. Zhou, Y. 2014. High-intensity focused ultrasound treatment for advanced pancreatic cancer. *Gastroenterol Res Pract*, 2014
59. Sofuni, A., Moriyasu, F., Sano, T., Yamada, K., et al. 2011. The current potential of high-intensity focused ultrasound for pancreatic carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 18(3): 295-303
60. Wang, K., Zhu, H., Meng, Z., Chen, Z., et al. 2013. Safety evaluation of high-intensity focused ultrasound in patients with pancreatic cancer. *Onkologie*, 36(3): 88-92
61. Jung, S.E., Cho, S.H., Jang, J.H. and Han, J.Y. 2011. High-intensity focused ultrasound ablation in hepatic and pancreatic cancer: complications. *Abdom Imaging*, 36(2): 185-95
62. Higgins, C.F. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446(7137): 749-57
63. Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. and Varadi, A. 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Physiol Rev*, 86(4): 1179-236
64. Szakacs, G., Hall, M.D., Gottesman, M.M., Boumendjel, A., et al. 2014. Targeting the Achilles heel of multidrug-resistant cancer by exploiting the fitness cost of resistance. *Chem Rev*, 114(11): 5753-74
65. Robey, R.W., Polgar, O., Deeken, J., To, K.W., et al. 2007. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev*, 26(1): 39-57
66. Shao, Z.Y., Zhai, B.J., Zhao, C.L., Hu, K., et al. 2008. Cytotoxic effects and in vitro reversal of multidrug resistance by therapeutic ultrasound in human hepatocarcinoma cell line (HepG2). *Ultrasonics*, 48(4): 297-302
67. Tabuchi, Y., Takasaki, I., Zhao, Q.L., Wada, S., et al. 2008. Genetic networks responsive to low-intensity pulsed ultrasound in human lymphoma U937 cells. *Cancer Lett*, 270(2): 286-94
68. Kruse, D.E., Mackanos, M.A., O'Connell-Rodwell, C.E., Contag, C.H., et al. 2008. Short-duration-focused ultrasound stimulation of Hsp70 expression in vivo. *Phys Med Biol*, 53(13): 3641-60
69. Poff, J.A., Allen, C.T., Traughber, B., Colunga, A., et al. 2008. Pulsed high-intensity focused ultrasound enhances apoptosis and growth inhibition of squamous cell carcinoma xenografts with proteasome inhibitor bortezomib. *Radiology*, 248(2): 485-91
70. Tang, W., Liu, Q., Wang, X., Wang, P., et al. 2009. Potential mechanism in sonodynamic therapy and focused ultrasound induced apoptosis in sarcoma 180 cells in vitro. *Ultrasonics*, 49(8): 786-93