



**UNIVERSIDAD DEL ROSARIO**

# **Respuesta de las células HeLa y EA.hy926 al estrés por hipoxia y radiación ionizante a través de la vía JAK/STAT y la supervivencia celular**

**Oscar Javier Ortega Recalde**

Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario

Facultad de Medicina

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Bogotá D.C., Colombia

2013



# **Respuesta de las células HeLa y EA.hy926 al estrés por hipoxia y radiación ionizante a través de la vía JAK/STAT y la supervivencia celular**

**Oscar Javier Ortega Recalde**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Maestría en Ciencias con Énfasis en Genética Humana**

Directora:

Ph.D. Ruth Elizabeth Garzón Fernández

Línea de Investigación:

Mecanismos Bioquímicos y Moleculares de la respuesta celular activada por estrés

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biotecnología (BioBio)

Universidad Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario

Facultad de Medicina

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Bogotá D.C., Colombia

2013



*"No debo buscar mi dignidad en el espacio, sino en el gobierno de mi pensamiento. No tendré más aunque posea mundos. Si fuera por el espacio, el universo me rodearía y me tragaría como un átomo; pero por el pensamiento yo abrazo al mundo"*

*Pensées et opuscules. Blaise Pascal*



## **Agradecimientos**

Deseo dar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me brindaron su colaboración y apoyo durante la realización de esta tesis y en mi formación profesional.

En primer lugar deseo agradecer a mi tutora Dra Ruth Garzón y al grupo de bioquímica con el que además de su guía y apoyo durante la realización de este trabajo mostraron una gran calidad humana y la importancia de una formación integral para sus estudiantes. A mis profesores por compartir sus conocimientos y ser un modelo a seguir tanto a nivel humano como académico. A mis padres Luis Humberto y Rosalba Teresa y hermanos Diego Fernando y Luis Humberto por apoyarme incondicionalmente en el transcurso de mi vida y mi carrera. A mis compañeros y amigos por su grata compañía y por todos los buenos momentos que compartimos juntos.

Deseo agradecer también a la Universidad del Rosario, por apoyar la realización del presente trabajo, al grupo de Física Medica y la Dirección de Investigación sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia, y a las instituciones que apoyaron los procedimientos de radiobiología. Por último mis agradecimientos a Colciencias y al programa “Virginia Gutiérrez de Pineda”, por su apoyo a jóvenes investigadores.

Espero que todas las experiencias y resultados obtenidos de la realización de este trabajo hayan sido útiles para el avance del conocimiento humano y el crecimiento científico y personal de cada una de las personas involucradas.



## Resumen

El comportamiento biológico de las células cancerosas es influenciado por el microambiente en el que se desarrollan y en este, factores como la angiogénesis o el estímulo de agentes estresores como la hipoxia, se han considerado críticos para su evolución y manejo terapéutico. Uno de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta celular frente a estímulos estresores es la activación de vías de señalización intracelulares; en este estudio, se evaluó el estado de la vía JAK/STAT y en ella la expresión/activación de la proteína STAT3 en la línea tumoral (HeLa) y endotelial (EA.hy926), sometidas a hipoxia física y química con mesilato de deferoxamina durante 2, 6 y 24 horas. Adicionalmente, al considerar la importancia de la hipoxia como un agente modificador de la respuesta en el manejo del cáncer utilizando radiaciones ionizantes, se construyeron curvas de supervivencia celular que permitieron evaluar el comportamiento celular frente a estos estímulos. El presente estudio resalta la importancia de la hipoxia como un estímulo que modifica la activación de la proteína STAT3 y la supervivencia de células irradiadas en las dos líneas estudiadas.

**Palabras clave:** Microambientes tumorales, hipoxia tumoral, células endoteliales, células HeLa, vía JAK/STAT, radiaciones ionizantes, ensayo de supervivencia celular.

## Abstract

The biological behavior of cancer cells is influenced by the microenvironment in which they develop and factors like angiogenesis and stressor stimuli such as hypoxia are considered critical for tumor development and therapeutic management. One of the molecular mechanisms involved in cellular response to stressful stimuli is the activation of intracellular signaling pathways, in this study we have evaluated the state of the JAK / STAT and therein the expression / activation of STAT3 protein in the tumor (HeLa) and endothelial (EA.hy926) cell lines subjected to physical and chemical hypoxia with

deferoxamine mesylate for 2, 6 and 24 hours. Additionally, considering the importance of hypoxia as a modifying agent in the response of cancer management using ionizing radiation; cell survival curves were constructed to assess the cellular behavior compared to these stimuli. This study highlights the importance of hypoxia as a stimulus which modifies the STAT3 protein activation and survival of cells irradiated in the two cell lines studied.

**Keywords:).** Tumor microenvironment, tumor hypoxia, endothelial cells, HeLa cells, JAK/STAT pathway, ionizing radiation, cell survival assay

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Marco Teórico</b> .....	<b>3</b>
1.1 Hipoxia y Cáncer .....	3
1.1.1 Epidemiología del Cáncer .....	3
1.1.2 Microambientes tumorales .....	5
1.1.3 Hipoxia Tumoral .....	7
1.1.4 Células endoteliales e hipoxia .....	9
1.2 Vías de señalización activadas por estrés hipóxico en cáncer .....	10
1.2.1 Vía de señalización HIF-1 .....	11
1.2.2 Vía JAK/STAT e hipoxia tumoral .....	13
1.3 Implicaciones terapéuticas de la hipoxia tumoral .....	18
1.3.1 Radioterapia e hipoxia en el manejo del cáncer .....	18
1.3.2 Física de las radiaciones ionizantes .....	21
1.3.3 Efectos de la radiación ionizante en el tejido vivo .....	24
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	<b>31</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>33</b>
3.1 General .....	33
3.2 Específicos .....	33
<b>4. Materiales y Métodos</b> .....	<b>35</b>
4.1 Cultivo de células .....	35
4.1.1 Descripción de líneas celulares .....	35
4.1.2 Cultivo y mantenimiento de las células .....	36
4.1.3 Criopreservación y descongelación de los cultivos celulares .....	37
4.2 Condiciones de hipoxia .....	37
4.2.1 Hipoxia Física .....	37
4.2.2 Hipoxia Química .....	38
4.3 Ensayo de citotoxicidad por MTT .....	38
4.4 Extracción de proteínas totales .....	39
4.5 Extracción de proteínas nucleares .....	40
4.6 Cuantificación de proteínas .....	40
4.7 Confirmación de las condiciones de hipoxia .....	41
4.8 Western Blotting .....	41
4.9 Inmunoprecipitación con proteína G-Sefarosa .....	43

4.10	Inmunocitoquímica con anticuerpos inmunofluorescentes .....	44
4.11	Construcción de curvas de supervivencia celular frente a radiaciones ionizantes .....	45
4.11.1	Verificación dosimétrica .....	45
4.11.2	Ensayo clonogénico de supervivencia celular .....	46
4.11.3	Fijación y tinción de colonias .....	49
4.11.4	Conteo de colonias .....	49
4.11.5	Construcción de curvas de supervivencia .....	51
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>53</b>
5.1	Confirmación de las condiciones de hipoxia .....	53
5.2	Citotoxicidad de las condiciones de hipoxia física y química .....	55
5.3	Las células HeLa y EA.hy926 expresan de manera constitutiva STAT3 .....	56
5.4	Las condiciones de hipoxia física y química no modifican la expresión de la proteína STAT3. ....	57
5.5	Las condiciones de hipoxia modifican la activación de STAT3 en las líneas HeLa y EA.hy926 .....	59
5.6	Construcción de las curvas de supervivencia: Obtención de parámetros $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha/\beta$ y D50.....	655
5.7	Curvas de supervivencia para líneas celulares HeLa y EA.hy926 en condiciones de normoxia, hipoxia física e hipoxia química .....	68
<b>6.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>777</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>877</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>899</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo 1: Datos de construcción de las figuras y análisis estadístico.....</b>	<b>1073</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo 2: Archivo para ajuste de las curvas .....</b>	<b>107</b>

# Lista de figuras

	Pág.
Figura 1—1: Incidencia y mortalidad por localización tumoral a nivel mundial.....	4
Figura 1—2: Incidencia y mortalidad por localización tumoral en Colombia. ....	5
Figura 1—3: Células del microambiente tumoral.....	7
Figura 1—4: Regulación de HIF-1 $\alpha$ .....	12
Figura 1—5: Ruta canónica de señalización JAK/STAT.....	15
Figura 1—6: Efectos de la radiación ionizante sobre la materia y sobre el tejido vivo ....	25
Figura 1—7: Curva de supervivencia celular tras la exposición a radiaciones ionizantes representada en escala lineal y logarítmica.....	28
Figura 4—1: Simulador físico de parafina .....	46
Figura 4—2: Disposición de sembrado en las cajas según dosis de radiación.....	48
Figura 4—3: Caja de cultivo de células expuestas a radiaciones ionizantes. ....	50
Figura 4—4: Conteo manual de colonias utilizando el software <i>ImageJ® Version 1.45s</i> .....	50
Figura 5—1: Activación de HIF-1 en células HeLa bajo condiciones de hipoxia física y química.....	54
Figura 5—2: Activación de HIF-1 en células EA.hy926 bajo condiciones de hipoxia física y química.....	54
Figura 5—3: Viabilidad celular normalizada por ensayo de MTT en células HeLa.....	55
Figura 5—4: Viabilidad celular normalizada por ensayo de MTT en células EA.hy926... ..	56
Figura 5—5: Expresión de STAT3 en células HeLa y EAhy926 en condiciones de normoxia.....	57
Figura 5—6: Expresión de STAT3 en líneas celulares HeLa y EAhy926 bajo diferentes concentraciones de hipoxia química. ....	57
Figura 5—7: Expresión de STAT3 en células HeLa expuestas por 2, 6 y 24 horas a hipoxia física o química con diferentes concentraciones de mesilato de deferoxamina (DFO).....	58
Figura 5—8: Expresión de STAT3 en células EA.hy926 expuestas por 2, 6 y 24 horas a hipoxia física o química con diferentes concentraciones de mesilato de deferoxamina (DFO). ....	58
Figura 5—9: Inmunodetección de (p)STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física.....	60

---

Figura 5—10:	Diferencia en la fosforilación de STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física con normalización de la expresión de STAT3.....	61
Figura 5—11:	Sublocalización celular de STAT3 en células HeLa tras la exposición a hipoxia física.....	61
Figura 5—12:	Sublocalización celular de STAT3 en células EAhy926 tras la exposición a hipoxia física.....	62
Figura 5—13:	Sublocalización celular de STAT3 en células HeLa tras la exposición a hipoxia química (DFO 100 $\mu$ M).....	63
Figura 5—14:	Sublocalización celular de STAT3 en células HeLa tras la exposición a hipoxia química (DFO 100 $\mu$ M).....	63
Figura 5—15:	Porcentaje de translocación nuclear de la proteína STAT3 en células HeLa y EA.hy926 tras la exposición a hipoxia física e hipoxia química.....	61
Figura 5—16:	Comparación del porcentaje de translocación nuclear de la proteína STAT3 tras la exposición a hipoxia física e hipoxia química entre las líneas HeLa y EA.hy926.....	61
Figura 5—17:	Media de supervivencia y desviación estándar de células HeLa irradiadas a diferentes dosis.....	66
Figura 5—18:	Ajuste modelo lineal cuadrático.....	666
Figura 5—19:	Componente $\alpha$ (Lineal) y componente $\beta$ (cuadrático).....	677
Figura 5—20:	Dosis letal 50 (D50).....	67
Figura 5—21:	Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células HeLa con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 6 MV.....	69
Figura 5—22:	Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células HeLa con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 15 MV.....	70
Figura 5—23:	Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células EA.hy926 con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 6 MV....	70
Figura 5—24:	Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células EA.hy926 con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 15 MV	711
Figura 5—25:	Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de normoxia en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 MV.....	722
Figura 5—26:	Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de normoxia en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 15 MV.....	72
Figura 5—27:	Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia física y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 MV.....	733
Figura 5—28:	Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia	

---

	física y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 15 MV .....	73
Figura 5—29:	Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia química y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 MV .....	744
Figura 5—30:	Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia química y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 15 MV .....	74



## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1—1: Mutaciones encontradas en miembros de la familia de quinasas Janus, y patología tumoral a la que se encuentran asociadas. ....	16
Tabla 1—2: Activación aberrante de proteínas de la familia STAT3 en tumores sólidos y hematológicos.....	17
Tabla 4—1: Dosis de radiación administradas a cada una de las líneas celulares para el ensayo de supervivencia clonogénico.....	47
Tabla 4—2: Número de células sembradas por dosis de radiación y línea celular ....	48
Tabla 4—3: Obtención de parámetros de eficiencia de sembrado y fracción de supervivencia de acuerdo a diferentes dosis de irradiación. ....	51
Tabla 5—1: Componente $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha/\beta$ , D50, para células HeLa irradiadas con fotones a 6 y 15 MV. ....	68
Tabla 5—2: Componente $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha/\beta$ , D50, para células EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 y 15 MV. ....	688



## Lista de ecuaciones

	<b>Pág.</b>
Ecuación 1—1: Unidades Gray .....	22
Ecuación 1—2: CentiGray .....	22
Ecuación 1—3: Electronvoltio. ....	23
Ecuación 1—4: Electronvoltio como unidad de energía. ....	23
Ecuación 1—5: Eficiencia de sembrado. ....	27
Ecuación 1—6: Fracción de supervivencia .....	27
Ecuación 1—7: Fracción de supervivencia .....	27
Ecuación 1—8: Modelo Lineal cuadrático. ....	29
Ecuación 1—9: Determinación del $D_0$ . ....	29
Ecuación 4—1: Determinación de la viabilidad celular por ensayo de MTT .....	39
Ecuación 4—2: Viabilidad celular por ensayo de MTT normalizada .....	22



## Introducción

El cáncer constituye uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial y una de las patologías de más difícil diagnóstico y tratamiento. A pesar de los grandes avances realizados en las últimas décadas en la comprensión y estudio de esta entidad, su control continúa siendo esquivo. Entre los factores que afectan el comportamiento biológico de las células cancerosas, los microambientes tumorales han cobrado gran interés y, específicamente la hipoxia tumoral junto con el reclutamiento y la formación de nuevos vasos sanguíneos. Uno de los mecanismos moleculares implicados de manera reciente en la respuesta celular frente a estímulos estresores, es la activación de vías de señalización intracelular y entre ellas, la vía JAK/STAT.

Uno de los objetivos del presente estudio fue el de evaluar el estado de expresión/activación de la vía de señalización JAK/STAT en células cancerosas y endoteliales sometidas a estrés hipóxico. Para ello se escogieron como modelos una línea tumoral de cérvix HeLa y una línea endotelial EA.hy926 y en ellas se estudió la respuesta al estrés hipóxico a través de la proteína STAT3. Las células fueron sometidas a condiciones de hipoxia física y química con mesilato de deferoxamina durante 2, 6 y 24 horas. Se comprobaron las condiciones de hipoxia mediante la activación del factor inducido por la hipoxia – 1 (HIF-1) y se analizó el efecto de estos agentes estresores sobre la viabilidad celular. Para determinar cambios en la expresión de la proteína STAT3 se realizó la extracción de proteínas totales en las diferentes condiciones de estímulo y se detectó por *western blotting* mediante el uso de anticuerpos específicos. Para determinar la activación de STAT3 se realizó inmunoprecipitación utilizando proteína G-sefarosa y anticuerpos dirigidos a proteínas con residuos de tirosinas fosforiladas, lo cual permitió su posterior detección por *western blotting*. Adicionalmente se realizó inmunofluorescencia indirecta para determinar localización subcelular de la proteína.

Nuestros resultados evidenciaron que la hipoxia física induce activación de la proteína STAT3 en células HeLa y EA.hy926, destacando la importancia de la vía JAK/STAT en respuesta a estímulos estresores en células tumorales y endoteliales.

El microambiente tumoral ha mostrado también ser importante para comprender y optimizar la respuesta a diversos tipos de manejo terapéutico. En radioterapia las condiciones de oxigenación tumoral, son consideradas un factor crítico a nivel de pronóstico y éxito frente a este manejo. A pesar de que durante la última década han sobrevenido grandes avances terapéuticos y experimentales, una gran parte de los fundamentos biológicos y químicos continúan por explorar.

Con este proyecto se buscó optimizar la técnica de exposición a radiaciones ionizantes en modelos celulares y estandarizar los procedimientos para la obtención de las curvas de supervivencia celular. Para ello, las células en cultivo fueron sometidas a condiciones de normoxia e hipoxia física y química durante 24 horas con posterior reoxigenación, tras lo cual se irradiaron utilizando un acelerador lineal de partículas para administrar diferentes dosis de radiación, fotones a 6 y 15 MV; posteriormente, las células fueron sembradas y cultivadas para permitir la formación de colonias las cuales se cuantificaron y a partir de los datos obtenidos, se construyeron las curvas de supervivencia celular empleando el modelo lineal cuadrático. El desarrollo de esta metodología se llevó a cabo en el marco de una alianza entre los grupos de investigación de Bio-Bio de la Universidad del Rosario y Física Médica de la Universidad Nacional de Colombia, con la colaboración de la Fundación Santa Fe de Bogotá, el centro de oncología de la Clínica el Country y el Instituto Nacional de Cancerología.

Los resultados permitieron la comparación de las curvas de supervivencia obtenidas, constituyendo un acercamiento al campo de la radiobiología con perspectivas a ampliar los resultados obtenidos y aportar nuevo conocimiento en la comprensión de los fenómenos biológicos asociados a los tratamientos con radiaciones ionizantes, que permita diseñar nuevas estrategias para su optimización.

# **1.Marco Teórico**

## **1.1 Hipoxia y Cáncer**

### **1.1.1 Epidemiología del Cáncer**

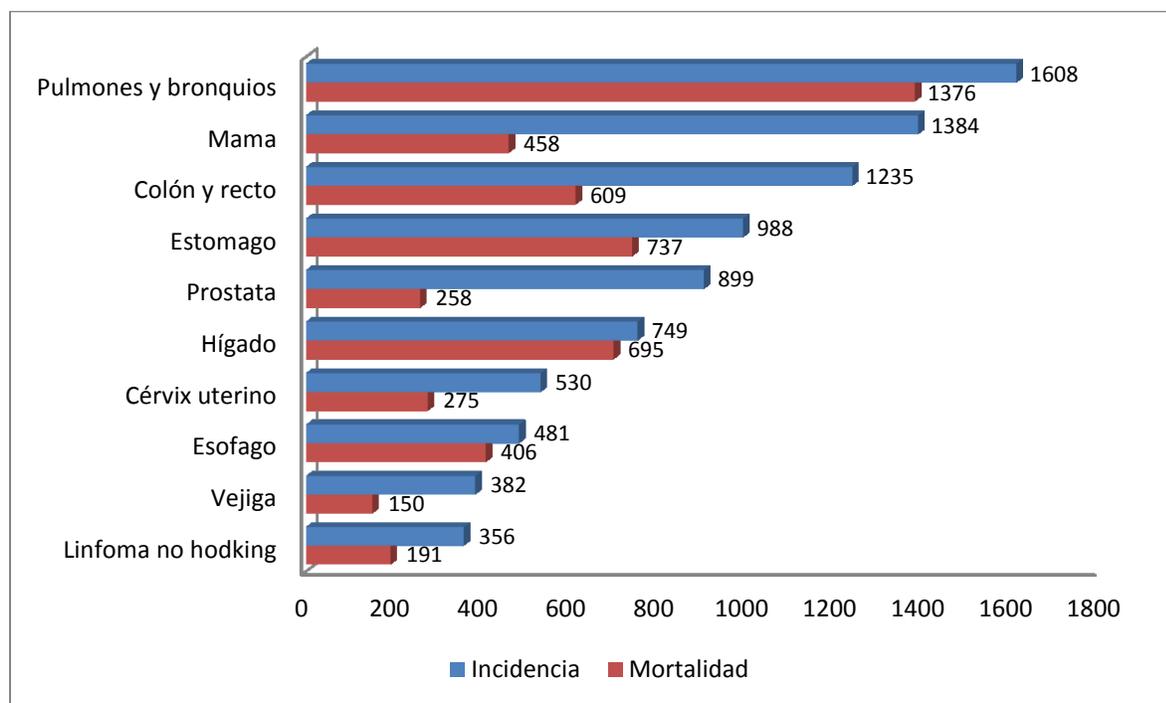
El cáncer es un importante problema de salud pública a nivel global y una de las principales causas de muerte tanto en países económicamente desarrollados como en vía de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) ocupa el tercer puesto entre todas las causas de muerte en el planeta y durante las últimas décadas la carga que representa a los sistemas de salud y la comunidad se ha incrementado en países en desarrollo como resultado del crecimiento y el envejecimiento de la población, así como de la adopción de estilos de vida asociados a cáncer<sup>1-3</sup>.

Según las estadísticas de GLOBOCAN 2008 elaboradas por la IARC (International Agency for Research in Cancer)<sup>4,5</sup>, se estimaron 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes durante 2008, con 56% del total de casos y 64% de las muertes en países económicamente en desarrollo. El cáncer de mama en mujeres y el cáncer de pulmón en hombres son los cánceres más frecuentemente diagnosticados y las principales causas de muerte tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo, a excepción del cáncer de pulmón el cual es precedido por el cáncer de próstata como uno de los más frecuentes en hombres en países en desarrollo. Estos tumores son seguidos por orden de frecuencia en mortalidad a nivel mundial por tumores de estómago e hígado en hombres y, cérvix y pulmón en mujeres en países en desarrollo, y por cáncer colorectal y de pulmón en mujeres y pulmón o próstata en hombres en países desarrollados.

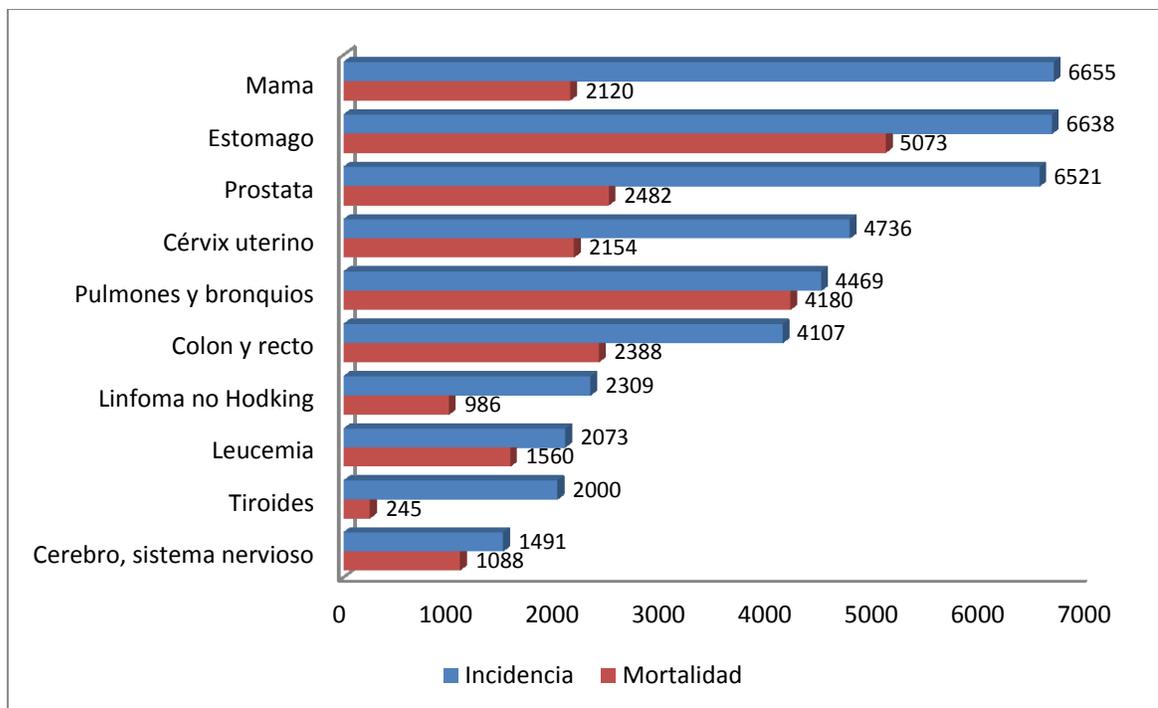
De acuerdo con las estadísticas de la Organización Panamericana de la Salud y el Instituto Nacional de Cancerología<sup>6,7</sup>, en Colombia la mortalidad por neoplasias malignas ha ido en aumento pasando de 27.051 muertes registradas en 2000 a 32.815 muertes

por neoplasias malignas durante el 2009 con una tasa de mortalidad durante el 2009 de 76.5 por cada 100.000 habitantes. La principal causa de muerte por tumores malignos en hombres es el cáncer de estómago seguido por cáncer de próstata, tráquea, bronquios y pulmón y colon, recto y ano en orden decreciente; en mujeres es el cáncer de mama seguido por el cáncer de cuello de útero, estómago y tráquea, bronquios y pulmón. Los datos de incidencia durante 2008 reportaron 58.534 nuevos casos de cáncer con una tasa de incidencia de 150.2 casos por cada 100.000 habitantes siendo los tumores más frecuentes en hombres el cáncer de próstata, seguido por estómago, tráquea, bronquios, pulmón y colon, recto y ano; en mujeres, el cáncer de mama seguido por el de cérvix, estómago y colon, recto y ano.

Se muestra a continuación la incidencia y mortalidad de cáncer para los tipos de tumores más comunes a nivel mundial y para Colombia (**Figura 1-1** y **Figura 1-2**).



**Figura 1—1:** Incidencia y mortalidad por localización tumoral a nivel mundial. Valores en miles. Adaptado de: Jemal A *et al.* 2011<sup>5</sup>.



**Figura 1—2:** Incidencia y mortalidad por localización tumoral en Colombia. Adaptado de estadísticas GLOBOCAN 2008<sup>4</sup>.

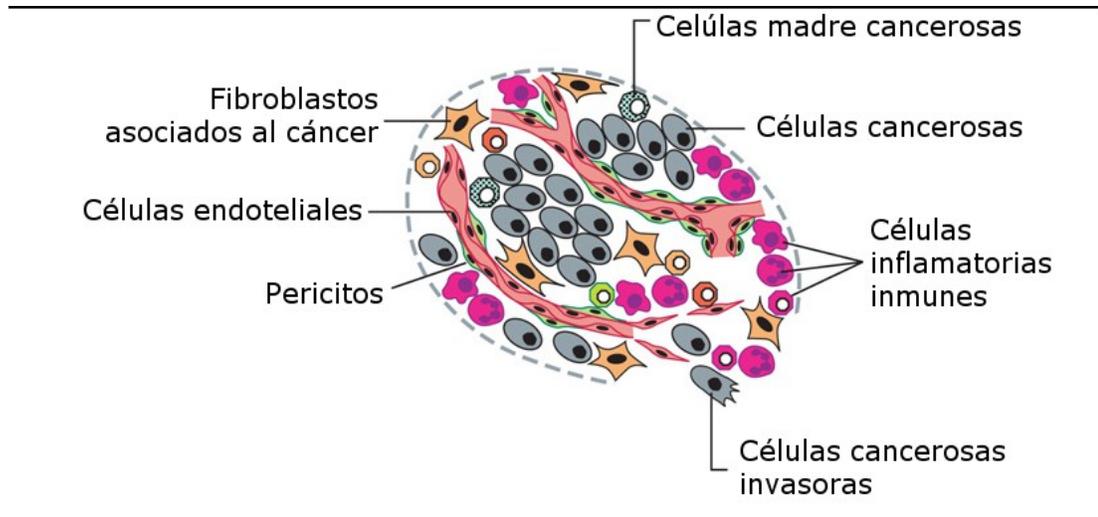
### 1.1.2 Microambientes tumorales

La conquista del cáncer continúa siendo un gran reto para la ciencia médica. A pesar de los grandes avances realizados en las últimas décadas en la comprensión y estudio de esta entidad, su control continúa siendo esquivo<sup>8</sup>. Esto se debe en gran medida a que el cáncer es una enfermedad notablemente compleja en la que existen un gran número de rutas moleculares y celulares alteradas que se traducen en múltiples fenotipos, agrupados dentro de una misma entidad<sup>9</sup>. El entendimiento de los mecanismos bioquímicos y genéticos por el cual los tumores se desarrollan es considerado actualmente una herramienta fundamental para detectar, clasificar, monitorear y tratar este tipo de enfermedades. Así lo demuestran nuevos métodos de diagnóstico y medicamentos basados en moléculas que inhiben o revierten su crecimiento<sup>10</sup>.

El comportamiento biológico de las células cancerosas ha sido asociado a mutaciones subyacentes y a múltiples alteraciones en las rutas de señalización que gobiernan el ciclo celular, el crecimiento celular, la muerte celular programada, la longevidad, la motilidad, la apoptosis y la integridad nuclear<sup>11</sup>. Adicionalmente a las características fisiológicas

intrínsecas de las células cancerosas, el microambiente es reconocido como un componente crítico para comprender el proceso de tumorigénesis y así mismo puede constituir un potencial blanco para atacar esta patología<sup>12</sup>. Diversas investigaciones han permitido agrupar propiedades comunes a todos los tipos tumorales denominadas marcas del cáncer, estas incluyen la adquisición de señales de autosuficiencia, la capacidad para la proliferación extendida, la resistencia a las señales de crecimiento inhibitorias, la capacidad para evadir señales de muerte, el potencial para inducir invasión y metástasis, la capacidad para inducir la formación de vasos sanguíneos y las recientemente descritas características emergentes y activantes<sup>11,13</sup>. Algunas de estas características son propiedades de las células cancerígenas *per se*, pero otras dependen de la comunicación entre las células cancerosas y sus ambientes macromoleculares y celulares. Cada propiedad puede constituir una vulnerabilidad en un tumor, y por lo tanto ser explotada por nuevas terapias especialmente cuando las mutaciones subyacentes y las rutas de señalización son conocidas.

El tejido tumoral no solo está constituido por células tumorales, existe un complejo entramado de células asociadas no tumorales y condiciones ambientales que cumplen funciones críticas para el desarrollo del fenotipo tumoral. Dentro de este microambiente se encuentran células asociadas al tumor como fibroblastos del estroma, adipocitos, células del sistema inmune como macrófagos, neutrófilos y células que constituyen vasos sanguíneos entre otras (**Figura 1-3**). Existen además otros factores biológicos, químicos y físicos como moléculas de la matriz extracelular, y condiciones ambientales de oxigenación, presión intersticial y pH, que afectan el comportamiento tumoral<sup>14</sup>.



**Figura 1—3:** Células del microambiente tumoral.

Distintos tipos de células constituyen los tumores sólidos. El parénquima y el estroma del tejido tumoral están constituidos por diferentes tipos y subtipos de células que de manera colectiva permiten el crecimiento y progresión tumoral. Adaptado de *Hanahan et al.*<sup>13</sup>

Aunque las células tumorales escapan a muchas de las funciones de regulación normal y en su microambiente a menudo existen condiciones anormales, las células no-tumorales y los productos que constituyen su microambiente continúan regulando en gran medida su fenotipo<sup>15</sup>. Las células del microambiente pueden regular su funcionamiento por medio de la interacción directa, o secretando moléculas reguladoras como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que estimulan o inhiben procesos de proliferación y de diferenciación<sup>16</sup>.

### 1.1.3 Hipoxia Tumoral

Uno de los factores críticos que afectan tanto a células tumorales como adyacentes al tumor, son las concentraciones de oxígeno tisulares<sup>17</sup>. Dado que un número limitado de células pueden recibir un aporte por difusión directa a partir de un vaso sanguíneo, 60-100  $\mu\text{m}$  alrededor de un vaso, las células restantes requieren de una fuente diferente o sufren condiciones de estrés metabólico como hipoxia y falta de nutrientes. La distribución de las áreas de hipoxia es heterogénea al interior del tumor. Diversos estudios sugieren que el 50 – 60% de los tumores sólidos en estadios avanzados muestran extensas áreas de hipoxia/anoxia distribuidas de manera heterogénea dentro del tumor<sup>18</sup>.

Las áreas hipóxicas son producto de un desequilibrio entre la entrega y el consumo de oxígeno. En tejido tumoral la tasa de consumo de oxígeno de células neoplásicas y estromales sobrepasa el aporte ya limitado, resultando en áreas con concentraciones de oxígeno muy bajas. Varios mecanismos han sido involucrados en este proceso, entre ellos cabe mencionar, las severas anormalidades funcionales y estructurales del tejido vascular, el deterioro en la geometría de difusión producto del rápido crecimiento de las células neoplásicas y las altas demandas metabólicas y energéticas características de este tipo de células<sup>19</sup>.

Las células tumorales se encuentran en un *continuum* de concentraciones de oxígeno, que puede ir desde las concentraciones más altas alrededor de los capilares sanguíneos hasta condiciones cercanas a la anoxia en sitios distantes a los capilares. Aunque se asume de manera tradicional que la tensión de oxígeno en la mayoría de tejidos es similar a la de la sangre venosa (20-40 mm Hg), observaciones demuestran que la tensión de oxígeno puede variar ampliamente en condiciones fisiológicas en un rango de 1 – 40 mm Hg. En tejidos bajo condiciones fisiológicas y en células tumorales se ha encontrado que alteraciones en la expresión génica y proteica pueden ser causadas por concentraciones de oxígeno menores del 5%, consideradas hipóxicas<sup>20,21</sup>.

Es importante reconocer que las condiciones de hipoxia al interior del tumor son resultado de dos mecanismos diferentes. La hipoxia crónica es producto de la distancia de difusión limitada desde la fuente de oxígeno a las células que lo requieren. En contraste, la hipoxia aguda es resultado de la interrupción temporal del aporte sanguíneo causada usualmente por vasos estructural y morfológicamente anormales. Ambos procesos han sido implicados en la progresión de procesos malignos y en las características fenotípicas tumorales<sup>22</sup>.

El efecto de condiciones de hipoxia crónica produce un patrón de distribución de la oxigenación acorde a la tasa de difusión del oxígeno, mientras que la hipoxia aguda produce un patrón intermitente o cíclico. En la hipoxia intermitente la oxigenación es tiempo dependiente ya que las células en un momento determinado pueden encontrarse con concentraciones de oxígeno normales, posteriormente hipóxicas y luego re-oxigenarse. Pruebas experimentales que utilizan marcadores de hipoxia muestran que la hipoxia aguda/intermitente es ubicua en tumores humanos y en modelos experimentales,

encontrándose que el 8 – 20 % de las células tumorales experimentan este tipo de hipoxia<sup>23</sup>. La frecuencia de los ciclos hipoxia re-oxigenación puede variar desde minutos a varias horas. Esta fluctuación temporal continúa siendo motivo de intensa investigación, ya que ha mostrado tener un impacto en la respuesta biológica a diferentes formas de terapia<sup>24,25</sup>.

### 1.1.4 Células endoteliales e hipoxia

La microvasculatura es esencial para el crecimiento tumoral y ha sido considerada de igual manera un proceso crítico en el desarrollo de procesos malignos<sup>26</sup>. El crecimiento del tejido tumoral está estrechamente vinculado con la habilidad para asegurar una adecuada irrigación sanguínea que aporte nutrientes y oxígeno para su crecimiento y demandas metabólicas. En tejidos normales, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos está estrechamente coordinado por un balance entre moléculas pro-angiogénicas y anti-angiogénicas. Las aberraciones en el crecimiento de vasos sanguíneos están asociadas a un gran número de condiciones patológicas y en particular a la formación, progresión e invasión en patologías tumorales<sup>27</sup>.

Se han propuesto varios mecanismos que explican la continua formación de redes vasculares en el tejido tumoral<sup>28</sup>. Entre estos encontramos la angiogénesis por proliferación endotelial a partir de vasos preexistentes, la vasculogénesis o formación *de novo* de vasos sanguíneos a través de la incorporación de células precursoras endoteliales circulantes, la co-opción o asimilación de vasos existentes para suplir al tumor, la intususcepción o incorporación de células endoteliales provenientes del tumor al lumen de vasos existentes y la formación de canales pseudovasculares por células tumorales también denominado “mimetismo vascular”. Todos estos mecanismos conducen a una vasculatura tumoral caracterizada por una fuerte proliferación, pero al mismo tiempo inmadura, estructuralmente alterada y en términos funcionales altamente ineficaz, lo que se traduce de manera directa en un flujo sanguíneo caótico y heterogéneo<sup>29</sup>.

Los tumores adquieren la habilidad para favorecer el crecimiento de redes vasculares que suplen sus demandas alterando el equilibrio entre factores pro- y anti angiogénicos. Fundamentalmente, los tumores sobre-regulan la producción de proteínas pro-

angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina, moléculas de la familia de factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), neurofilina, Robo y Efrina A/B (EPH-A/B) que sub-regulan la producción de proteínas anti-angiogénicas como la trombospondina-1, produciendo como resultado final un ambiente favorable para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, también denominado “*switch* angiogénico”<sup>30,31</sup>.

Otro de los mecanismos moleculares implicado en el crecimiento y regulación vascular es la activación a nivel endotelial de receptores de tirosina quinasa por factores de crecimiento polipeptídicos. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y efrinas, han mostrado modular la angiogénesis, sugiriendo que la señalización por múltiples receptores es necesaria para la modulación del crecimiento de los vasos sanguíneos<sup>32</sup>.

## **1.2 Vías de señalización activadas por estrés hipóxico en cáncer**

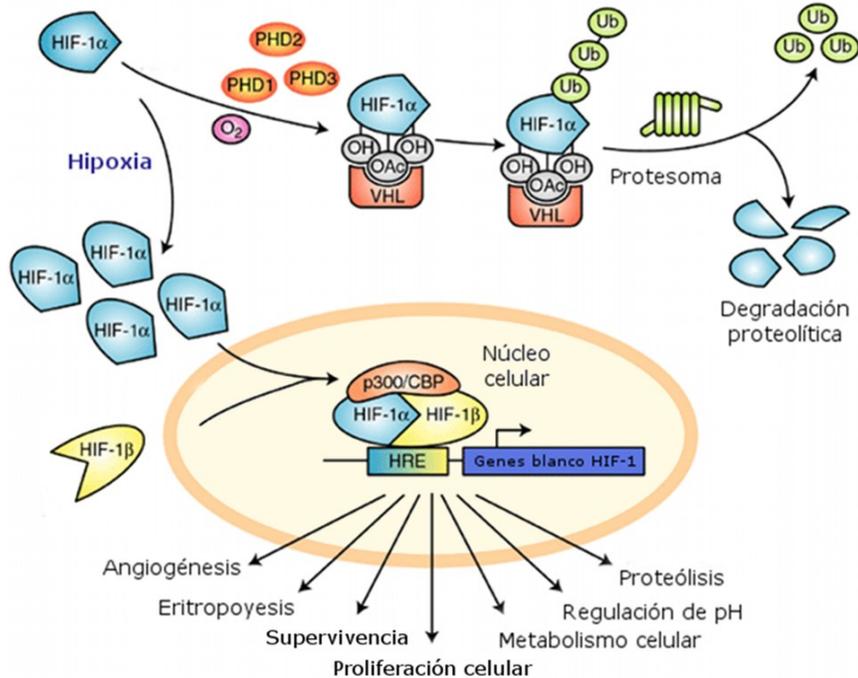
Ante el estrés que representa para las células cancerosas las bajas concentraciones de oxígeno, estas tienen mecanismos de respuesta que incluyen un amplio número de rutas de señalización que modulan la expresión génica y producen cambios a este nivel. Estas modificaciones resultan en cambios en el transcriptoma y proteoma que conducen a alteraciones en la cinética de proliferación, cambios en el metabolismo celular, incremento de actividad de enzimas relacionadas con el metabolismo oxidativo e incremento de la actividad transcripcional. Entre estas proteínas se incluyen transportadores de glucosa, proteínas relacionadas con la reparación del ADN, factores de crecimiento y proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis, la diferenciación, la proliferación y la invasividad tumoral<sup>33</sup>. En este estudio profundizamos en la vía de señalización del factor inducido por lo hipoxia 1 (HIF-1) y la vía JAK/STAT.

### **1.2.1 Vía de señalización HIF-1**

Muchos de los procesos celulares inducidos por la hipoxia son controlados por el factor inducido por la hipoxia (HIF-1), incluyendo la angiogénesis, el metabolismo glicolítico, la

eritropoyesis y la invasividad del tumor<sup>34,35</sup>. El HIF-1 es un factor de transcripción heterodimérico perteneciente a la familia de proteínas con dominio *basic-helix-loop-helix* (bHLH), constituido por una subunidad estable HIF-1 $\beta$  y una de tres subunidades reguladas por oxígeno (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ). La activación de HIF-1 es un proceso secuencial que involucra principalmente la estabilización de HIF- $\alpha$ , su heterodimerización con HIF-1 $\beta$ , su translocación nuclear y su interacción con otras proteínas (**Figura 1-4**). En el núcleo, HIF-1 se une a los elementos de respuesta a la hipoxia (*Hypoxia-response elements*, HRE) en las regiones promotoras de los genes involucrados en esta vía. Se ha demostrado que HIF-1 es activado por debajo de un punto de corte de 5% de oxígeno y su concentración se ve progresivamente aumentada hasta concentraciones de 0.1 – 0.2% de oxígeno, regulando la expresión génica de más de 100 genes encargados de proteger a las células del estrés hipóxico<sup>36,37</sup>.

HIF-1 censa las variaciones de oxígeno de manera indirecta a través de dos tipos de sensores de oxígeno que lo regulan. El primero, corresponde a proteínas con dominio prolil-hidroxilasa (*Prolyl hydroxylase domain*, PHD) que modifican dos residuos (P402 y/o P564) sobre HIF-1 $\alpha$  en el dominio de degradación dependiente de oxígeno (*oxygen-dependent degradation domain*, ODDD); el HIF modificado interacciona con la proteína supresora tumoral von Hippel Lindau (VHL), un componente del complejo ubiquitin-proteosoma, causando en condiciones de normoxia su degradación. El segundo, es una asparaginil-hidroxilasa, denominada factor inhibidor de HIF-1 (*Factor Inhibiting HIF-1*, FIH), que actúa a nivel del residuo N803 en el dominio de activación transcripcional del carboxilo terminal (*Carboxy-terminal transcriptional activation domain* C-TAD), modificando su unión con varios co-activadores como P300 y CBP (*CREB-Binding Protein*). Se ha postulado que la especificidad y la diversidad transcripcional en respuesta a la hipoxia se deben en gran medida a la estrecha regulación de cada uno de estos procesos junto con otras modificaciones postraduccionales como acetilación (OAc) y fosforilación<sup>38,39</sup>.



**Figura 1—4:** Regulación de HIF-1 $\alpha$ .

En condiciones de normoxia HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado por prolin-hidroxilasas y reconocido por pVHL, la cual realiza el marcaje por ubiquitinización para su posterior degradación por el sistema de proteosoma. La acetilación (OAc) de HIF-1 $\alpha$  también promueve su unión con pVHL. En respuesta a la hipoxia, se inhibe la hidroxilación de las prolinas lo cual conduce a su acumulación y translocación al núcleo en donde se dimeriza con HIF-1 $\beta$ . El complejo activo junto con otros co-activadores como p300 y CBP (CREB-BindingProtein) reconoce a los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE), en la región promotora de un gran número de genes blanco involucrados en la respuesta celular frente a hipoxia. Adaptada de *Carroll et al*<sup>40</sup>.

La contribución de HIF-1 al crecimiento tumoral ha sido ampliamente demostrada. La delección génica en células embrionarias de ratón demostró que la pérdida de HIF-1 $\alpha$ , resulta en reducción de la masa tumoral e incremento de la apoptosis en células tumorales de teratocarcinomas<sup>41</sup>. Por otra parte, experimentos en los que se utilizaron modelos de xenoinjertos subcutáneos en ratones mostraron el papel central de HIF-1 en la angiogénesis y el crecimiento tumoral<sup>42,43</sup>.

Un interesante estudio realizado en el 2004 por Tang *et al*, aportó información adicional al demostrar que HIF-1 promueve el crecimiento tumoral mediante la regulación de la función de las células endoteliales<sup>44</sup>, de hecho, se conoce que múltiples genes blanco de HIF-1 modulan la angiogénesis al promover los procesos mitogénicos y de migración de las células endoteliales constituyendo uno de los ejemplos más representativos la

activación directa de la transcripción del gen *VEGF*, por medio de su unión en su región promotora a un HRE<sup>45</sup>. Experimentos *in vitro* han mostrado adicionalmente una correlación entre la hipoxia y otros factores angiogénicos como angiopoyetina 1 (ANGPT1), angiopoyetina 2 (ANGPT2), factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), interleuquina 8 (IL-8), EGF, factor transformador del crecimiento  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), factor transformador del crecimiento  $\beta$ 2 (TGF $\beta$ 2) y proteína inducida por el interferón gamma (IP-10)<sup>46,47</sup>. Se ha descrito adicionalmente un gran número de oncoproteínas moduladas por la hipoxia que actúan como factores angiogénicos, de manera tanto dependiente como independiente de HIF-1<sup>48</sup>. Entre ellas se han descrito varias moléculas como FGF, PDGF y el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B)<sup>49-52</sup>. Estas moléculas comparten la característica común de activar o participar en rutas de señalización intracelulares y han permitido identificar la existencia de efectos sinérgicos entre oncoproteínas e hipoxia sobre la angiogénesis y el crecimiento tumoral.

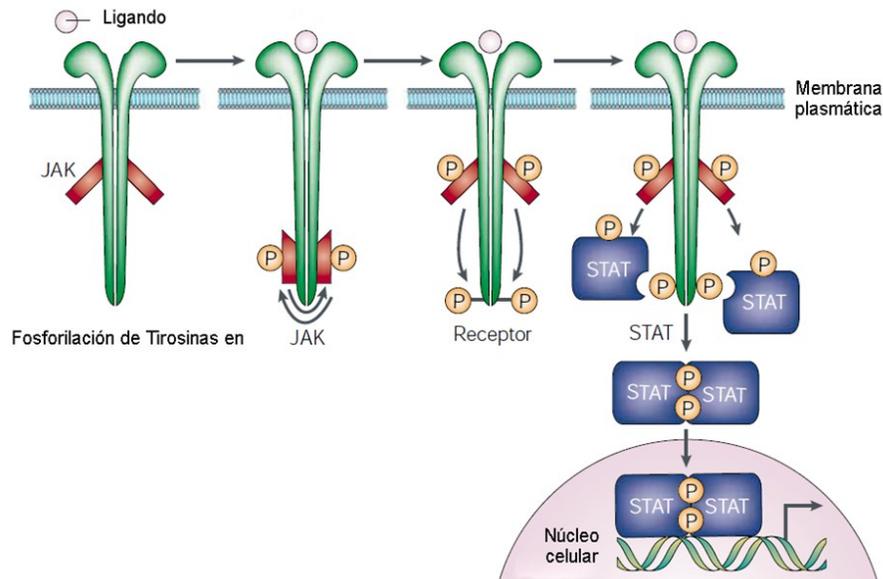
Aunque la mayoría de la investigación en hipoxia se ha centrado en la vía activada por HIF-1, existen otros factores de transcripción activados por condiciones de hipoxia por vías independientes a HIF<sup>53</sup>, como es el caso de la inducción de la proteína inhibidora de la apoptosis por hipoxia (IAP-2) asociada a modificaciones en la transcripción por la proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (CREB). Por otra parte, el aumento en la expresión de ciclooxigenasa – 2 (COX-2) ha sido vinculada con NF- $\kappa$ B en hipoxia<sup>54</sup> y del factor de crecimiento placentario (PIGF), un ligando de VEGFR inducido por el factor de transcripción activado por la hipoxia (metal-transcriptionfactor-1). De manera adicional a estas vías existe un interés creciente en el estudio de otras rutas de señalización celular alteradas en procesos de estrés celular y tumorales, entre estas y dada la importancia en la progresión oncogénica cabe resaltar a la vía JAK/STAT.

### **1.2.2 Vía JAK/STAT e hipoxia tumoral**

Las disfunciones en la señalización intracelular como activación o inactivación aberrante de rutas de transducción de señales se han encontrado en varias patologías humanas incluyendo el cáncer. Se considera que alteraciones en la vía de señalización JAK/STAT, una ruta de transducción de señales intra-citoplasmática que permite a partir de un estímulo externo producir una respuesta celular por medio de un cambio en la expresión

génica<sup>55</sup>, pueden ser encontradas en tumores malignos ya sea como un evento inicial o como una alteración subsecuente que conduce a la amplificación y selección clonal<sup>56</sup>. Se ha encontrado adicionalmente que la adquisición de independencia a estímulos externos dentro de las células tumorales o la sobreproducción de tipos celulares que de manera fisiológica requieren citoquinas para proliferar como es el caso de las células endoteliales, se relaciona con la angiogénesis, la capacidad de invasión y la señalización proliferativa autosostenida, características fundamentales del desarrollo tumoral<sup>57</sup>.

Existen dos familias de proteínas implicadas en esta vía: las quinasas Janus (*Janus Kinase*, JAKs) conformadas por cuatro proteínas de la familia de tirosina quinasas citosólicas y la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (*Signal Transducer and Activator Transcription*, STATs), conformada por 7 proteínas en humanos<sup>58</sup>. La activación por la vía canónica (**Figura 1-5**) se inicia cuando un estímulo externo activa un receptor en la membrana celular y produce los cambios conformacionales a nivel del receptor activando una o varias JAKs para transfosforilar y activar otras proteínas JAK con la consecuente fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citosólico del receptor. Las tirosinas fosforiladas en el receptor y en la proteína JAK reclutan varios sustratos de señalización, entre ellos miembros de la familia STAT. Continuando la fosforilación mediada por JAK, las proteínas STAT se dimerizan y translocan al núcleo en donde regulan la expresión génica actuando como factores de transcripción fundamentales para la formación, supervivencia, diferenciación y proliferación de varios tipos de células<sup>59</sup>.



**Figura 1—5:** Ruta canónica de señalización JAK/STAT.

La interacción entre un receptor de citoquinas y un ligando produce la fosforilación secuencial de tirosinas. La dimerización del receptor permite la transfosforilación y activación de las quinasas Janus. Esto es seguido por la fosforilación del extremo intracitoplasmático del receptor y el reclutamiento de las proteínas STAT, permitiendo la fosforilación y dimerización de las formas activas que se translocan a núcleo y actúan como factores de transcripción. Adaptada de Levy *et al*<sup>60</sup>.

La ruta de señalización JAK/STAT es esencial para un gran número de procesos del desarrollo embrionario y homeostáticos durante la vida adulta entre los que se incluye la hematopoyesis, el desarrollo del sistema inmune, el mantenimiento de células madre, el crecimiento corporal y el desarrollo de las glándulas mamarias<sup>58</sup>. Diferentes proteínas JAKs y STATs son reclutadas de acuerdo al tipo de tejido y al receptor relacionado con el evento de señalización dando especificidad a la respuesta por medio de esta vía. Las quinasas Janus y las proteínas STAT son expresadas de manera constitutiva en la pared vascular transfiriendo los eventos de señalización de varias familias de receptores y ligandos entre los que se incluyen citoquinas, factores de crecimiento y péptidos vaso activos como angiotensina - II y endotelina<sup>61</sup>. Además de la vía canónica existen diferentes componentes que regulan o son regulados por otras vías de señalización. Adicionalmente se ha encontrado que la activación no canónica de JAK y STAT afectada por diferentes factores influencia el estado transcripcional global a través de la modificación de la estructura de la cromatina<sup>56</sup>.

Mientras que para proteínas de la familia Janus se han encontrado un gran número de mutaciones asociadas a patologías tumorales principalmente de origen hematológico (**Tabla 1-1**), no ocurre lo mismo con miembros de la familia STAT, los cuales se encuentran activos de manera aberrante mas no mutado, en tumores sólidos y hematológicos (**Tabla 1-2**). Las proteínas JAK mutadas se han asociado a la activación de proteínas STAT como STAT3 y STAT5, las cuales tienen un papel como oncoproteínas actuando no solo a nivel de la expresión génica sino interactuando directamente sobre otras rutas de señalización celular<sup>62</sup>. La activación constitutiva de las proteínas STAT independiente de mutaciones ha sido encontrada en varios cánceres humanos tanto tumores hematológicos como sólidos<sup>63,64</sup>. El papel de los STAT en la oncogénesis involucra la regulación de genes que codifican proteínas antiapoptóticas, reguladores del ciclo celular e inductores de la angiogénesis<sup>65</sup>.

**Tabla 1—1:** Mutaciones encontradas en miembros de la familia de quinasas Janus, y patología tumoral a la que se encuentran asociadas<sup>56,60,62</sup>.

Quinasa Janus (JAK)	Sustitución aminoacídica	Enfermedad asociada
JAK1 ( <i>H. sapiens</i> )	G871E	Leiomiomas uterinos
JAK2 ( <i>H. sapiens</i> )	V617F	Enfermedades mieloproliferativas
	K539L (y mutaciones en la región F537-E543)	Policitemia vera
	T875N	Leucemia mieloide megacarioblástica aguda
	Deleción en el dominio pseudoquinasa JH2 (682-686)	Leucemia linfoblástica aguda
JAK3 ( <i>H. sapiens</i> )	A572V	Leucemia mieloide megacarioblástica aguda
	V722I	Leucemia mieloide megacarioblástica aguda
	P132T	Leucemia mieloide megacarioblástica aguda

**Tabla 1—2:** Activación aberrante de proteínas de la familia STAT3 en tumores sólidos y hematológicos<sup>66-68</sup>.

Tipo de tumor	STAT activado
---------------	---------------

<b>Tumores sanguíneos</b>	
Mieloma múltiple	STAT1, STAT3
Leucemias:	
Dependientes de HTLV-1	STAT3, STAT5
Eritroleucemia	STAT1, STAT5
Leucemia mielógena aguda	STAT1, STAT3, STAT5
Leucemia mielógenacronica	STAT5
Leucemia linfocítica granular grande	STAT3
Linfomas:	
Burkitt-relacionado con EBV	STAT3
Micosis fungoides	STAT3
Linfoma de células-T cutáneo	STAT3
Linfoma no Hodking	STAT3
Linfoma de células grandes anaplásico	STAT3
<b>Tumores sólidos</b>	
Cáncer de mama	STAT1, STAT3, STAT5
Cáncer de cabeza y cuello	STAT1, STAT3, STAT5
Cáncer de cuello del útero	STAT3, STAT5
Melanoma	STAT3
Cáncer de ovario	STAT3
Cáncer de pulmón	STAT3
Cáncer pancreático	STAT3
Cáncer de próstata	STAT3
Cáncer de colon	STAT3

Diversos factores estresores se han relacionado con la activación de esta vía de forma no canónica, entre ellos el estrés mecánico, oxidativo, así como varias moléculas de señalización<sup>61</sup>. Varios estudios han identificado que las condiciones de hipoxia en varias líneas tumorales puede asociarse a la estimulación de la vía JAK/STAT pudiendo ser un factor crítico para mantener el desarrollo, supervivencia y expansión de las células malignas<sup>64,65,69</sup>.

En comparación con otras vías de señalización oncogénica por receptores tirosina quinasa como las proteínas MAPK (*Mitogen-activated protein (MAP) kinases*), el papel de la ruta JAK/STAT en cáncer y más aún en condiciones hipóxicas no ha sido ampliamente

explorada y los factores que conducen a la activación aberrante de esta vía resultan de gran interés en la comprensión del proceso de oncogénesis y desarrollo tumoral.

### **1.3 Implicaciones terapéuticas de la hipoxia tumoral**

La importancia de la hipoxia en el tejido tumoral no se limita a la comprensión de la fisiopatología de esta entidad. Actualmente es considerada un blanco crítico para optimizar la respuesta al tratamiento y una potencial vulnerabilidad a ser explotada por las diferentes opciones terapéuticas<sup>37</sup>.

El tipo de manejo en un paciente con cáncer es individualizado y depende tanto de las condiciones del paciente como del tipo de tumor, sus características biológicas y el estadio en el que este se encuentre<sup>70,71</sup>. Existen varias formas de tratamiento entre las que encontramos manejo quirúrgico, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal y molecular o una combinación de estas. Uno de los tipos de terapia más ampliamente utilizados es la radioterapia. Se exponen a continuación los fundamentos y puntos críticos de este tipo de terapia y su relación con la hipoxia tumoral.

#### **1.3.1 Radioterapia e hipoxia en el manejo del cáncer**

La radioterapia es una parte esencial en el manejo de casi todos los tipos de cáncer, ya que representa una opción de cura de manera individual o combinada con otro tipo de manejo como cirugía o quimioterapia y además puede servir de manera paliativa en muchos tumores incurables<sup>72</sup>. Según diversos estudios el uso de radioterapia tanto en países desarrollados como en desarrollo se estima en cerca del 50 – 60 % del total de nuevos casos, convirtiéndose en el tipo de terapia de mayor elección puesto que ofrece la mejor opción de cura y de control local de tumor, la opción con menores efectos adversos o una combinación de estos<sup>72,73</sup>. De manera adicional, la indicación de radioterapia en países económicamente en desarrollo se estima más alta que en países desarrollados a causa de las diferencias demográficas en los tipos de cáncer y los estadios en los que estos son diagnosticados<sup>74-76</sup>.

El manejo por radioterapia implica el uso de radiaciones ionizantes para tratar enfermedades malignas y benignas, con el fin de erradicar un volumen tumoral determinado sin dañar los tejidos sanos adyacentes, mejorando así la calidad de vida del paciente<sup>77</sup>. La radiación ionizante ha sido utilizada por más de un siglo para el tratamiento del cáncer. Debido a la importancia que ha tenido la radioterapia como opción terapéutica en el manejo del cáncer, la intensa búsqueda de agentes químicos y físicos que influyan en la respuesta celular frente a radiaciones ionizantes, ha sido un motivo de intensa investigación.

Entre los factores físico-químicos que han mostrado mayor relevancia en la respuesta celular a los tratamientos contra el cáncer está el oxígeno y como mencionan Hall y Giaccia “Ninguno es más simple, tiene un efecto tan dramático y unas implicaciones terapéuticas tan obvias como el oxígeno”<sup>78</sup>. De hecho, los efectos radiosensibilizadores del oxígeno fueron observados desde 1912 por Swartz, quien notó que la reacción producida en la piel por un aplicador de radio (Ra) se reducía de manera considerable si el aplicador se presionaba de manera fuerte en la piel, atribuyendo el efecto a la interrupción en el flujo sanguíneo<sup>77</sup>. Posteriormente desde los años 30, Mottram<sup>79</sup> realizó varios experimentos analizando el efecto de la oxigenación sobre tumores irradiados, estudios que culminaron posteriormente en la cuantificación de los efectos del oxígeno por sus colegas Louis Harold Gray y Thomlinson en 1955<sup>80</sup>. Ellos propusieron que los niveles de oxígeno disminuían en un tumor sólido en forma de capas alrededor de los vasos sanguíneos y que estas células tumorales tras la exposición a radiación ionizante continuaban siendo viables contribuyendo así a la radioresistencia. Experimentos posteriores demostraron que al comparar la radiosensibilidad de células tumorales en cultivo en condiciones de normoxia y de hipoxia, se requería una mayor dosis de radiación sobre las células hipóxicas para alcanzar el mismo efecto biológico, al que se denominó ratio de mejoramiento del oxígeno (Oxygen enhancement ratio, OER). Diversos estudios muestran que las células oxigenadas son 2.5 – 3 veces más radiosensibles que las células hipóxicas a altas dosis de radiación<sup>81</sup>.

Los efectos de las condiciones de oxigenación sobre células irradiadas se han asociado a la producción de radicales libres ya que el daño producido por estos sobre el ADN es más susceptible a reparación en ausencia de oxígeno molecular<sup>81</sup>. Debido a que si existe oxígeno disponible este o sus productos pueden reaccionar con los extremos rotos del

ADN, formando peróxidos orgánicos estables y extendiendo el daño, es más difícil para la célula reparar de manera eficiente los daños en condiciones normóxicas. Adicionalmente a los mecanismos radioquímicos directos descritos, la hipoxia es un poderoso estímulo para procesos biológicos críticos que afectan la respuesta a la radioterapia. Esta consideración dificulta la asociación directa establecida entre hipoxia y radioresistencia, obligando a considerar otros efectos que pueden modificar la respuesta tumoral a las radiaciones ionizantes. En los experimentos de Shrieve y Harris<sup>82</sup> en los que se modificaron parámetros de exposición, se demostró que la respuesta celular medida como supervivencia, se modifica en función del tiempo de exposición a hipoxia y la concentración de oxígeno al momento de la irradiación, sugiriendo que el contexto biológico celular previo a la exposición tiene efectos adicionales a los clásicamente descritos.

Los efectos biológicos de las condiciones de hipoxia sobre la producción de radicales libres de oxígeno son controversiales, mientras algunos estudios muestran que de manera aguda se puede encontrar disminución de estos, principalmente debido a bajos niveles del sustrato ( $O_2$ ), a largo plazo en hipoxia crónica o intermitente, puede haber un aumento<sup>83,84</sup>. La respuesta antioxidante así mismo se ve modificada por las condiciones de oxigenación, mientras de manera aguda se ha encontrado una disminución de enzimas involucradas en la respuesta antioxidante como catalasa y glutatión peroxidasa, en hipoxia intermitente pueden conducir a aumento en la expresión de proteínas involucradas en la respuesta antioxidante como superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa<sup>85,86</sup>. Estas modificaciones en la respuesta antioxidante pueden tener un importante impacto en la dinámica celular en respuesta a otros estímulos estresores como pueden ser las radiaciones ionizantes<sup>87,88</sup>.

Varios ensayos clínicos han demostrado una relación directa y significativa entre la hipoxia tumoral y un pobre pronóstico después del manejo por radioterapia<sup>89-91</sup>. El uso de sondas Eppendorf, un microelectrodo que puede medir la presión de oxígeno tisular microregional en tumores superficiales por medio de su inserción a través de una aguja fina, ha demostrado una correlación positiva entre la mayor oxigenación tumoral y el mejor control local tumoral, el mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia general después de la radioterapia en varios tipos de tumores<sup>21</sup>. Un metanálisis de datos derivados de estudios en los que se mejora las condiciones de

oxigenación celular con diferentes intervenciones como transfusiones sanguíneas, oxígeno hiperbárico y sensibilizadores de células hipóxicas durante la radioterapia, muestran una correlación positiva significativa (Odds ratio de 1.35, 95% de confianza, intervalo de 1.20-1.53), a favor de modificaciones utilizadas como terapia, que mejoran la oxigenación al interior del tumor<sup>92</sup>.

La respuesta de las células hipóxicas frente a radiación es heterogénea y es influenciada por otros factores como la tasa de replicación celular, la dosis y tipo de radiación utilizada, la intensidad y duración de la hipoxia, y la respuesta biológica particular de cada tipo celular frente a estímulos estresores. Para comprender el efecto de la radiación ionizante sobre el tejido vivo y analizar el efecto de agentes que modifican esta respuesta, es fundamental conocer algunos conceptos de la física de la radiación.

### **1.3.2 Física de las radiaciones ionizantes**

La radiación se define como un proceso en el cual partículas u ondas energéticas viajan a través del medio o el espacio. Existen dos tipos de radiación de acuerdo al tipo de interacción con la materia, radiación ionizante y no ionizante. Por las características de este trabajo, se hará una descripción detallada únicamente de la primera de ellas.

La radiación ionizante está compuesta por ondas o partículas con suficiente energía, las cuales de manera individual pueden liberar un electrón de un átomo o molécula produciendo por lo tanto una forma iónica de este elemento<sup>78</sup>. Una característica importante de este tipo de radiación es la liberación de grandes cantidades de energía en un espacio localizado<sup>93</sup>.

Se puede clasificar la radiación ionizante como electromagnética o de partículas. Las radiaciones electromagnéticas representan una forma de energía emitida y absorbida por partículas cargadas, las cuales exhiben un comportamiento dual onda – partícula a través del espacio. A este grupo pertenecen los fotones obtenidos por aceleradores lineares de partículas y los rayos X y  $\gamma$ . Este tipo de radiación ha sido una de las más ampliamente utilizadas con propósitos terapéuticos<sup>77</sup>. La radiación de partículas constituye un tipo de radiación transmitida por medio de partículas subatómicas de movimiento rápido. A este

grupo pertenecen los electrones, protones, partículas  $\alpha$ , neutrones, mesones  $\pi$  negativos e iones pesados. Los electrones son partículas pequeñas cargadas negativamente que pueden ser aceleradas a altas energías por medio de una unidad eléctrica como un betatrón o un acelerador lineal de uso clínico y son usadas ampliamente en radioterapia. Para los demás tipos de partículas, aunque su uso se ha venido ampliando de manera reciente, las dificultades técnicas y operacionales han limitado su implementación a ciertos países para su uso en radioterapia<sup>94-96</sup>.

### ▪ Unidades de medición de la radiación ionizante

Para cuantificar la dosis absorbida de radiación ionizante ya sea electromagnética o particulada por un cuerpo el sistema internacional de unidades (SI) ha establecido una unidad denominada Gray (Gy), en honor del físico inglés y precursor de la radiobiología Louis Harold Gray<sup>97</sup>. Un Gy equivale a la absorción de un Julio de radiación ionizante por un kilogramo de materia como se muestra en la **Ecuación 1-1**.

$$1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{Kg}} = 1 \frac{\text{m}^2}{\text{s}^2}$$

**Ecuación 1—1:** Unidades Gray.

Un Gray es equivalente a un Julio por kilogramo de materia

La unidad mide la cantidad de energía depositada en un sistema. Los efectos sobre dicho sistema ya sean químicos o biológicos van a depender de las propiedades intrínsecas de este y de la cantidad de energía depositada. Dado que a menudo en imágenes diagnósticas y en radioterapia se utilizan cantidades más pequeñas de energía una unidad comúnmente utilizada es el centiGray (cGy) que equivale a  $1 \times 10^{-2}$  Grays, como lo muestra la **Ecuación 1-2**

$$100 \text{ cGy} = 1 \text{ Gy}$$

**Ecuación 1—2:** CentiGray.

100 centiGrays equivalen a 1 Gray

Un electronvoltio, es una unidad de energía igual a  $1.602 \times 10^{-19}$  Julios. Representa la cantidad de energía ganada por la carga de un electrón único al moverse a través de una diferencia de potencial eléctrico de un voltio (**Ecuación 1-3**).

$$1 \text{ eV} = 1 \text{ Voltio} \left(1 \frac{\text{Julio}}{\text{Coulomb}}\right) \times \text{Carga del electrón} (1.602 \times 10^{-19} \text{ Coulomb})$$

$$1 \text{ eV} = 1.602 \times 10^{-19} \text{ Julios}$$

**Ecuación 1—3:** Electronvoltio.

Un eV equivale a la energía ganada por un electrón al desplazarse a través de un potencial eléctrico de 1 voltio.

Esta medida no representa una unidad en el Sistema Internacional por lo que debe ser obtenida experimentalmente. De manera histórica fue establecida como una medida estándar útil en aceleradores de partículas en los que una partícula con una carga ( $q$ ) tiene una energía ( $E$ ) después de pasar por el potencial ( $V$ ) si se consideran la carga de la partícula elemental  $E$  y el voltaje eléctrico en voltios se obtiene la unidad de medida (**Ecuación 1-4**).

$$E = qV$$

$$E = \text{Carga eléctrica} \times \text{Voltios}$$

**Ecuación 1—4:** Electronvoltio como unidad de energía.

La energía obtenida por una partícula es igual a la carga eléctrica de esta por el potencial eléctrico medido en voltios.

Los eV varían de acuerdo al tipo de equipo que se utilice en radioterapia, a menudo para aportar grandes cantidades de energía a las partículas se utilizan grandes cantidades de carga eléctrica que se traducen en órdenes de magnitud de  $1 \times 10^6$  eV o 1 MeV. Mientras que para irradiación particulada por electrones se utiliza la unidad eV, para radiación electromagnética se utiliza la unidad V debido a que los electrones producto de un acelerador lineal de partículas tienen que colisionar con un blanco para producir fotones de uso médico. La importancia de las unidades MeV o MV radica en que están relacionadas de manera directa con la transferencia energética lineal (LET, *Linear energy transfer*), la cual representa una medida de la energía transferida a un material en forma de partículas ionizadas. Mayores unidades MeV están relacionadas con mayores valores de LET y por lo tanto mayor transferencia de energía en forma de partículas ionizadas, causando un mayor efecto físico-químico y biológico en el tejido irradiado.

### 1.3.3 Efectos de la radiación ionizante en el tejido vivo

Si la radiación es absorbida por un material biológico, existe posibilidad de que interactúe directamente con el ADN, considerado el blanco crítico de la radiación ionizante<sup>98-100</sup>. En este caso los átomos de la molécula del ADN son ionizados o excitados conduciendo posteriormente a un efecto biológico directo denominado, **efecto directo de la radiación**.

El agua es el principal constituyente de las células por lo que una gran parte de las interacciones se producen sobre estas moléculas. La absorción de radiaciones ionizantes por el agua resulta en su excitación e ionización proceso denominado radiolisis del agua<sup>99</sup>. Las especies producidas por la radiolisis del agua son electrones no apareados,  $H\cdot$ ,  $\cdot OH$ ,  $H_2$  y  $H_2O_2$ , las cuales en presencia de oxígeno molecular, otros electrones no apareados y  $H\cdot$ , son rápidamente convertidos en radicales superóxido/perhidroxilo ( $O_2^{\cdot -}$  /  $HO\cdot_2$ )<sup>100,101</sup>. En un ambiente celular aeróbico se alcanza rápidamente una homogeneidad entre estas especies que incluyen  $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$ , y  $H_2O_2$ . Las especies químicas reactivas difunden libremente entre los compartimientos celulares del citoplasma y el núcleo, teniendo la capacidad de migrar desde su sitio de producción para reaccionar con otras moléculas como proteínas, lípidos y ADN<sup>102</sup>. Cuando se produce una interacción entre estas moléculas y el ADN, se produce un daño colateral sobre este que se denomina **efecto indirecto de la radiación**.

Pequeñas dosis de radiación pueden producir una importante producción de ROS, causando una lesión extensa y modificando reacciones químicas normales<sup>103,104</sup>. En respuesta a esta condición de estrés, diversas cascadas de señalización se activan, entre ellas, enzimas de reparación del ADN y moléculas antioxidantes las cuales de acuerdo con la magnitud del daño pueden conducir a reparación celular o muerte celular mitótica o por apoptosis<sup>105,106</sup>. Se muestra en la **Figura 1-6** los procesos secuenciales que producto de interacción la radiación ionizante sobre la materia y el tejido vivo.



**Figura 1—6:** Efectos de la radiación ionizante sobre la materia y sobre el tejido vivo  
Adaptado de Joiner *et al*<sup>97</sup>

#### ▪ Radiación ionizante y muerte celular

La muerte celular tras la exposición a radiaciones ionizantes, es dependiente del tipo de tejido y puede presentarse en dos formas, la apoptosis y la muerte mitótica o reproductiva. Aunque se ha demostrado la importancia de la apoptosis causada por daños en el ADN, la muerte mitótica es considerada un proceso crítico en la evaluación de la sensibilidad celular frente a diferentes estímulos tóxicos<sup>107</sup>.

La apoptosis ocurre de manera fisiológica en varios tipos de tejidos normales y puede ser inducida en tejidos normales y tumorales por radiación u otras noxas<sup>108</sup>; en el caso de la radiación, la inducción es dependiente, en gran parte, del tipo celular en el que esta incide<sup>109</sup>. De manera general, los tejidos con alto recambio como el hematopoyético y el linfoide son particularmente sensibles a muerte celular por la vía apoptótica. La apoptosis inducida por radiación se ha asociado a diferentes alteraciones a nivel mitocondrial, seguidos por la activación de caspasas<sup>110</sup>. Se ha postulado que la iniciación de la vía apoptótica podría ocurrir en la mitocondria o *corriente arriba* de esta, por medio del daño producido en el ADN o por efectos directos en la membrana mitocondrial. El daño en el ADN producido por las radiaciones ionizantes puede conducir a la apoptosis por medio de la ruta asociada a P53 incluyendo la sobre-regulación de proteínas proapoptóticas como BAX, los ligandos y receptores de muerte celular y la vía de las ceramidas<sup>111</sup>.

En la mayoría de tejidos tumorales la muerte mitótica es de gran importancia para el control tumoral, este tipo de muerte se produce cuando se ha perdido la integridad reproductiva de la célula, lo cual hace imposible que se produzcan nuevas divisiones celulares. En este contexto aunque la célula tumoral continúe biológicamente existiendo es incapaz de entrar en nuevos ciclos de división, lo que hace que se considere muerta. Tanto en radioterapia como en radiobiología la muerte mitótica tiene una gran importancia para comprender los efectos de la radiación ionizante sobre el tejido tumoral<sup>112</sup>.

#### ▪ **Curvas de supervivencia celular**

Una de las contribuciones más importantes de la radiobiología en radioterapia y oncología fue el desarrollo de ensayos que permitieron cuantificar la muerte celular *in vitro* para tejidos sanos y tumorales tras ser expuestos a radiaciones ionizantes. Las primeras descripciones acerca de células tumorales en las que se evalúa la habilidad para formar colonias tras ser sometidas a radiaciones ionizantes se remontan a Puck y Marcus en 1956<sup>113</sup>, quienes estudiaron los efectos de rayos X a altas dosis en la formación de colonias en células HeLa, observando, además de los cambios en el número de colonias, diferencias morfológicas en las células sometidas a radiación. El ensayo de supervivencia celular o clonogénico ha sido usado desde entonces en una gran cantidad de estudios con diversos tipos de células y ha aportado una gran cantidad de información acerca del efecto de la radiación en células animales<sup>114</sup>.

El ensayo detecta todas las células que conservan la capacidad para producir un gran número de progenie a partir de una única célula. Existen dos mecanismos principales involucrados en este tipo de ensayo, la pérdida de la integridad reproductiva y la inhabilidad para proliferar de manera indefinida. Una célula que conserva su habilidad para sintetizar proteínas y ADN después de la noxa puede continuar viviendo y replicándose por 1 o 2 generaciones, tras lo cual, sus divisiones se detienen y se considera en este punto que ha perdido su integridad reproductiva o dicho de otra forma, está reproductivamente muerta. Una célula que conserva su capacidad para dividirse y proliferar produciendo una colonia constituida por clones a partir de una única célula se denomina "clonogénica". Se ha establecido el número de células que componen una colonia en 50, ya que se requieren al menos 5 a 6 generaciones de replications sucesivas para alcanzar este número de células<sup>115</sup>.

Una curva de supervivencia celular describe la relación entre el agente productor del insulto y la proporción de células que sobreviven. La habilidad de una célula única para crecer en una colonia y posteriormente ser visualizada, es prueba de que ha conservado su capacidad reproductiva. La pérdida de la habilidad como una función de la dosis de radiación es descrita entonces como una curva de dosis-supervivencia<sup>114</sup>.

Para determinar la supervivencia a diferentes dosis se determina inicialmente la eficiencia de sembrado (**ES**), definida como el porcentaje de células que forman colonias compuestas de al menos 50 células (**C**) en relación con el número de células sembradas (**M**) como lo muestra la **Ecuación 1- 5**.

$$ES = \frac{C}{M} \times 100$$

**Ecuación 1—5:** Eficiencia de sembrado.

En donde **C** representa el número de colonias formadas, considerando a una colonia un grupo de al menos 50 células y **M** es el número de células sembradas en cada pozo.

La fracción de supervivencia (**FS**) se define como la relación de eficiencia de sembrado para una dosis determinada (**d**) en relación con la dosis cero o control, como lo muestra la **Ecuación 1-6**.

$$FS = ES_{(d)}/ES_{(0)}$$

**Ecuación 1—6:** Fracción de supervivencia.

En donde  $ES_{(d)}$  es la eficiencia de sembrado tras la dosis **d** y  $ES_{(0)}$  es la eficiencia de sembrado a una dosis de 0 Gy.

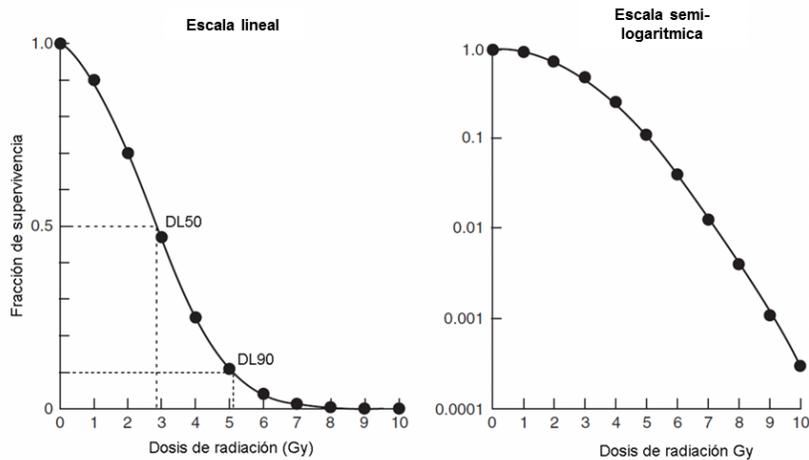
Para efectos prácticos, la ecuación 1-6 se puede expresar también como lo muestra la **Ecuación 1-7:**

$$FS = \frac{\frac{C_{(d)}}{M_{(d)}}}{\left(\frac{C_{(0)}}{M_{(0)}}\right)}$$

**Ecuación 1—7:** Fracción de supervivencia.

En donde  $C_{(d)}$  es el número de colonias formadas y  $M_{(d)}$  el número de células sembradas, a una dosis determinada **d**, y  $C_{(0)}$  el número de colonias formadas y  $M_{(0)}$  el número de células sembradas, a una dosis de 0 Gy,  $(0)$ .

Tras la exposición a dosis crecientes de radiación u otro agente tóxico se espera que el número de colonias sea progresivamente menor y adicionalmente se aumente el número de colonias con un número de células menor de 50. Cuando se representan las fracciones de supervivencia en una escala lineal se puede observar que se comportan como una curva sigmoidea, con un hombro en el inicio de la curva seguida por una curva asintótica que se aproxima a una fracción de supervivencia de 0. Se puede determinar por medio de este método la dosis en la que el 50% de las células están muertas, se denomina a este término DL50 o D50. Los resultados obtenidos a partir de un ensayo de supervivencia en relación con la dosis son usualmente representados como la fracción de supervivencia en una escala semilogarítmica dado que la muerte celular se ajusta mejor a una función exponencial a la dosis y a que permite ver y comparar fracciones de supervivencia muy bajas como las requeridas para obtener una reducción significativa en el tamaño tumoral<sup>97</sup>, se muestra la comparación entre estas escalas en la **Figura 1-7**.



**Figura 1—7:** Curva de supervivencia celular tras la exposición a radiaciones ionizantes representada en escala lineal y semilogarítmica.

Adaptada de Joiner et al<sup>97</sup>.

Diversos modelos descriptivos en el campo de la radiobiología han buscado explicar el comportamiento de las curvas de supervivencia, sin dejar de lado parámetros biológicos, bioquímicos y biofísicos que puedan afectar su comportamiento y que permitan servir de marco para analizar y comparar los datos, y en última instancia, apoyar la construcción de teorías que expliquen los efectos de la radiación en modelos *in vitro* e *in vivo*. Las teorías más importantes hasta ahora desarrolladas son, la teoría de blancos, el modelo lineal cuadrático y el modelo lineal cuadrático-cúbico.

### ▪ Modelo lineal cuadrático

El modelo lineal cuadrático constituye el modelo más ampliamente utilizado<sup>115</sup>. En este se asume que hay dos componentes para la muerte celular por radiación, uno que es proporcional a la dosis ( $\alpha$ ) y otro que es proporcional al cuadrado de la dosis ( $\beta$ ) (**Ecuación 1-8**). El considerar dos componentes introduce el concepto de acción de la radiación dual y considera los trabajos iniciales con cromosomas en los que muchas aberraciones cromosómicas son el resultado de dos rupturas separadas que causan una reorganización compleja pudiendo ser letales para las células.

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

**Ecuación 1—8:** Modelo Lineal cuadrático.

En donde S es la fracción de células que sobreviven a una dosis D,  $\alpha$  es el término lineal y  $\beta$  es el término cuadrático.

El modelo lineal cuadrático es comúnmente utilizado por su buena descripción de la supervivencia celular en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Permite una interpretación sencilla de la muerte celular por impactos únicos ( $\exp(-\alpha D^2)$ ) e impactos múltiples  $\exp(-\beta D^2)$ , demostrado por los diferentes ensayos variando la tasa de dosis<sup>97</sup>.

Existe un punto en el que los componentes de la muerte celular son proporcionales a la dosis y al cuadrado de la dosis, útil para comparar resultados de diferentes curvas (**Ecuación 1-9**).

$$\alpha D = \beta D^2$$

$$D_0 = \alpha/\beta$$

**Ecuación 1—9:** Determinación del  $D_0$ .

El  $D_0$  o  $\alpha/\beta$  representa la dosis en la cual el aporte de ambos componentes sobre la supervivencia celular es equivalente y puede ser comparado entre diferentes experimentos<sup>116</sup>.

Este modelo ha resultado útil para comparar el efecto de diversos agentes que promueven la radiosensibilidad o resistencia, por lo que resulta de gran utilidad para evaluar la respuesta celular frente al estímulo hipóxico como en el presente trabajo.

## 2. Planteamiento del problema

Entre los elementos que afectan el comportamiento biológico de las células cancerosas, los microambientes tumorales han cobrado gran interés, de esta manera, factores como la angiogénesis y el estímulo de agentes estresores como la hipoxia se han considerado críticos para el desarrollo tumoral. Uno de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta celular frente a diferentes tipos de estímulos estresores es la activación de vías de señalización intracelulares, entre ellas, la vía JAK/STAT. A diferencia de otras vías de señalización oncogénicas esta vía no ha sido completamente explorada, por lo que la importancia de su activación podría estar subestimada.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el presente trabajo se buscó analizar la expresión y activación de una de las proteínas de la vía, la proteína STAT3, en una línea de cáncer de cérvix (HeLa) y en un modelo híbrido de células endoteliales (EA.hy926), en respuesta al estrés hipóxico mediante *Western Blotting*, inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas e inmunocitoquímica con anticuerpos fluorescentes.

Por otra parte, la importancia de la dinámica espacio temporal de las concentraciones de oxígeno en el tejido tumoral se ha relacionado con la respuesta celular a diversos agentes terapéuticos entre los que se incluye la radioterapia. A pesar de los grandes avances tecnológicos en las ciencias físicas y biológicas durante las últimas décadas, gran parte del fundamento radiobiológico que explica la respuesta diferencial de cada tipo de tejido frente a radiaciones ionizantes continúa en investigación. Debido al número de factores relacionados y a la dificultad que representa la realización de ensayos clínicos, se han diseñado varios modelos que intentan dilucidar la participación de cada uno de los elementos involucrados.

Una de las herramientas más ampliamente utilizadas en radiobiología y que permiten estudiar este aspecto son el ensayo clonogénico, el cual consiste en la determinación de las células que conservan la integridad reproductiva tras la exposición a agentes

estresores. En el presente trabajo y junto con la colaboración del grupo de Física Médica de la Universidad Nacional de Colombia, se buscó construir y analizar curvas de supervivencia de células HeLa y EAhy.926 expuestas a radiaciones ionizantes en condiciones de normoxia e hipoxia con posterior reoxigenación.

## **3. Objetivos**

### **3.1 General**

Evaluar la respuesta de las células HeLa y EA.hy926 al estrés por hipoxia y radiación ionizante a través de la vía JAK/STAT y la supervivencia celular

### **3.2 Específicos**

Los modelos celulares utilizados en este trabajo fueron las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix, Hela, y las endoteliales EA.hy926, con los cuales se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

- Confirmar las condiciones de estrés hipóxico a través de la activación del factor inducido por hipoxia, HIF-1.
- Evaluar el efecto citotóxico de la hipoxia
- Evaluar la expresión y activación de una de las proteínas de la vía JAK/STAT, la proteína STAT3 en condiciones de hipoxia.
- Evaluar el efecto de la hipoxia sobre el comportamiento de las curvas de supervivencia de las células sometidas a radiaciones ionizantes.



## 4. Materiales y Métodos

### 4.1 Cultivo de células

#### 4.1.1 Descripción de líneas celulares

Células HeLa (ATCC No. CCL-2). Es una línea celular epitelial, obtenida en 1951 a partir de adenocarcinoma de cérvix humano de una mujer afrodescendiente de 31 años de edad. Se ha reportado que estas células pueden contener secuencias de ADN de HPV-18. Tienen baja expresión de p53 y niveles de pRB normales, su uso está ampliamente extendido en biología celular y molecular como modelo biológico humano y en estudios del cancer<sup>117-119</sup>.

Células EAhy926 (ATCC No. CRL-2922). Es una línea endotelial humana obtenida en 1983 por Edgell C.J. a partir de la fusión de células primarias de vena umbilical humana con la línea A549 (Carcinoma de pulmón)<sup>120</sup>. Las microfotografías electrónicas demuestran distribución citoplasmática de cuerpos de Weibel-Paladel y organelos específicos del tejido característicos de funciones de células endoteliales diferenciadas tales como angiogénesis, homeostasis/trombosis, presión sanguínea e inflamación, por estos motivos ha sido un modelo ampliamente para estudiar la función endotelial<sup>121-123</sup>.

Las dos líneas celulares se sembraron y ampliaron, con el fin de obtener una cantidad suficiente para el mantenimiento de los cultivos, la criopreservación y la realización de experimentos. Las células fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup>, en atmosfera húmeda, con 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C, en incubadora (NUAIRE® DHD *Autoflow*).

### 4.1.2 Cultivo y mantenimiento de las células

Las líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Dubelcco's *Modified Eagle's Medium*), suplementado con Suero Fetal Bovino al 10%. Para la preparación del medio de cultivo, se utilizó Medio DMEM en polvo (Gibco, Ref. 316000-034), aminoácidos no esenciales 1X (Gibco, Ref. 11140-050), bicarbonato de sodio 23.8 mM, piruvato de sodio 1.21 mM (Sigma, Ref. P5280-25G) y suero fetal bovino (SFB) a una concentración de 10% (v/v) (Eurobio, Ref. CVFSVF00-01). El pH se ajustó a 7.2 y el medio se filtró con membranas de acetato de celulosa de 0.2 ( $\mu\text{m}$ ), se comprobó la esterilidad de todos los medios de cultivo por siembra en agar sangre y Sabouraud, de acuerdo con el protocolo establecido en el laboratorio.

Se realizó cambio de medio de cultivo dos a tres veces por semana, según la tasa de crecimiento celular y los requerimientos particulares de cada línea. Para el cambio del medio, inicialmente se retiró el medio de la caja de cultivo y se realizaron tres lavados con Buffer Fosfato Salino (PBS, Fosfato monosódico 10 mM, Fosfato disódico 10 mM y Cloruro de Sodio 100 mM a un pH de 7.4). Finalmente, se colocó en la caja de cultivo medio nuevo suplementado con SFB 10%, volumen suficiente para el área de cada caja (5 mL para cajas de 25 cm<sup>2</sup> y 10 mL para cajas de 75 cm<sup>2</sup>).

Para la ampliación de los cultivos, al alcanzar una confluencia cercana al 95% se realizó disgregación celular en presencia de tripsina-EDTA según protocolos convencionales<sup>124</sup>. Para ello, se retiró el medio de cultivo de la caja a disgregar, se realizaron tres lavados con la solución PBS y se adicionó la solución de tripsina 0.25%, (EDTA 2.8 mM (Sigma, Ref. 5134), Tripsina en polvo 25 mg/ml (Gibco, Ref. 272500-18), disuelta en PBS pH 7.3). Se incubaron por 5 minutos a 37°C, posterior a lo cual, se adicionó medio de cultivo completo, se centrifugó la suspensión por 5 minutos a 1500 RPM, obteniéndose un precipitado celular, el cual se resuspendió en 5 mL de medio completo y se utilizó de acuerdo con el procedimiento a realizar.

### 4.1.3 Criopreservación y descongelación de los cultivos celulares

Tras la ampliación del cultivo celular y con el fin de almacenar y preservar cada una de las líneas celulares, se llevó a cabo el procedimiento de criopreservación celular. Al alcanzar una confluencia celular del 100% se realizó la disgregación celular con tripsina, siguiendo el procedimiento antes descrito. Se realizó el conteo celular y las células se resuspendieron en 1 mL de medio de congelación (Dimetilsulfóxido al 10% (Sigma, Ref. D2650), y Suero Fetal Bovino al 20% en medio de cultivo) a razón de  $2 \times 10^6$  a  $4 \times 10^6$  células por criovial. Todo el procedimiento se realizó sobre hielo para asegurar la adecuada preservación de las células. Inmediatamente, se colocaron en alcohol isopropílico a 4°C, se llevaron a -80°C por 24 horas y posteriormente se almacenaron en cajas rotuladas de manera indefinida a esta temperatura. Algunos de los crioviales se almacenaron en nitrógeno líquido para asegurar su adecuada preservación por largos períodos.

Para descongelar las células, los crioviales se incubaron a 37°C, hasta obtener una solución líquida. Inmediatamente, la solución se resuspendió en 5 mL de medio de cultivo completo y se centrifugó a 1500 RPM por 5 minutos obteniéndose un precipitado celular, el cual se resuspendió en 5 mL de medio completo y se sembró en una caja de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

## 4.2 Condiciones de hipoxia

Para los ensayos de hipoxia, se utilizaron dos tipos de condiciones de hipoxia: física y química.

### 4.2.1 Hipoxia Física

La hipoxia física se estableció mediante una cámara de hipoxia aislada *C-Chamber* de *BioSpherix*® y un controlador de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono *ProOx C-21* de *BioSpherix*® con una composición de gases de 1% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, equilibrado con N<sub>2</sub> del 99.9%, a 37°C, humidificado según condiciones descritas por la literatura<sup>125,126</sup>. Los frascos de cultivo se colocaron dentro de la cámara a una confluencia del 70-80% con medio de cultivo fresco, el tiempo de incubación en hipoxia fue

cronometrado desde el momento en que la concentración de oxígeno y dióxido de carbono se estabilizó en el monitor del controlador.

### 4.2.2 Hipoxia Química

La hipoxia química fue establecida en el frasco de cultivo con una confluencia del 70–80%, mediante la dilución de una solución stock (10 mM preparada en medio DMEM) del agente quelante del hierro, mesilato de deferoxamina (DFO, Sigma, Ref. D95333) y llevada a concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu$ M en el medio de cultivo, según lo descrito por la literatura<sup>126–129</sup>. A partir del momento de adición del DFO se cronometró el tiempo de hipoxia, los frascos de cultivo permanecieron bajo estas condiciones en incubación a 5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C y en atmosfera humidificada.

## 4.3 Ensayo de citotoxicidad por MTT

El ensayo de MTT es un procedimiento ampliamente utilizado para evaluar la citotoxicidad de un compuesto o condición, su fundamento se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetitiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en el compuesto formazan<sup>130</sup>. El metabolismo de este compuesto permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas y por lo tanto inferir la supervivencia y proliferación celular al ser la cantidad de formazan producida proporcional a la cantidad de células vivas. Finalmente, se realiza una lectura por espectrofotometría.

Para el desarrollo de este procedimiento se sembraron aproximadamente 25.000 células en cajas de cultivo celular de 96 pozos y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, para permitir su adherencia. Posteriormente los cultivos fueron sometidos a las condiciones de normoxia, hipoxia física (1% de oxígeno) e hipoxia química (100  $\mu$ M de DFO), durante 2, 6 y 24 horas. Al finalizar este periodo, se descartó el medio y se adicionaron 100  $\mu$ l de medio DMEM sin suero con MTT a una concentración de 1mg/ml (Invitrogen, Ref M694), se dejó en incubación durante 4 horas a 37° y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100  $\mu$ l de isopropanol 0.05 N HCl para permitir la disolución de los cristales de formazán, se dejó en incubación durante 1 hora a

temperatura ambiente en agitación sobre plataforma balanceante, y finalmente se realizó la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

El porcentaje de viabilidad se obtuvo como lo muestra la **Ecuación 4-1**

$$\% \text{ Viabilidad (Vb)} = \frac{\text{Absorbancia células tratadas}}{\text{Absorbancia células control}} \times 100$$

**Ecuación 4—1:** Determinación de la viabilidad celular por ensayo de MTT

Para calcular la diferencia de viabilidad en cada una de las condiciones establecidas se restó a la media de viabilidad bajo condiciones de normoxia la media obtenida en cada uno de los experimentos como lo muestra la **Ecuación 4-2**

$$Vb \text{ Normalizada} = \text{Media \% Vb normoxia} - \text{Media \% Vb condiciones de experimentación}$$

**Ecuación 4—2:** Viabilidad celular por ensayo de MTT normalizada

## 4.4 Extracción de proteínas totales

Para realizar la extracción de proteínas totales, luego de someter los cultivos celulares a las diferentes condiciones de hipoxia, se realizó 3 lavados con PBS, se adicionó 500  $\mu$ l de buffer RIPA (TrisCl 50 mM pH 7.4, NaCl 15 mM, EDTA 5 mM, Triton™ X-100 al 0.5% (Sigma, Ref. T8787)) suplementado con inhibidores de proteasas *cocktail* inhibidor de proteasas 5  $\mu$ l/ml (Sigma, Ref. P8340) el cual contiene AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina y pepstatina A, al cual se adicionó PMSF 1mM (Sigma, Ref. P7626), y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM (Sigma, Ref. S6508). Los cultivos celulares se cosecharon utilizando un raspador de células (Costar, Ref. CLS3010), la suspensión se recolectó y se dispuso en tubos de micro centrifuga de 1.5 ml, en donde las células fueron lisadas con buffer RIPA utilizando una jeringa con aguja de calibre 21. Se incubaron en hielo durante 15 min, tras lo cual se centrifugaron por 15 min a 14.000 RPM a 4°C. El sobrenadante con las proteínas fue recolectado en tubos de 1 ml y almacenado a -80°C para su posterior uso.

## 4.5 Extracción de proteínas nucleares

Para la extracción de proteínas nucleares se empleó el kit Nuclear Extract Kit® (Active Motif, Ref. 100946). A partir de un frasco de 75 cm<sup>2</sup> con confluencia del 95% se aspiró el medio y se lavó con 5 ml de PBS e inhibidor de fosfatasa proveído por el fabricante. Posteriormente se agregó 3 ml de esta misma solución y las células se cosecharon utilizando un raspador. Las células en suspensión fueron transferidas a un tubo cónico de 15 ml pre-enfriado y se centrifugaron a 1000 RPM por 5 minutos a 4°C. Para la extracción de la fracción citoplasmática se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 µl de buffer hipotónico. La muestra se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1 ml pre-enfriado e incubado por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se adicionaron 25 µl de detergente y se mezcló en vortex por 10 segundos. Se centrifugó la suspensión por 30 segundos a 14.000 RPM a 4°C y el sobrenadante con las proteínas citoplasmáticas fue transferido y almacenado a -80°C. Para la colección de la fracción nuclear se resuspendió el pellet obtenido en el anterior procedimiento en buffer de lisis completo que contenía DTT 1 mM, buffer de lisis y *cocktail* inhibidor de proteasas proveídos por el fabricante. La suspensión fue incubada por 30 minutos sobre hielo en plataforma balanceante y posteriormente se homogenizó en vortex por 30 segundos. Se centrifugó por 10 minutos en centrifuga pre-enfriada a 4°C y finalmente se transfirió el sobrenadante que contenía las proteínas nucleares, se alicuotó y se almacenó a -80°C para su posterior uso.

## 4.6 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo, Ref. 23225). Este método utiliza como fundamento la reducción de la forma cúprica Cu<sup>+2</sup> a su forma cuprosa Cu<sup>+1</sup> por las proteínas en un ambiente alcalino y la posterior detección colorimétrica del catión cuproso por el ácido bicinconínico. El desarrollo de la coloración resulta de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. El complejo cobre/BCA es hidrosoluble y exhibe una fuerte absorbancia lineal a 562 nm permitiendo su detección por espectrofotometría y la correlación con la concentración de proteínas<sup>131,132</sup>. Para el desarrollo del procedimiento se siguió el protocolo descrito por el fabricante. Se dispusieron los estándares de albúmina sérica bovina (BSA) suministradas por el kit y las muestras a cuantificar en microplacas de 96

pozos sobre los que se adicionó el reactivo de trabajo, se incubó a 37°C y se leyó la absorbancia utilizando el espectrofotómetro iMark™ Microplate Absorbance Reader (Biorad, Ref. 168-1130). A partir de las lecturas se realizó la curva de calibración con el patrón de albúmina y una regresión lineal para determinar la concentración de proteína de las muestras.

## 4.7 Confirmación de las condiciones de hipoxia por ELISA

Para confirmar que los cultivos celulares se encontraran en hipoxia se utilizó la determinación de la activación del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$ , mediante el sistema TransAM™ HIF-1 (Active Motif, Ref. 47096). Este sistema utiliza oligonucleótidos inmovilizados a una microplaca sólida los cuales contienen el elemento de respuesta a la hipoxia (HRE). Los dímeros de HIF contenidos en los extractos nucleares se unen de manera específica a este oligonucleótido y son detectados mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra HIF-1 $\alpha$ . Posteriormente la adición de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), permite la detección colorimétrica cuantitativa por medio de espectrofotometría<sup>133</sup>. Para el ensayo se utilizaron 10  $\mu$ g de proteínas nucleares por pozo. Las lecturas fueron realizadas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y como control a 655 nm, siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 4.8 Western Blotting

### ▪ Electroforesis de proteínas

La separación de las proteínas se realizó mediante el protocolo de SDS – PAGE (*Sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Este método utiliza un sistema de buffer discontinuo que incorpora dodecilsulfato de sodio en el buffer de carga. El SDS se une a los residuos aminoacídicos y proporciona a los polipéptidos una carga neta negativa proporcional a la longitud de la cadena y por lo tanto a la masa molecular de la proteína. Las proteínas en un sistema de buffer SDS - PAGE son separadas de acuerdo con sus pesos moleculares y de manera independiente a la carga eléctrica por lo que su posterior ubicación se facilita por medio de un patrón de referencia<sup>134</sup>.

Para la preparación del sistema de gel discontinuo se utilizó para la fase de resolución Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1% (w/v) (Sigma, Ref. L3771), acrilamida/ bisacrilamida 8% (Merck, Ref. 100641), persulfato de amonio 0.05% (Promega, Ref. V3131) y TEMED (Invitrogen, Ref. 15524-0.10) 0.5 µl/ml. Para la fase de concentración se utilizó buffer Tris-HCl 0.125 mM pH 6.8 con una concentración igual de los demás reactivos. Se empleó el sistema de electroforesis vertical con la cámara Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, Ref. 165-80001). Se utilizaron 40 µg de proteína para cada uno de los pozos junto con buffer de carga para unas concentraciones finales de glicerol 10%, SDS 10 mg/ml, 0.125 M Tris-HCl y azul de bromofenol. Las muestras fueron calentadas durante 5 min a 96°C, centrifugadas a 14.000 RPM a 4°C durante 5 minutos y sembradas en cada uno de los pozos. Se utilizó como patrón de peso molecular el Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo, Ref. 26616). La electroforesis se realizó por 2 horas a un voltaje constante de 120 V.

#### ▪ **Transferencia de proteínas a membranas de PVDF**

Las proteínas se transfirieron desde los geles de poliacrilamida a membranas de PVDF (GE Healthcare, Ref. RPN303F), utilizando el sistema de transferencia húmeda Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Ref. 170-3930) y buffer de transferencia (Tris 15 mM Glicina 120 mM, Metanol 15% (Merck, 1.06009)) a un voltaje constante de 100 V durante 2 horas. Las membranas fueron almacenadas en solución TBS-T (Tris 20 mM pH 7.6, NaCl 137 mM, Tween® 20 0.1% (Sigma, Ref. P1379)), para su posterior uso.

#### ▪ **Inmunodetección**

Las membranas se bloquearon durante 2 horas con leche descremada al 5% en TBS-T para STAT3 o con BSA al 1% (Merck, Ref. 112018) en TBS-T para β-Actina. Posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-STAT3 a una concentración de 1:500 (STAT3 (C-20), SantaCruz Biotechnology, Ref. SC-482) diluido en leche descremada al 5% o con el anticuerpo primario monoclonal producido en ratón anti-β-Actina a una concentración de 1:5000 para el control de carga (Sigma, Ref. A5316). Se lavó 3 veces por 10 minutos cada vez con TBS-T en agitación y fueron incubadas con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación continua. Para STAT3 se utilizó un

anticuerpo anti-conejo, IgG conjugado con HRP producido en cabra (Sigma, Ref. A4914) a una concentración de 1:5000 y para  $\beta$ -Actina, anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con HRP producido en cabra (Sigma, Ref. A4416). Las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con TBS-T y se llevaron al proceso de revelado.

Para la detección de las proteínas se utilizó el sistema de detección por quimioluminiscencia ECL Plus (GE Healthcare, Ref. RPN21320L), se documentó mediante películas de alto rendimiento para quimioluminiscencia (GE Healthcare, Ref. 28906836), en un cassette de revelado (GE Healthcare, Ref. RPN11642), durante el tiempo óptimo para la visualización de las bandas.

Las películas fueron digitalizadas a una resolución de 600 dpi y analizadas por densitometría con el software de análisis de imágenes ImageJ (Version 1.44).

## 4.9 Inmunoprecipitación con proteína G-Sefarosa

La inmunoprecipitación es un método que permite el aislamiento y la concentración de proteínas. En este procedimiento un anticuerpo específico para la proteína de interés es incubado con perlas de agarosa o sefarosa A/G. El complejo anticuerpo/polisacárido es incubado entonces con el extracto celular total permitiendo la unión de las proteínas fosforiladas al anticuerpo y por lo tanto a las perlas. Este procedimiento aísla físicamente las proteínas específicas del resto de la muestra, permitiendo su posterior recuperación para ser separadas por SDS-PAGE y analizadas por *Western Blotting*<sup>135,136</sup>.

Para este procedimiento se utilizaron perlas de proteína G sefarosa, (Sigma, Ref. P3296), las cuales se lavaron inicialmente 3 veces para retirar residuos de etanol con 500  $\mu$ l de PBS suplementado con *cocktail* inhibidor de proteasas 5 $\mu$ l/ml, PMSF 1mM, y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1mM. En cada lavado se centrifugó a 14.000 RPM en un pulso corto de 60 segundos y se retiró el sobrenadante. Para formar el complejo anticuerpo/polisacárido se utilizaron 70  $\mu$ l de perlas a las cuales se adicionó el anticuerpo antifosfotirosina en una concentración de 0.03  $\mu$ g/ $\mu$ l (Millipore, Ref. 05-321) y se incubaron toda la noche a 4°C con agitación constante. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14.000 RPM por 60 segundos y se retiró el exceso de anticuerpo con sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con PBS e inhibidores de proteasas y fosfatasa, se adicionaron 500  $\mu$ g de

proteínas totales y se llevaron a un volumen de 500 µl con PBS e inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se incubó a 4°C durante dos horas en agitación constante y se realizaron 3 lavados en las condiciones anteriormente señaladas. Las perlas fueron resuspendidas en 60 µl de buffer de carga 4X para SDS-PAGE, se calentaron a 96°C para permitir la disociación de las proteínas de interés del complejo anticuerpo/polisacárido. La muestra se centrifugó por 5 minutos a 14.000 RPM a 4°C y el sobrenadante fue recolectado y sometido a electroforesis mediante el sistema SDS-PAGE. Las proteínas del gel fueron transferidas a membranas de PVDF y finalmente la inmunodetección se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito (Ver numeral 4.8).

## **4.10 Inmunocitoquímica con anticuerpos inmunofluorescentes**

La inmunocitoquímica con anticuerpos inmunofluorescentes indirecta es una técnica de microscopía que permite la detección subcelular de proteínas. Para ello, las células se fijan con un aldehído, se permeabilizan mediante el uso de un detergente y se incuban con anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés. Los anticuerpos secundarios están conjugados con fluoróforos que emiten fluorescencia a una longitud de onda específica lo cual permite su posterior identificación por medio de microscopía de fluorescencia<sup>137</sup>.

Para este procedimiento las células se sembraron sobre cubreobjetos (Fisher Scientific, Ref. 12-545-82) dispuestos en cajas de cultivo celular de 24 pozos, a una densidad de 30.000 células por pozo con 500 µl de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y cultivadas por 24 horas para permitir su adherencia y posterior exposición a las condiciones de experimentación. Tras finalizar este periodo el medio fue retirado, se realizaron 3 lavados con PBS y las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% (PFA, Sigma, Ref. 252549) durante 30 minutos a temperatura ambiente en agitación continua. Posteriormente, se retiró el PFA y se realizaron tres lavados con PBS a temperatura ambiente. Las células fueron permeabilizadas con Triton™ X100 0.3 % (Sigma Ref. T8787) en PBS durante 5 minutos, a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron 3 lavados con PBS y se incubaron con cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl) fresco 50

mM para evitar la autofluorescencia de los grupos aldehído por la fijación con PFA. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con buffer de bloqueo (BSA 1% en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó con anticuerpo anti-STAT3 diluido en buffer de bloqueo a una concentración de 1:100 toda la noche a 4°C. Después de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 6 lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 568 Goat Anti-RabbitIgG (Life Technologies, Ref A11011) durante 2 horas, diluido 1:1000 en buffer de bloqueo. Para la detección de los núcleos se tiñó con Hoechst 33342 (LifeTechnologies, Ref H3570), a una concentración de 0,2 µg/ml para lo cual se realizaron tres lavados adicionales y se incubó con el colorante durante 30 minutos. Finalmente, se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS y se fijaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Fluoromount (Sigma, F4680). Para cuantificar la translocación de la proteína al núcleo se utilizó un microscopio de fluorescencia para tomar fotografías de las laminas en cada una de las condiciones y se contabilizó en 100 células la incorporación de proteína STAT3 al núcleo utilizando el software ImageJ (Version 1.44) por triplicado.

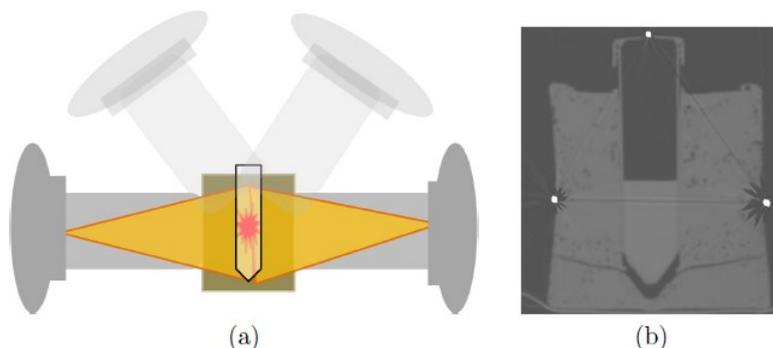
## **4.11 Construcción de curvas de supervivencia celular frente a radiaciones ionizantes**

### **4.11.1 Verificación dosimétrica**

Antes de irradiar los cultivos celulares, se garantizaron los niveles adecuados de radiación para las células del estudio mediante las dosimetrías realizadas en los Aceleradores de partículas del Instituto Nacional de Cancerología, la Fundación Santafé de Bogotá y el centro de oncología de la Clínica el Country. Todas las irradiaciones se realizaron con la colaboración del físico Paulo Alejandro Quintero Mejía del Grupo de Física Médica de la Universidad Nacional.

Se diseñó un simulador físico de parafina el cual aseguró que las dosis recibidas al interior del cubo correspondieran a las dosis deseadas y estas fueran homogéneas en el contenido del tubo. Para efectos prácticos se realizó una tomografía computarizada (CT) al simulador de parafina ubicando fiducias metálicas de posicionamiento para asegurar la reproducibilidad con las coordenadas del acelerador. Las imágenes de CT se tomaron para calcular las unidades monitor necesarias para depositar una dosis deseada

mediante el sistema de planeación dosimétrica *Eclipse<sup>R</sup>* haciendo uso de dos campos laterales de 9cm x 4cm de tamaño (**Figura 4-1**).



**Figura 4—1:** Simulador físico de parafina

(A) Sistema de irradiación de células. Se irradió una parte del cubo y luego se rotó el *Gantry* al lado contrario para irradiar la parte restante obteniendo así mayor homogeneidad en la dosis deseada. (B) Imagen de tomografía computarizada. Se observa la ubicación de las fiducias metálicas que coinciden con los láseres de posicionamiento del acelerador lineal.

Las células se irradiaron con energías de 6 y 15 Mega Voltios (MV) para fotones provenientes de aceleradores lineales de uso clínico (*Clinac<sup>R</sup> 2100*) de las instituciones mencionadas.

#### 4.11.2 Ensayo clonogénico de supervivencia celular

Como ya se mencionó previamente, este ensayo es fundamental en el estudio de los efectos de la radiación ionizante sobre cultivos celulares; para ello, de manera inicial se estandarizaron las condiciones según los protocolos descritos por la literatura para las dos líneas celulares en estudio <sup>114,115,138</sup>. El protocolo definitivo de trabajo seguido fue el siguiente:

1. Antes de la irradiación, sembrar las células en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar una confluencia del 70 – 80%.
2. Inducir condiciones de experimentación normoxia (21% de Oxígeno), hipoxia física (1% de O<sub>2</sub>) e hipoxia química (100 μM de DFO) durante 24 horas.
3. Disgregar las células con tripsina/EDTA y llevar a un volumen final de 10 ml en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml.

4. Realizar el conteo celular con hemocitómetro.
5. Preparar y rotular los tubos de acuerdo a la dosis a administrar como lo muestra la **Tabla 4-1** y la condiciones de hipoxia física y química. Adicionar a cada tubo 5 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB.

**Tabla 4—1:** Dosis de radiación administradas a cada una de las líneas celulares para el ensayo de supervivencia clonogénico

Tubo No.	Dosis en Gray	Dosis en centiGray
1	0 Gy	0 cGy
2	1 Gy	100 cGy
3	2 Gy	200 cGy
4	4 Gy	400 cGy
5	6 Gy	600 cGy
6	8 Gy	800 cGy
7	10 Gy	1000 cGy

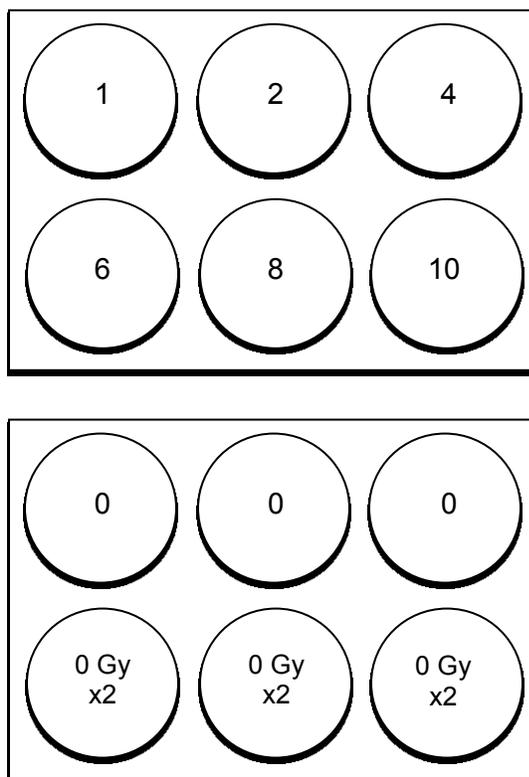
6. Tomar el volumen de suspensión celular que contenga 50.000 células y resuspender en los tubos preparados en el numeral 5. Sellarlos con Parafilm®.
7. Transportar los tubos sobre hielo hasta el lugar de irradiación.
8. Previo a la irradiación, resuspender por inversión el tubo y colocarlo en un simulador físico de parafina.
9. Irradiar el tubo dividiendo la energía a utilizar en 2 dosis entregadas al cubo de parafina desde dos ángulos diametralmente opuestos.
10. Al finalizar, almacenar sobre hielo hasta el momento de la incubación.
11. Sembrar las células en cajas de cultivo de 6 pozos con 2 ml de medio DMEM suplementado con 10 % de SFB. El número de células depende de la eficiencia de formación de las colonias de cada línea celular; esta se ajusta a un número que permita el posterior conteo de las colonias como lo muestra la Tabla 4-2.

**Tabla 4—2:** Número de células sembradas por dosis de radiación y línea celular

Línea celular / Dosis de radiación	HeLa	EA.hy926
0 Gy	200 células	300 células
1 Gy	200 células	300 células

2 Gy	400 células	600 células
4 Gy	800 células	1200 células
6 Gy	1200 células	1800 células
8 Gy	1600 células	2400 células
10 Gy	2000 células	3000 células

12. Rotular las cajas con las dosis, el tipo de células y las condiciones de irradiación. Se muestra en la **Figura 4-2** la disposición de sembrado en las cajas de cultivo.



**Figura 4—2:** Disposición de sembrado en las cajas según dosis de radiación. La primera distribución fue repetida por triplicado. El número de células sembradas en cada uno de los pozos de 0 - 10 Gy es el mostrado en la tabla 4. En los pozos rotulados como 0 Gy x 2 se sembró el doble de número de células que el pozo a 0 Gy.

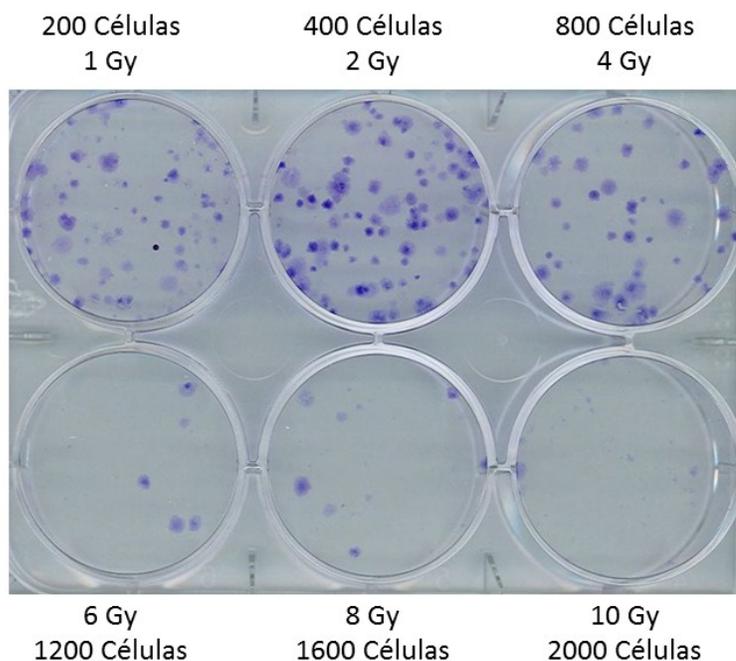
13. Verificar la presencia de células en cada pozo en el microscopio invertido, e incubar a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 14 días.
14. Verificar de manera regular el crecimiento de las colonias y descartar presencia de contaminación.
15. Al finalizar los 14 días, fijar y teñir las colonias utilizando violeta de metilo.

### 4.11.3 Fijación y tinción de colonias

Para este procedimiento inicialmente se retiró el medio y se lavó cada uno de los pozos 3 veces con PBS, se adicionó 2 ml de formaldehído al 8% en PBS 10X y se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la fijación de las células. Los pozos fueron lavados con H<sub>2</sub>O destilada y se adicionó 1 ml de solución de violeta de metilo (Violeta de metilo 10 mg/ml, Metanol 70% (v/v) y H<sub>2</sub>O 30 (v/v)). Se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y finalmente se recuperó el colorante y se lavó con abundante H<sub>2</sub>O, hasta eliminar todos los restos de colorante.

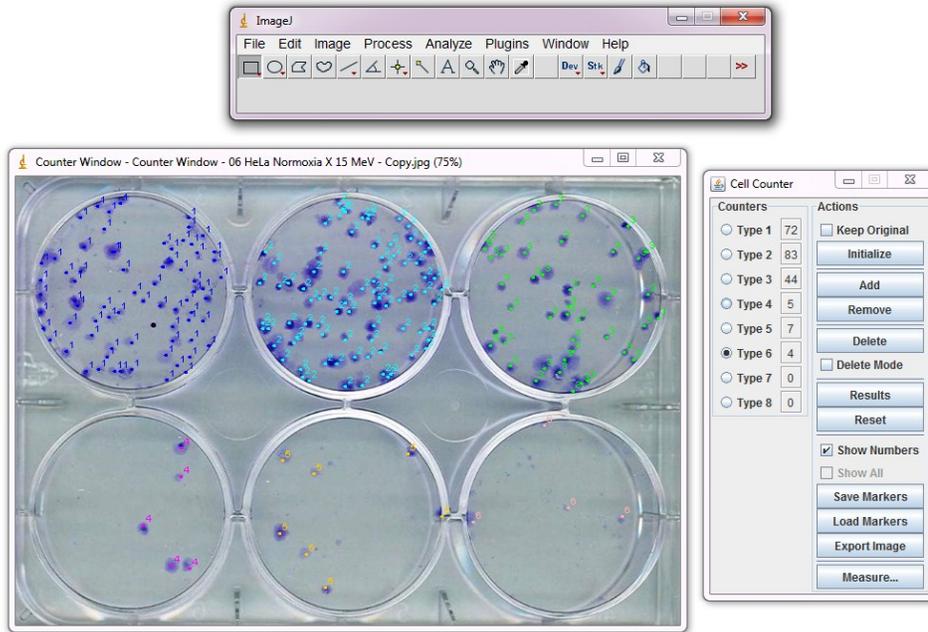
### 4.11.4 Conteo de colonias

Para el conteo del número de colonias se utilizó el software *ImageJ® Version 1.45s* con el *plug-in cell counting* especializado para este procedimiento. Este software requiere la imagen digital de las cajas de cultivo, por lo cual se escanearon las cajas de cultivo a una resolución de 200 DPI (**Figura 4-3**). La herramienta permite el conteo manual mediante el marcaje punto a punto de las colonias teñidas de la caja de cultivo de 6 pozos (**Figura 4-4**).



**Figura 4—3:** Caja de cultivo de células expuestas a radiaciones ionizantes.

Se observa el crecimiento de las colonias de células HeLa expuestas a diferentes dosis de radiación con fotones 15 MV. El número de células sembradas es diferente para cada uno de los pozos como se indica en los recuadros.



**Figura 4—4:** Conteo manual de colonias utilizando el software *ImageJ® Version 1.45s*

#### 4.11.5 Construcción de curvas de supervivencia

Para la reconstrucción gráfica de las curvas de supervivencia después del conteo de colonias se consideraron los parámetros previamente mencionados (Ver numeral 1.3.3 Curvas de supervivencia) de eficiencia de sembrado (**ES**), y fracción de supervivencia (**FS**) para cada una de las dosis utilizadas como lo muestra la **Tabla 4-3**.

**Tabla 4—3:** Obtención de parámetros de eficiencia de sembrado y fracción de supervivencia de acuerdo a diferentes dosis de irradiación.

	DOSIS DE IRRADIACIÓN						
	0 Gy	1 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy	10 Gy
<b>Número de células sembradas</b>	200	200	400	800	1200	1600	2000
<b>Numero de colonias</b>	75	72	83	44	5	7	4
<b>Eficiencia de</b>	37,5%	36,0%	20,8%	5,5%	0,4%	0,4%	0,2%

<b>sembrado</b>							
<b>Fracción de supervivencia</b>	1,0	0,960	0,553	0,147	0,011	0,012	0,005

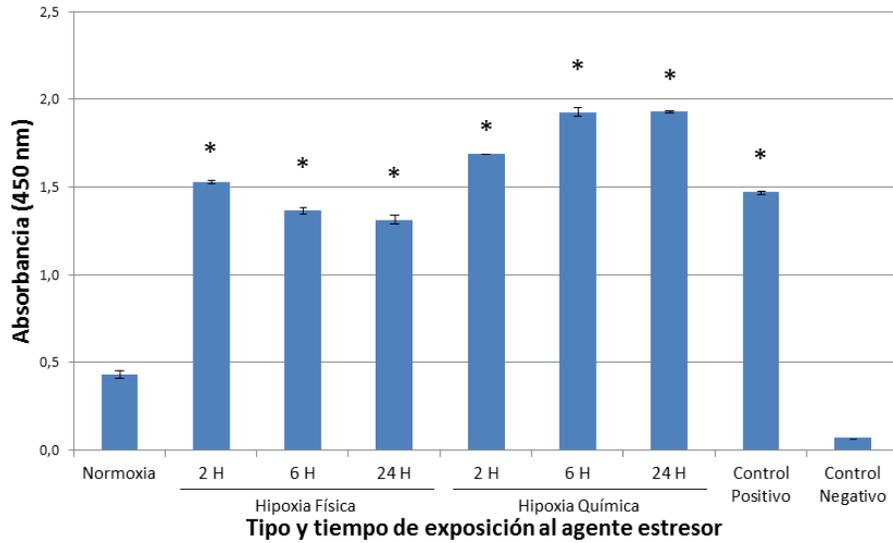
La información se analizó y procesó en el software OpenOffice<sup>R</sup> y Gnuplot<sup>R</sup> (Ambos de distribución libre), ajustando los datos al modelo lineal cuadrático el cual fue adoptado para todas las curvas de supervivencia por su universalidad y fácil manejo. Se obtuvo la media de la supervivencia y las desviación estándar a partir del triplicado de cada ensayo y tras la construcción de la curva, los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y la dosis letal 50 (DL50) para cada una de ellas.



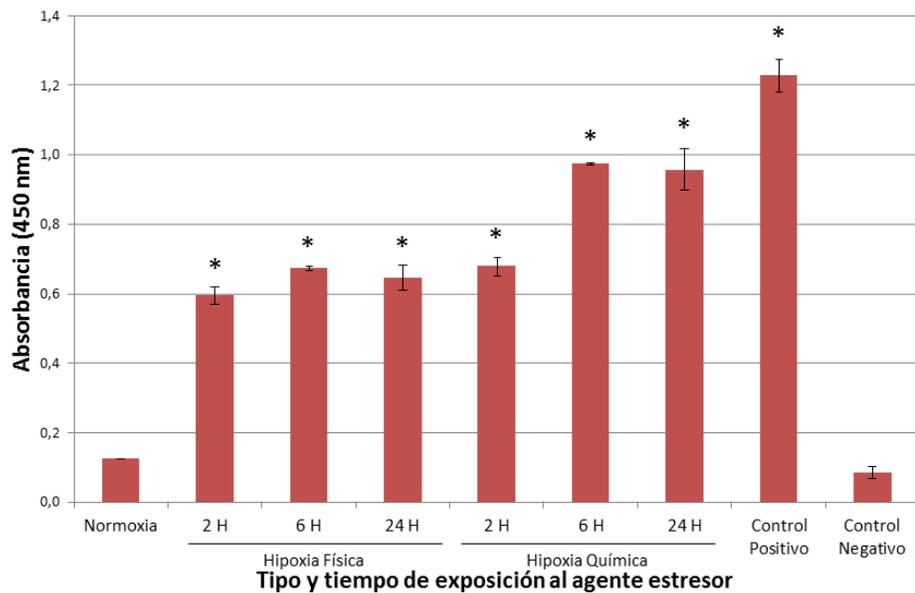
## 5. Resultados

### 5.1 Confirmación de las condiciones de hipoxia

Las condiciones de hipoxia física y química, se confirmaron por la activación de HIF-1 y su migración al núcleo en extractos nucleares de células Hela y EAhy.926. La absorbancia obtenida permitió ratificar que los cultivos celulares expuestos a condiciones de hipoxia física con concentraciones de oxígeno del 1% y química utilizando mesilato de deferoxamina (DFO) a una concentración de 100  $\mu$ M, presentaron concentraciones más altas de HIF-1 a nivel nuclear en relación con las células en normoxia (**Figura 5-1** y **Figura 5-2**). Para estos ensayos, se utilizó esta concentración de DFO debido a que se ha reportado que la respuesta celular bajo estas condiciones químicas es la que más se asemeja a las condiciones de hipoxia física con 1% de oxígeno. La hipoxia física activó el HIF-1 de manera temprana a partir de las dos horas con una ligera tendencia a disminuir a las 24 horas; por su parte la activación de HIF-1 tras la exposición a hipoxia química inició a las dos horas y continuó en aumento durante el tiempo del experimento. Se observó además que existe un incremento más pronunciado de HIF-1 en las células HeLa, y discretamente mayor bajo condiciones de hipoxia química en las dos líneas celulares.



**Figura 5—1:** Activación de HIF-1 en células HeLa bajo condiciones de hipoxia física y química. Para la hipoxia física las células se sometieron a concentraciones de O<sub>2</sub> del 1% y para hipoxia química se utilizaron concentraciones de 100 μM de DFO. Se realizó la extracción de proteínas nucleares y el HIF-1 se detectó por ELISA con el Kit TransAM™. Se realizó Prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en normoxia y cada una de las condiciones de experimentación. \* =  $p < 0.05$  Ver anexo 1 para mayor información.

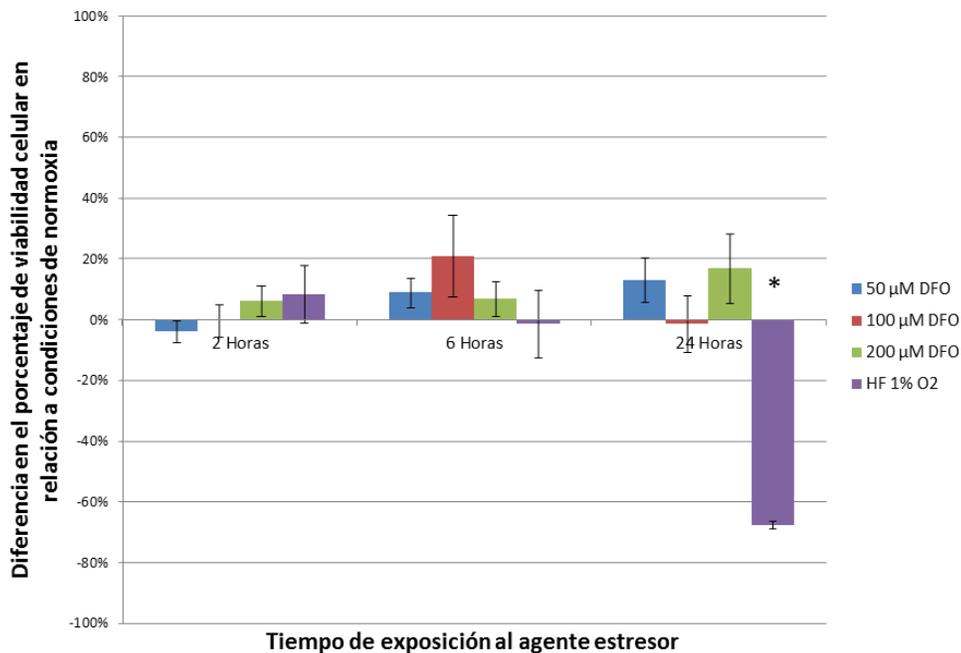


**Figura 5—2:** Activación de HIF-1 en células EA.hy926 bajo condiciones de hipoxia física y química. Para la hipoxia física las células se sometieron a concentraciones de O<sub>2</sub> del 1% y para hipoxia química se utilizaron concentraciones de 100 μM de DFO. Se realizó la extracción de proteínas

nucleares y el HIF-1 se detectó por ELISA con el Kit TransAM™. Se realizó Prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en normoxia y cada una de las condiciones de experimentación. \* =  $p < 0.05$  Ver anexo 1 para mayor información

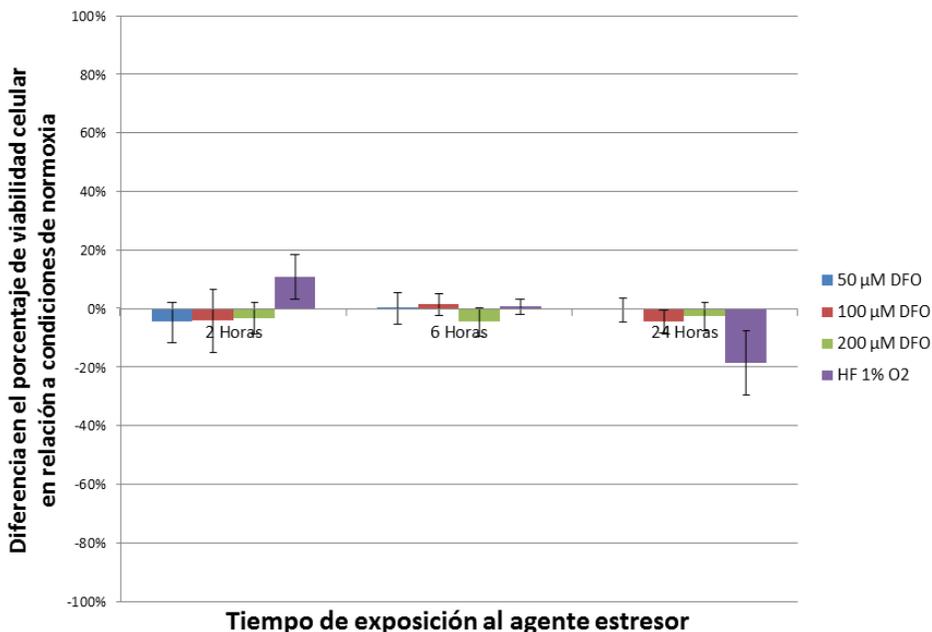
## 5.2 Citotoxicidad de las condiciones de hipoxia física y química

El efecto de la hipoxia física y química sobre la integridad o viabilidad de las células, se determinó por medio del ensayo de MTT. Para ello, se calcularon los porcentajes de viabilidad para las líneas HeLa y EA.hy926 como lo muestran la **Figura 5-3** y **Figura 5-4**. La supervivencia de las dos líneas celulares se mantiene constante en las condiciones y tiempos analizados, a excepción de la disminución drástica observada a las 24 horas para las células HeLa.



**Figura 5—3:** Viabilidad celular normalizada por ensayo de MTT en células HeLa.

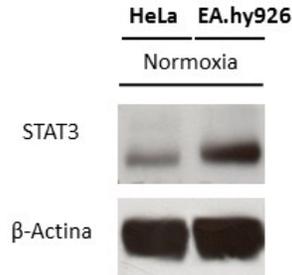
Se sembraron 25000 células en cajas de 96 pozos por 24 horas para permitir su adherencia, tras lo cual se sometieron a las condiciones de hipoxia mencionadas. La viabilidad se cuantificó por MTT en triplicado y se normalizó con respecto a células en normoxia con un 100% de viabilidad. Se realizó Prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en normoxia y cada una de las condiciones de experimentación. \* =  $p < 0.05$ . Ver anexo 1 para mayor información



**Figura 5—4:** Viabilidad celular normalizada por ensayo de MTT en células EA.hy926. Se sembraron 25000 células en cajas de 96 pozos por 24 horas para permitir su adherencia, tras lo cual se sometieron a las condiciones de hipoxia mencionadas. La viabilidad se cuantificó por MTT en triplicado y se normalizó con respecto a células en normoxia. Se realizó Prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en normoxia y cada una de las condiciones de experimentación. \* =  $p < 0.05$ . Ver anexo 1 para mayor información.

### 5.3 Las células HeLa y EA.hy926 expresan de manera constitutiva STAT3

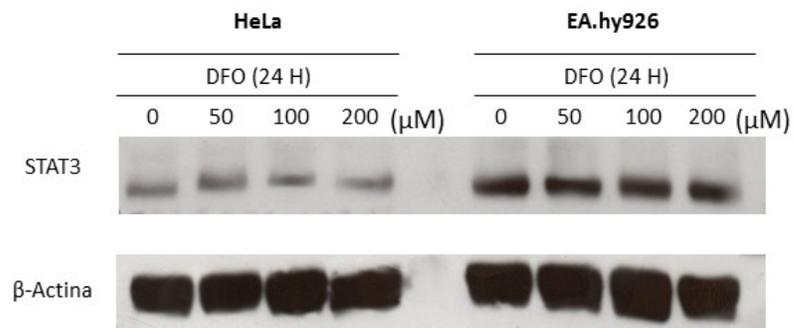
Las células se mantuvieron en condiciones de normoxia como se describe en la metodología y se analizó la presencia de STAT3 en los extractos totales. Los resultados evidencian la expresión de la proteína STAT3 en células HeLa y EAhy926 de manera constitutiva en condiciones de normoxia (**Figura 5-5**). Los resultados igualmente muestran diferencias en la cantidad de proteína expresada por los dos tipos celulares, encontrado una mayor expresión en las células EAhy926 con respecto a las células Hela.



**Figura 5—5:** Expresión de STAT3 en células HeLa y EAhy926 en condiciones de normoxia. Las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, se lisaron y los extractos totales se analizaron por *western blot* usando anti-STAT3 y como control de carga, anti-β-actina (Ver metodología para más detalles).

## 5.4 Las condiciones de hipoxia física y química no modifican la expresión de la proteína STAT3.

De acuerdo con los resultados previos que sugieren que las células EAhy926 expresan de manera constitutiva una mayor cantidad de la proteína STAT3 se analizó si bajo diferentes concentraciones del estresor químico, se modificaba o no la expresión de la proteína STAT3 (**Figura 5-6**). Los resultados no mostraron variaciones en la cantidad de proteína STAT3 expresada bajo diferentes condiciones de hipoxia química a las 24 horas, pero apoyan la observación previa que la cantidad de STAT3 expresada de manera constitutiva en células EAhy926 es mayor en relación con las células HeLa (**Figura 5-6**).

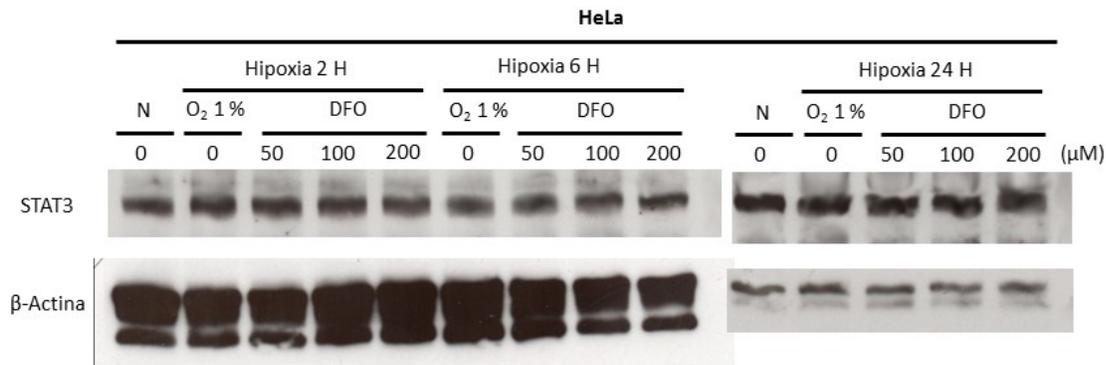


**Figura 5—6:** Expresión de STAT3 en líneas celulares HeLa y EAhy926 bajo diferentes concentraciones de hipoxia química.

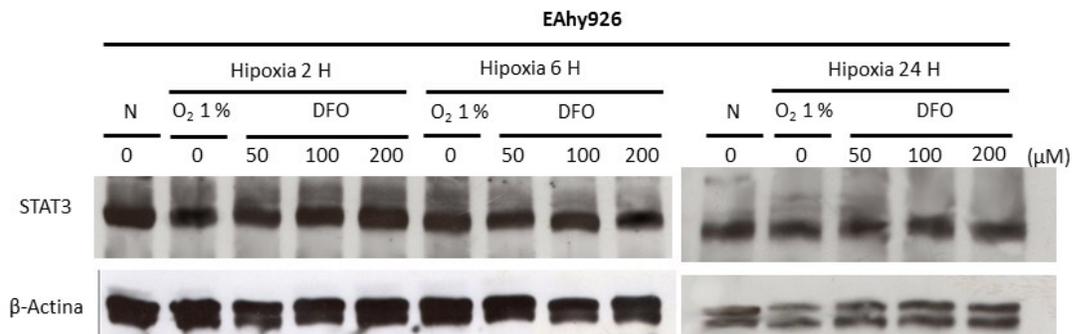
Las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, se sometieron por 24 horas a diferentes concentraciones de hipoxia química con mesilato de deferoxamina (DFO), se lisaron y los

extractos totales se analizaron por *western blot* usando anti-STAT3 y como control de carga, anti- $\beta$ -actina.

Con el ánimo de hacer una valoración de la expresión de STAT3 con respecto al tipo y duración del evento estresor, las células se sometieron a hipoxia física o a diferentes condiciones de hipoxia química durante 2, 6 y 24 horas. No se observaron cambios en la expresión de la proteína STAT3 para la línea HeLa (**Figura 5-7**), ni para la línea EAhy926 (**Figura 5-8**) bajo ninguna de las condiciones de estudio.



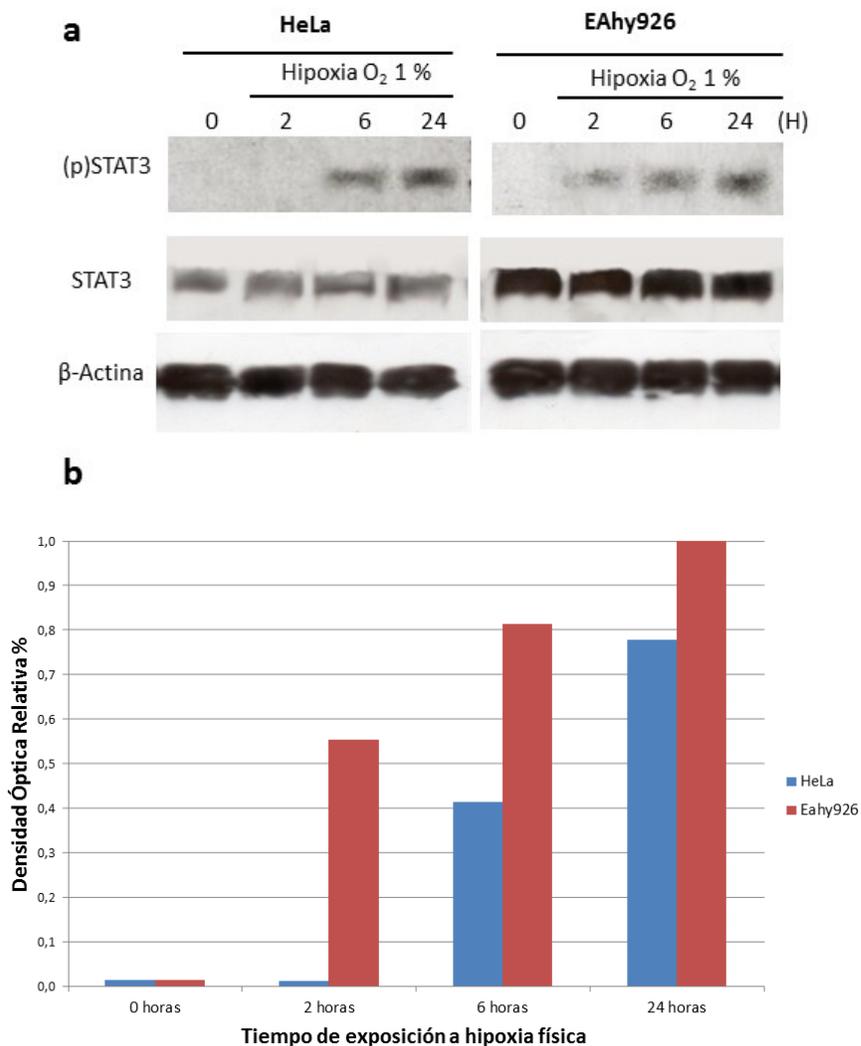
**Figura 5—7:** Expresión de STAT3 en células HeLa expuestas por 2, 6 y 24 horas a hipoxia física o química con diferentes concentraciones de mesilato de deferoxamina (DFO). Las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, se sometieron a hipoxia en las condiciones mencionadas, se lisaron y los extractos totales se analizaron por *western blot* usando anti-STAT3 y anti- $\beta$ -actina como control de carga.



**Figura 5—8:** Expresión de STAT3 en células EA.hy926 expuestas por 2, 6 y 24 horas a hipoxia física o química con diferentes concentraciones de mesilato de deferoxamina (DFO). Las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, se sometieron a hipoxia en las condiciones mencionadas, se lisaron y los extractos totales se analizaron por *western blot* usando anti-STAT3 y anti- $\beta$ -actina como control de carga.

## 5.5 Las condiciones de hipoxia modifican la activación de STAT3 en las líneas HeLa y EA.hy926

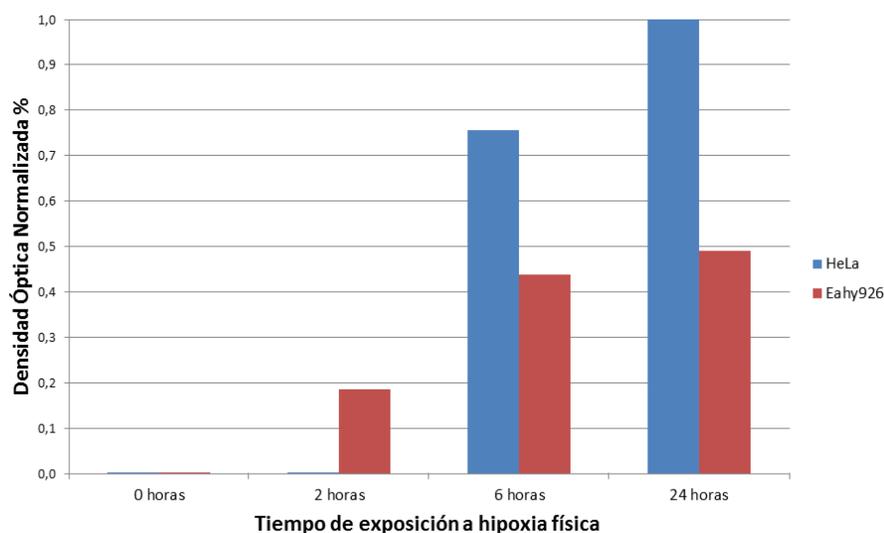
La inmunoprecitación de las proteínas fosforiladas con proteína G-sefarosa y anticuerpos anti-fosfotirosina permitió identificar que la hipoxia física induce cambios en la activación de la proteína STAT3 para los dos tipos celulares estudiados (**Figura 5-9 a**). Para las células HeLa se observó fosforilación de STAT3 a partir de las seis horas post-estímulo mientras que para las células EA.hy926 la fosforilación se detectó a las 2 horas. Se confirmó que bajo las mismas condiciones no existe cambio en la expresión de la proteína total STAT3. El análisis por densidad óptica relativa mostró que existe un incremento progresivo de la forma fosforilada de la proteína STAT3 dependiente del tiempo y por consiguiente de su activación (**Figura 5-9 b**).



**Figura 5—9:** Inmunodetección de (p)STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física.

(a) Activación de STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física. Para la detección de pSTAT3 en cada una de las muestras, se inmunoprecipitaron 500 µg de extractos totales con proteína G-sefarosa y anti-fosfotirosina clon PY20 y posteriormente se hizo la inmunodetección por *western blotting* con anti-STAT3. (b) Densidad óptica relativa de la forma fosforilada de STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física. Los resultados obtenidos en la inmunodetección de pSTAT3 se escanearon y procesaron con el software ImageJ (Version 1.44), los resultados obtenidos fueron normalizados con base en la expresión STAT.

Dado que la expresión de la proteína STAT3 es diferente en las dos líneas celulares analizadas, se normalizaron los valores de la proteína fosforilada (p)STAT3 obtenidos por densidad óptica relativa tomando en consideración los valores de STAT3. Se observó un mayor incremento de la proteína STAT3 fosforilada en las células HeLa, teniendo en cuenta las diferencias de expresión basal de la proteína, aunque estas solo fueron estadísticamente significativas a las 2 horas (**Figura 5-10**).

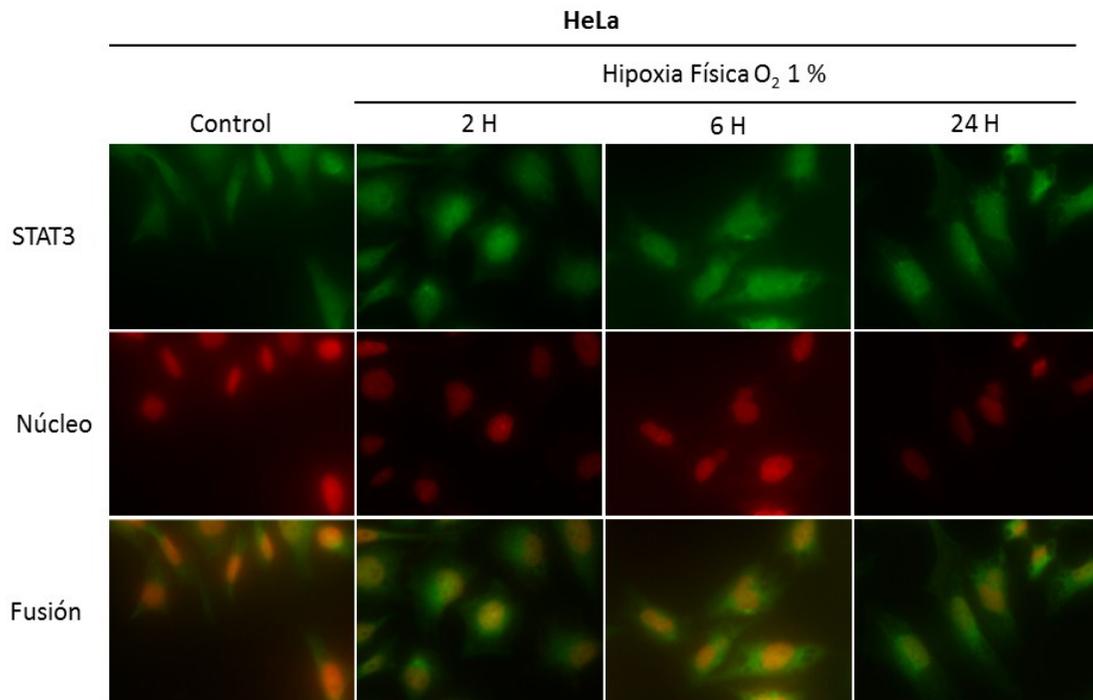


**Figura 5—10:** Diferencia en la fosforilación de STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física con normalización de la expresión de STAT3.

Los valores fueron normalizados tomando como referencia la relación entre la densidad óptica relativa de (p)STAT y STAT3 para cada una de las muestras.

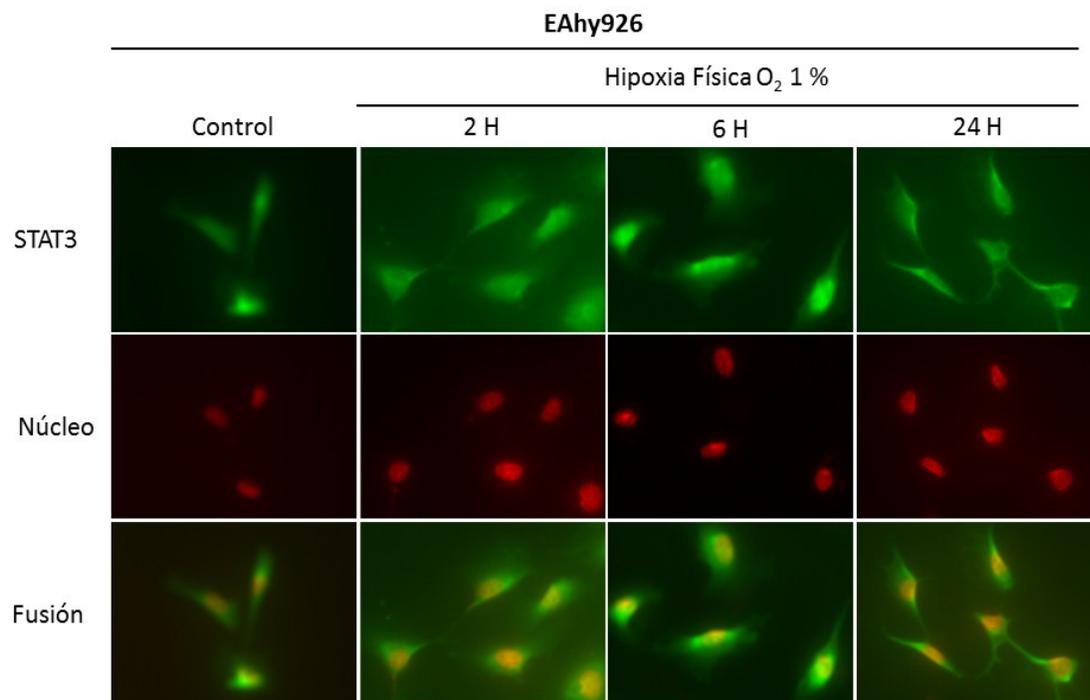
La activación de STAT3 por hipoxia física se confirmó por inmunocitoquímica usando anticuerpos inmunofluorescentes. En las células HeLa la translocación nuclear de STAT3 se observó con una intensidad moderada a las 2 horas y con mayor intensidad a las 6 y 24 horas (**Figura 5-11**), en las células EA.hy926 la translocación de STAT3 inició de

manera temprana desde las 2 horas, con un pico de mayor intensidad a las 6 horas y permaneció, más leve, hasta las 24 horas (**Figura 5-12**). La translocación nuclear de STAT3 no fue tan evidente bajo condiciones de hipoxia química con DFO 100  $\mu$ M en las células HeLa y EAhy926 bajo los tiempos de estudio (**Figura 5-13** y **Figura 5-14**). Los resultados fueron compatibles con el porcentaje de células que muestran translocación nuclear de la proteína de interés, encontrándose una diferencia significativa entre las condiciones de hipoxia química y física en todas las condiciones analizadas (**Figura 5-15**). Se encontraron además diferencias entre la localización nuclear de la proteína en las dos líneas celulares de estudio (**Figura 5-16**)



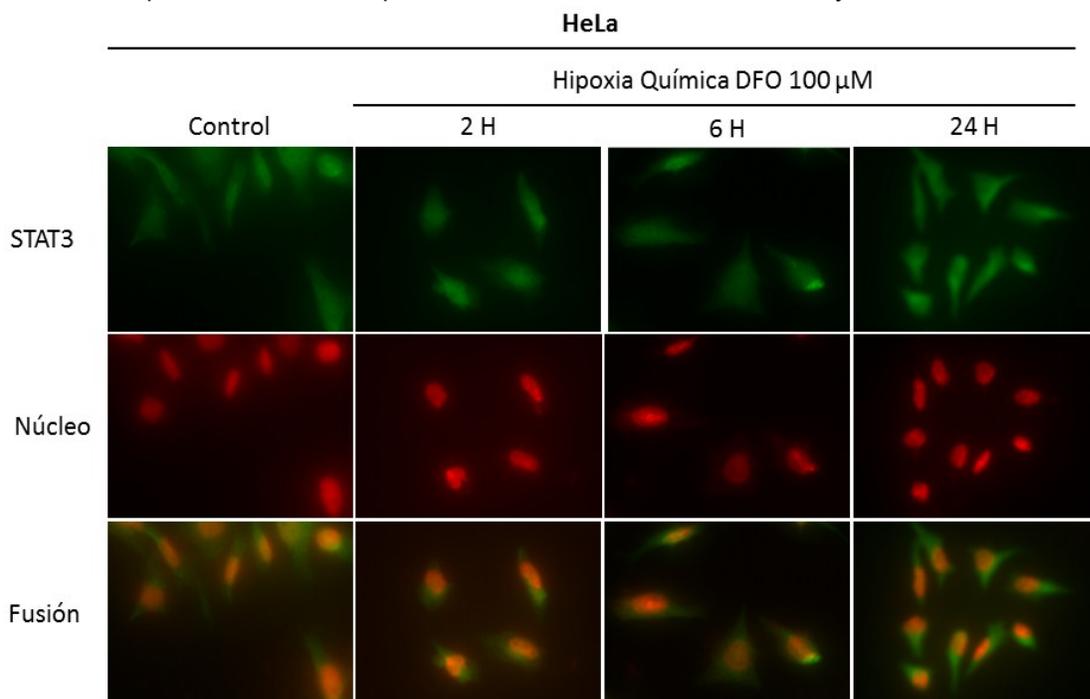
**Figura 5—11:** Sublocalización celular de STAT3 en células HeLa tras la exposición a hipoxia física.

Las células se cultivaron en portaobjetos y se sometieron 2, 6 y 24 horas a hipoxia física con 1% de O<sub>2</sub>. Se fijaron, permeabilizaron y posteriormente se detectó la proteína STAT3 por inmunocitoquímica con anticuerpos fluorescentes usando anti-STAT3 y Hoescht 33342.



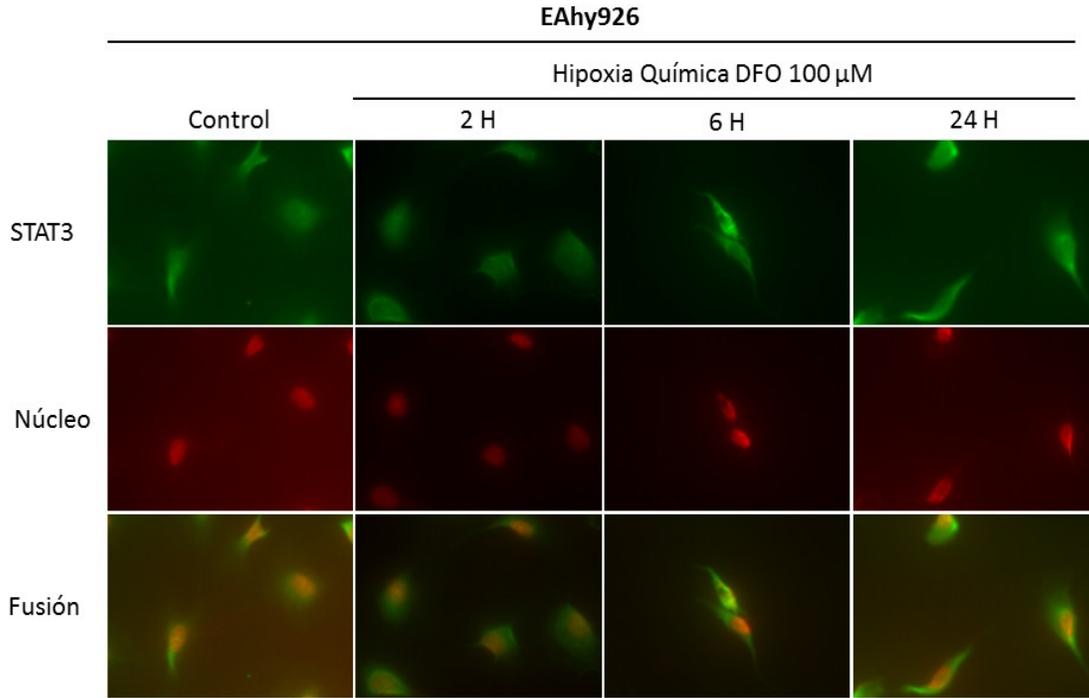
**Figura 5—12:** Sublocalización celular de STAT3 en células EAhy926 tras la exposición a hipoxia física.

Las células se cultivaron en portaobjetos y se sometieron 2, 6 y 24 horas a hipoxia física con 1% de O<sub>2</sub>. Se fijaron, permeabilizaron y posteriormente, se detectó la proteína STAT3 por inmunocitoquímica con anticuerpos fluorescentes usando anti-STAT3 y Hoescht 33342.



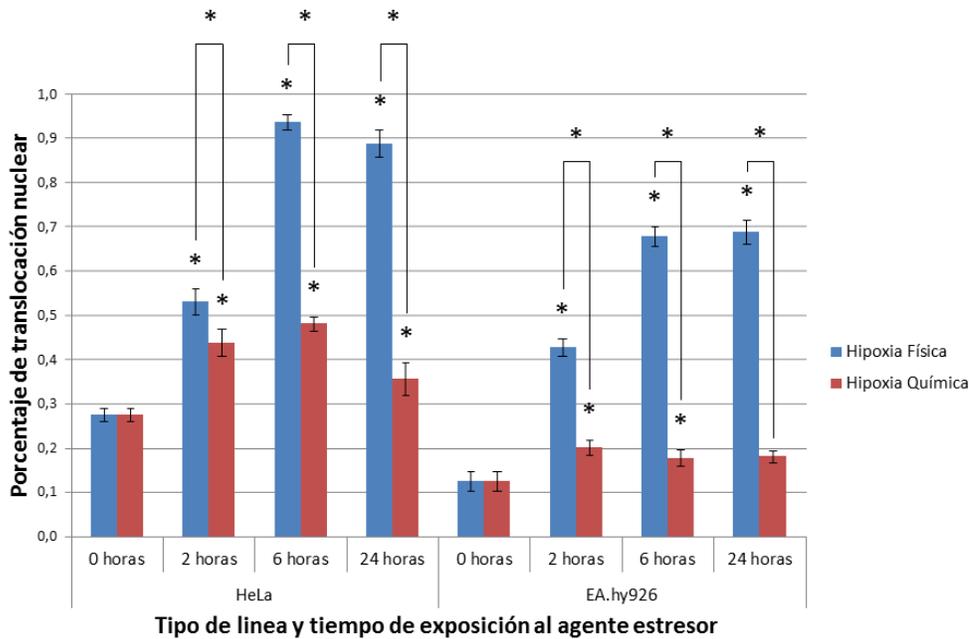
**Figura 5—13:** Sublocalización celular de STAT3 en células HeLa tras la exposición a hipoxia química (DFO 100  $\mu$ M).

Las células se cultivaron en portaobjetos y se sometieron 2, 6 y 24 horas a hipoxia química con mesilato de deferoxamina (DFO), 100  $\mu$ M. Se fijaron, permeabilizaron y posteriormente, se detectó la proteína STAT3 por inmunocitoquímica con anticuerpos fluorescentes usando anti-STAT3 y Hoescht 33342.



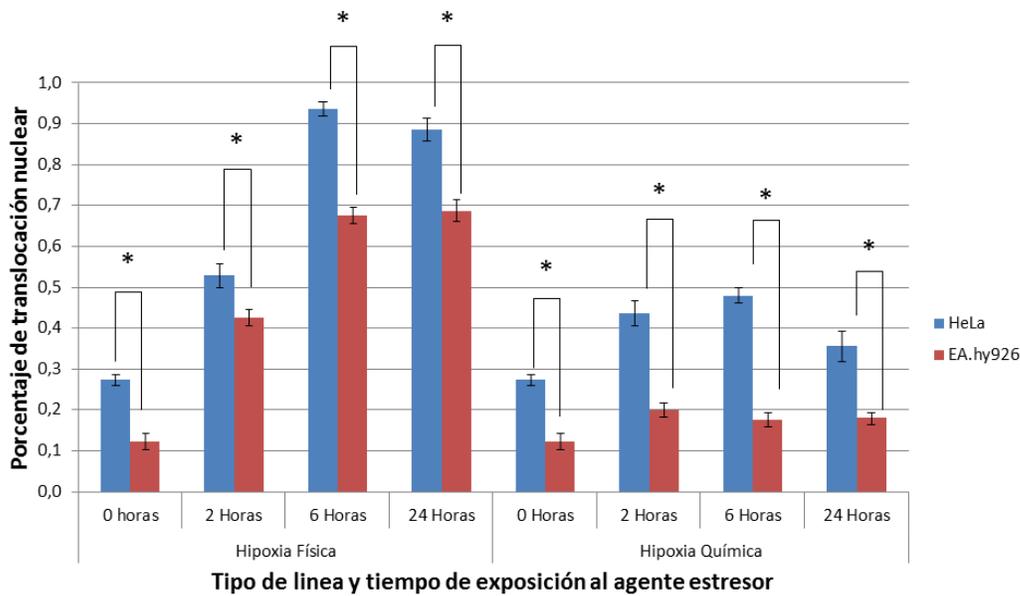
**Figura 5—14:** Sublocalización celular de STAT3 en células HeLa tras la exposición a hipoxia química (DFO 100  $\mu$ M).

Las células se cultivaron en portaobjetos y se sometieron 2, 6 y 24 horas a hipoxia química con mesilato de deferoxamina (DFO), 100  $\mu$ M. Se fijaron, permeabilizaron y posteriormente, se detectó la proteína STAT3 por inmunocitoquímica con anticuerpos fluorescentes usando anti-STAT3 y Hoescht 33342.



**Figura 5—15:** Porcentaje de translocación nuclear de la proteína STAT3 en células HeLa y EA.hy926 tras la exposición a hipoxia física e hipoxia química.

Las células se cultivaron en portaobjetos y se sometieron 2, 6 y 24 horas a hipoxia física y química con mesilato de deferoxamina (DFO), 100  $\mu$ M. Se contabilizó el número de células que presentaron translocación nuclear de la proteína de interés en 100 células por triplicado para cada una de las condiciones. Se realizó Prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en normoxia y cada una de las condiciones de experimentación, se comparó además los dos tipos de hipoxia para cada uno de los periodos analizados, en los dos casos, \* =  $p < 0.05$  Ver anexo 1 para mayor información.

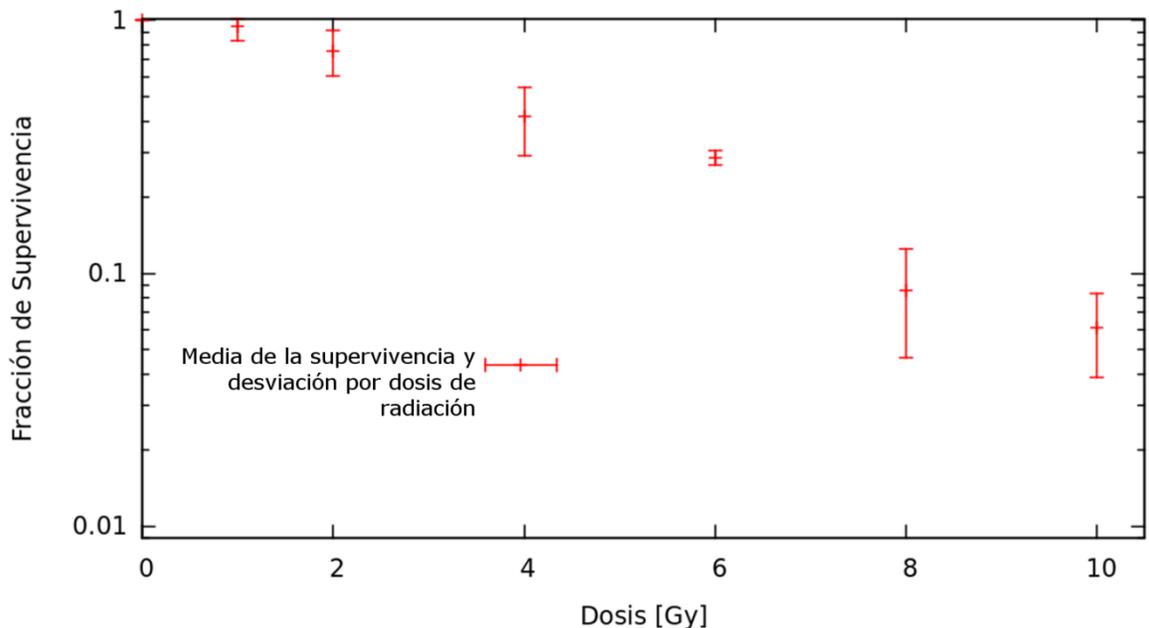


**Fig 5 – 16.** Comparación del porcentaje de translocación nuclear de la proteína STAT3 tras la exposición a hipoxia física e hipoxia química entre las líneas HeLa y EA.hy926.

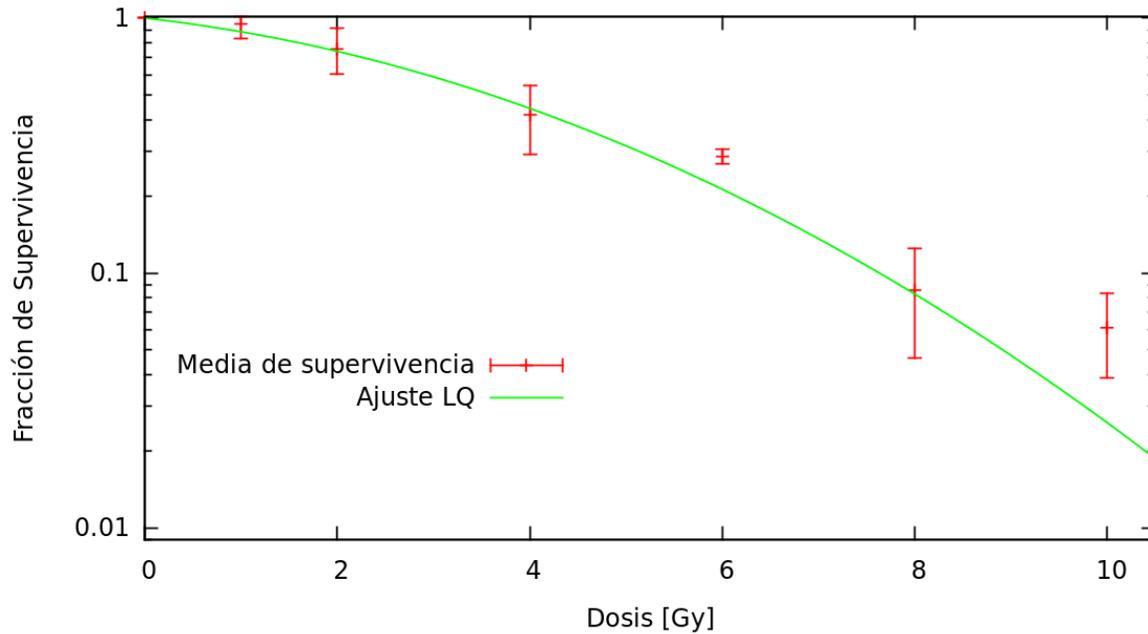
Las células se cultivaron en portaobjetos y se sometieron 2, 6 y 24 horas a hipoxia física y química con mesilato de deferoxamina (DFO), 100  $\mu$ M. Se contabilizó el número de células que presentaron translocación nuclear de la proteína de interés en 100 células por triplicado para cada una de las condiciones. Se realizó Prueba t para medias de dos muestras pareadas entre el control en normoxia y cada una de las condiciones de experimentación, se comparó además los dos tipos de hipoxia para cada uno de los periodos analizados \* =  $p < 0.05$  Ver anexo 1 para mayor información.

## 5.6 Construcción de las curvas de supervivencia: Obtención de parámetros $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha/\beta$ y D50

Después de haber obtenido los valores de fracción de supervivencia para las diferentes líneas celulares y condiciones de experimentación, como lo muestra el numeral **4.11.5** (Construcción curvas de supervivencia) se graficaron los datos con la variación de la media (**Figura 5-17**) para ser ajustada por medio de mínimos cuadrados al modelo lineal cuadrático (**Figura 5-18**) como la suma de dos funciones  $g(x) = f(x) + y(x)$ , siendo  $f(x)$  el componente lineal que da cuenta de los efectos letales y directos mientras que  $y(x)$  es el componente cuadrático que se relaciona con los efectos indirectos y subletales sobre las células, se muestra un ejemplo de un archivo de calibración en el **Anexo 2**. Para mas información ver el documento “Estudio in vitro de la supervivencia en células tumorales irradiadas con un acelerador lineal de uso clínico”<sup>139</sup>.



**Figura 5—17:** Media de supervivencia y desviación estándar de células HeLa irradiadas a diferentes dosis.



**Figura 5—18:** Ajuste modelo lineal cuadrático

Al realizar el ajuste inicial en el software Gnuplot®, se introdujeron valores cercanos a 1 para los valores  $\alpha$  y  $\beta$ , para así poder ajustar la función  $g(x)$  mediante las variables A y B a los datos encontrados; posteriormente, el software de manera iterativa encontró los valores que mejor se ajustaron a la mayoría de los datos, estableciendo la función más aproximada al comportamiento observado. El valor del  $\alpha/\beta$ , se tomó de la intersección de las funciones independientes  $f(x)$  y  $g(x)$  (**Figura 5-19**) y la dosis letal 50 fue calculada como la dosis a la cual, según el modelo lineal cuadrático, se reduce al 50% la fracción de supervivencia de las células en cultivo (**Figura 5-20**).

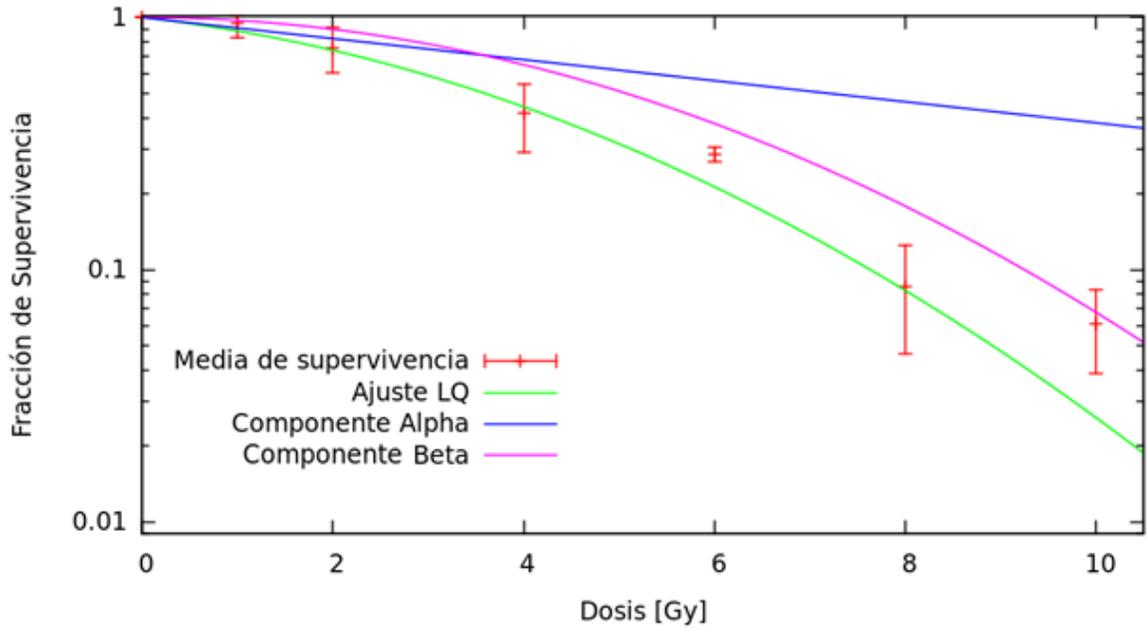


Figura 5—19: Componente  $\alpha$  (Lineal) y componente  $\beta$  (cuadrático).

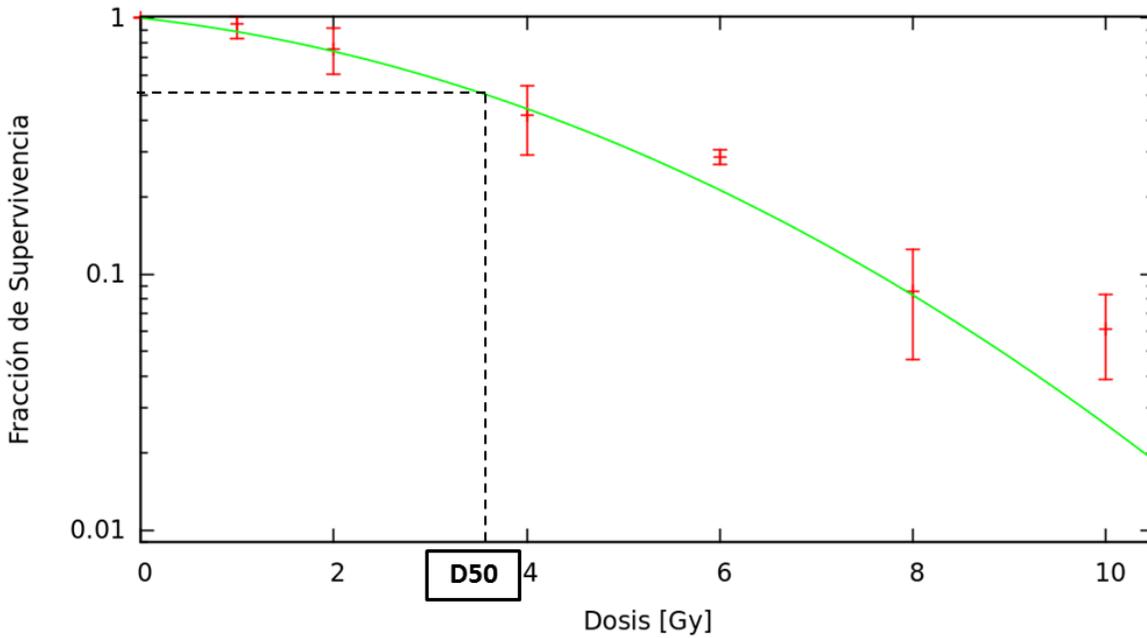


Figura 5—20: Dosis letal 50 (D50).

Se muestran a continuación los valores obtenidos para cada una de las líneas celulares y unidades de energía utilizadas en los ensayos (Tabla 5-1 y Tabla 5-2).

**Tabla 5—1:** Componente  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$ , D50, para células HeLa irradiadas con fotones a 6 y 15 MV.

	Fotones 6 MV			Fotones 15 MV		
	Normoxia	Hipoxia Física / Reox	Hipoxia Química / Reox	Normoxia	Hipoxia Física / Reox	Hipoxia Química / Reox
Alfa	0,108	0,071	0,207	0,034	0,080	0,150
Beta	0,061	0,050	0,060	0,064	0,065	0,048
Alfa/Beta	1,780	1,427	3,479	0,531	1,231	3,125
D50	2,60	3,14	2,06	1,87	2,67	2,51

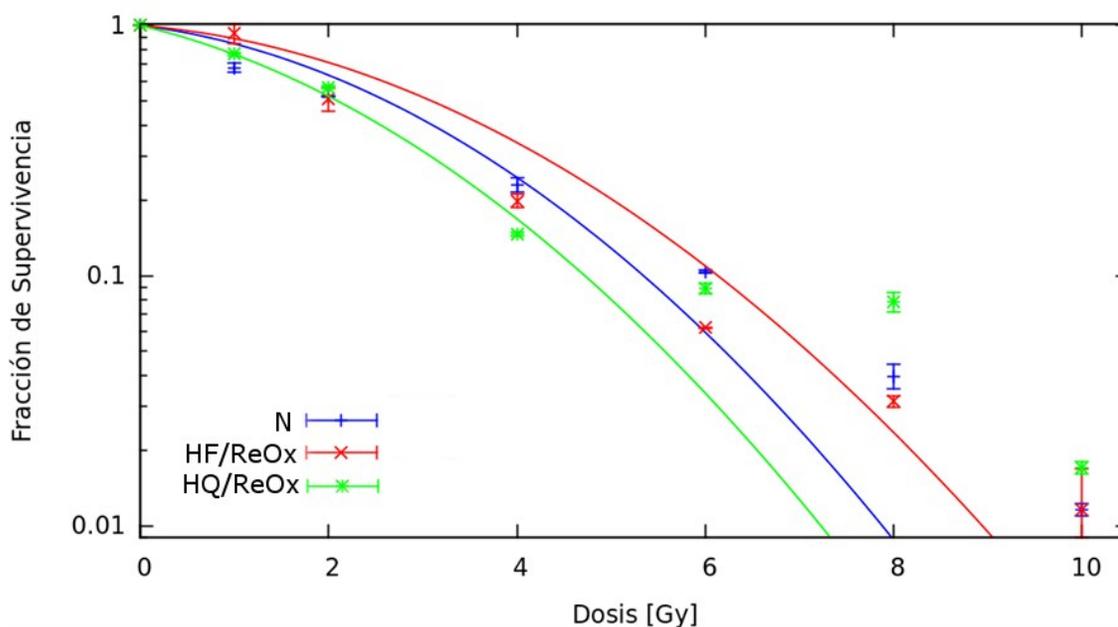
**Tabla 5—2:** Componente  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$ , D50, para células EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 y 15 MV.

	Fotones 6 MV			Fotones 15 MV		
	Normoxia	Hipoxia Física / Reox	Hipoxia Química / Reox	Normoxia	Hipoxia Física / Reox	Hipoxia Química / Reox
Alfa	0,099	0,259	0,706	0,223	0,294	0,521
Beta	0,098	0,089	0,000	0,099	0,096	0,055
Alfa/Beta	1,006	2,896	0,000	2,243	3,066	9,511
D50	2,18	1,69	0,99	1,72	1,54	1,16

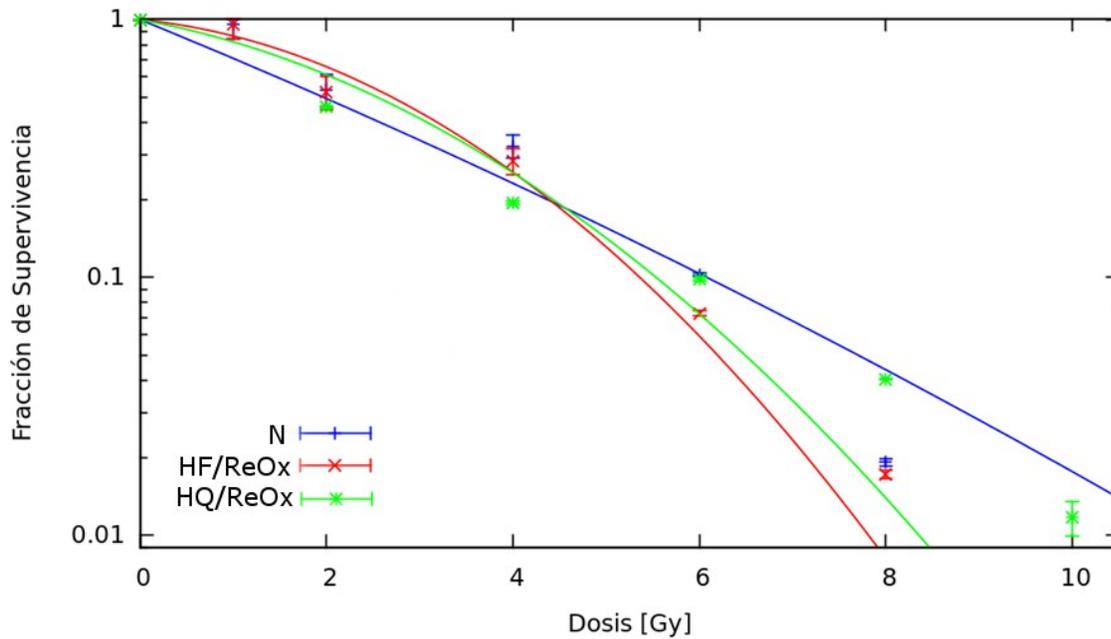
Se observó un D50 más bajo a mayores unidades de energía (15 MV) al comparar estos valores con 6 MV, en las dos líneas celulares estudiadas bajo condiciones de normoxia y de hipoxia física/reoxigenación, sugiriendo que mayores unidades de energía están asociados a menores dosis de radiación para alcanzar el mismo efecto biológico. Para las células HeLa las condiciones de hipoxia física/reoxigenación están asociadas a aumentos del valor D50, sugiriendo que se requieren mayores dosis de radiación para alcanzar el mismo efecto biológico, teniendo por lo tanto un efecto protector. Las condiciones de hipoxia química en estas células tuvieron diferentes efectos bajo las dos unidades de energía utilizadas. Para las células EAhy926 existe una disminución de los valores de D50 bajo condiciones de hipoxia física y química seguidas de reoxigenación, bajo las dos unidades de energía utilizadas sugiriendo que la hipoxia tiene un efecto sensibilizador para este tipo de células.

## 5.7 Curvas de supervivencia para líneas celulares HeLa y EA.hy926 en condiciones de normoxia, hipoxia física e hipoxia química

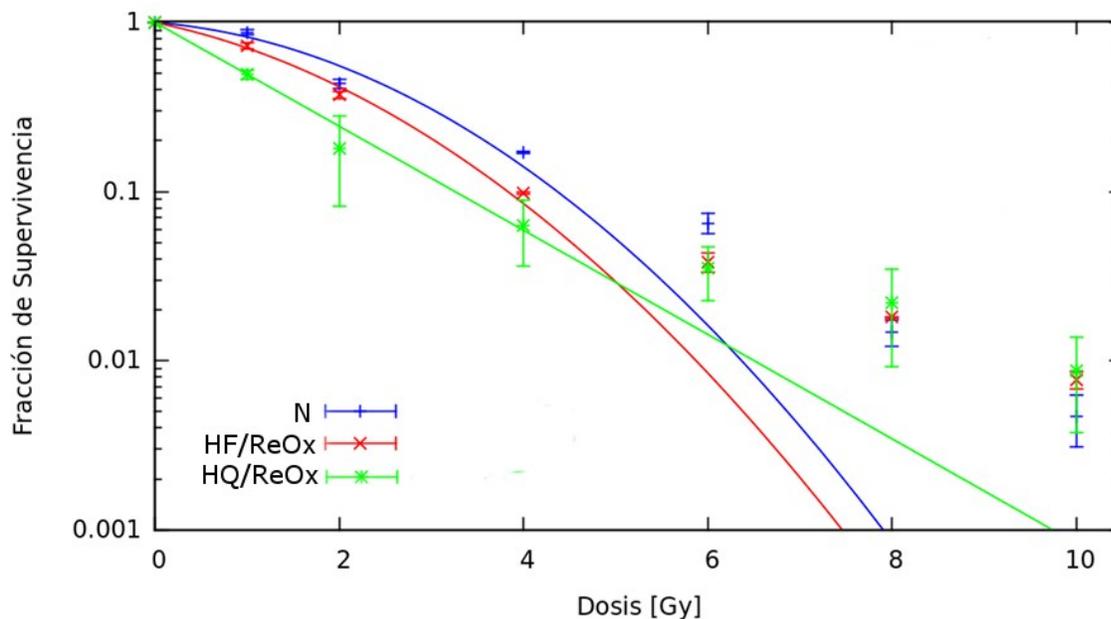
Tras la construcción de las gráficas y la obtención de los parámetros para cada una de las líneas celulares, se unificaron las curvas obtenidas con el fin de comparar el efecto de las condiciones de hipoxia y reoxigenación. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para células HeLa 6 y 15 MV (**Figura 5-21** y **Figura 5-22**), y células EA.hy926 6 y 15 MV (**Figura 5-23** y **Figura 5-24**). Es importante recordar que la construcción de la curva de supervivencia es producto de múltiples iteraciones para encontrar la función que más se aproxima a los resultados obtenidos, por lo que no necesariamente se debe ajustar de manera exacta a las medias y desviaciones estándar mostradas en las figuras.



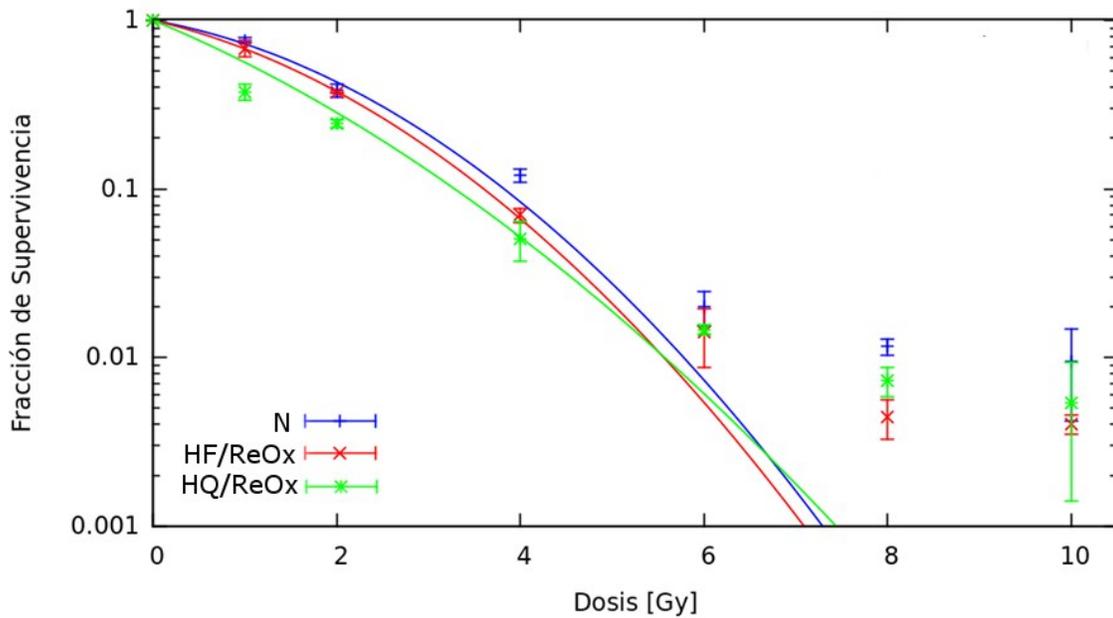
**Figura 5—21:** Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células HeLa con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 6 MV



**Figura 5—22:** Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células HeLa con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 15 MV

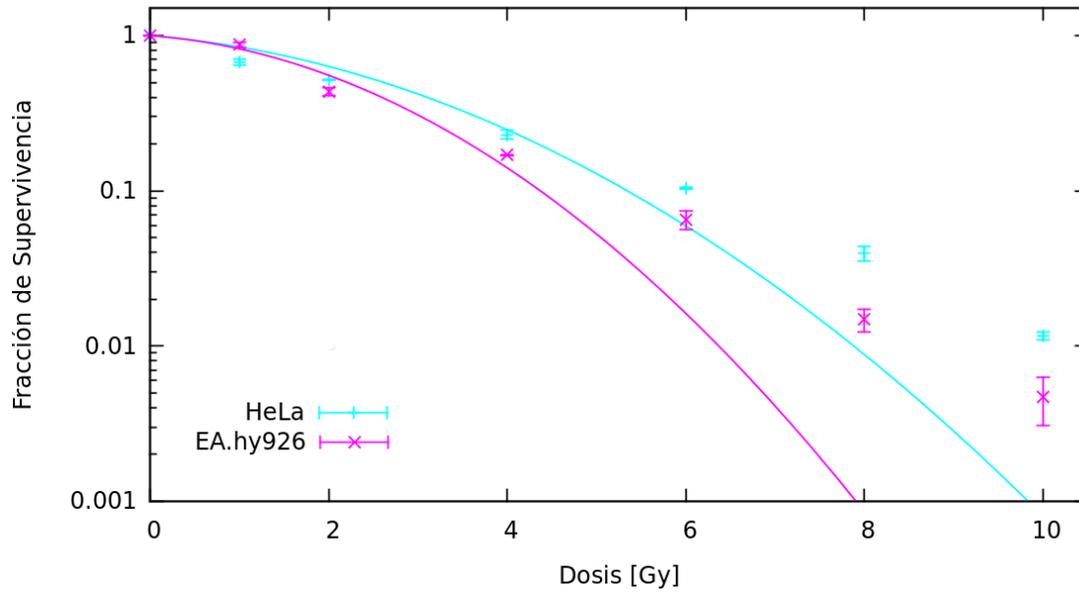


**Figura 5—23:** Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células EA.hy926 con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 6 MV

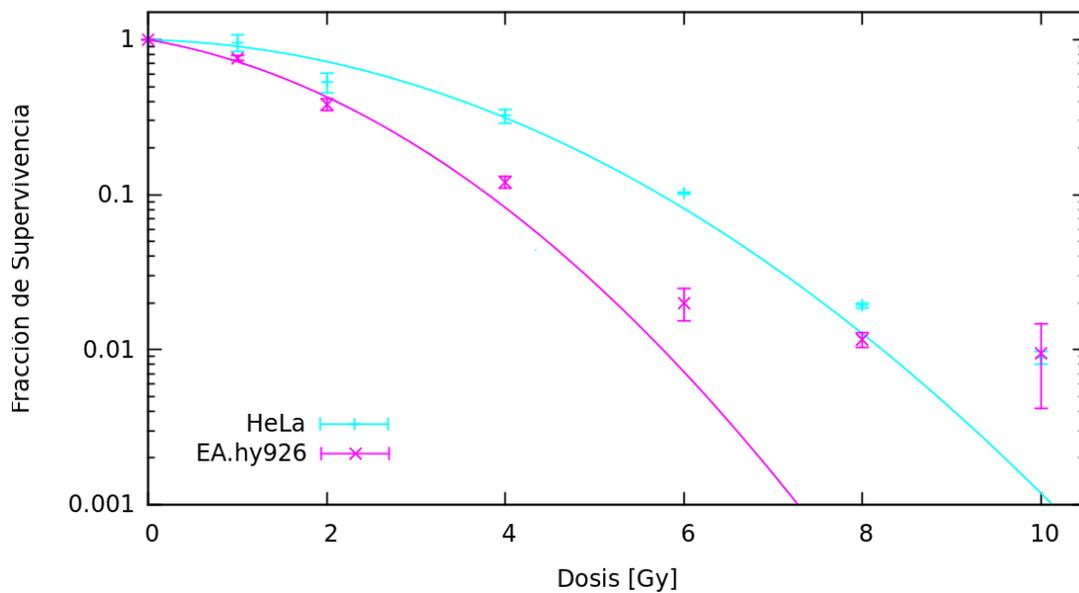


**Figura 5—24:** Curvas de supervivencia en condiciones de normoxia (N) e hipoxia física (HF) y química (HQ) de células EA.hy926 con posterior reoxigenación expuestas a radiaciones ionizantes, fotones a 15 MV

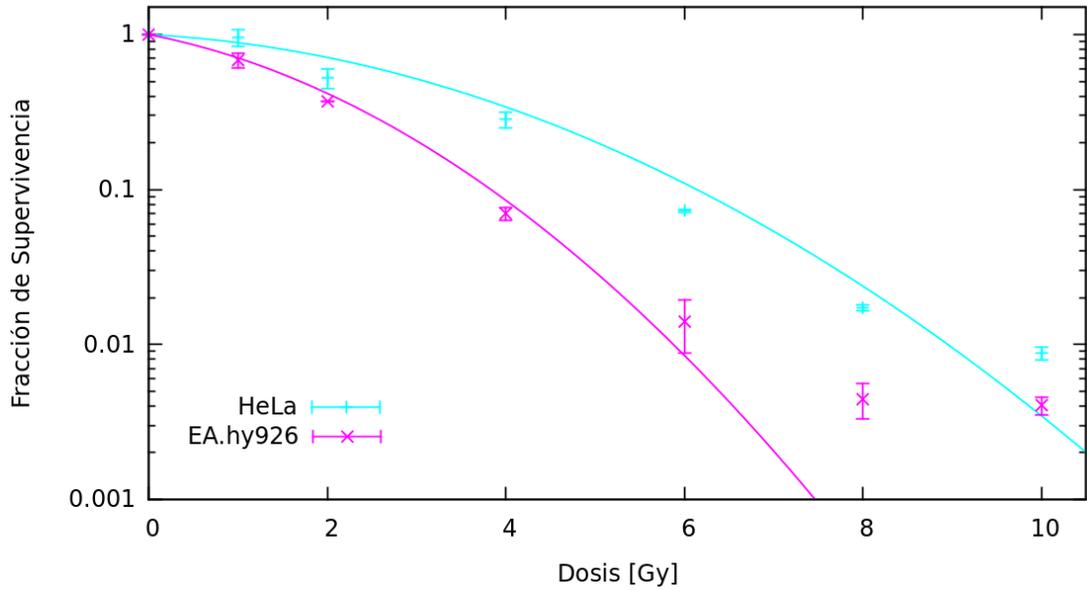
Finalmente se decidió comparar bajo las diferentes condiciones de experimentación el comportamiento en términos de supervivencia de las dos líneas celulares en condiciones de normoxia irradiadas a 6 y 15 MV (**Figura 5-25** y **Figura 5-26**), en hipoxia física a 6 y 15 MV (**Figura 5-27** y **Figura 5-28**), e hipoxia química 6 y 15 MV (**Figura 5-29** y **Figura 5-30**), con posterior reoxigenación.



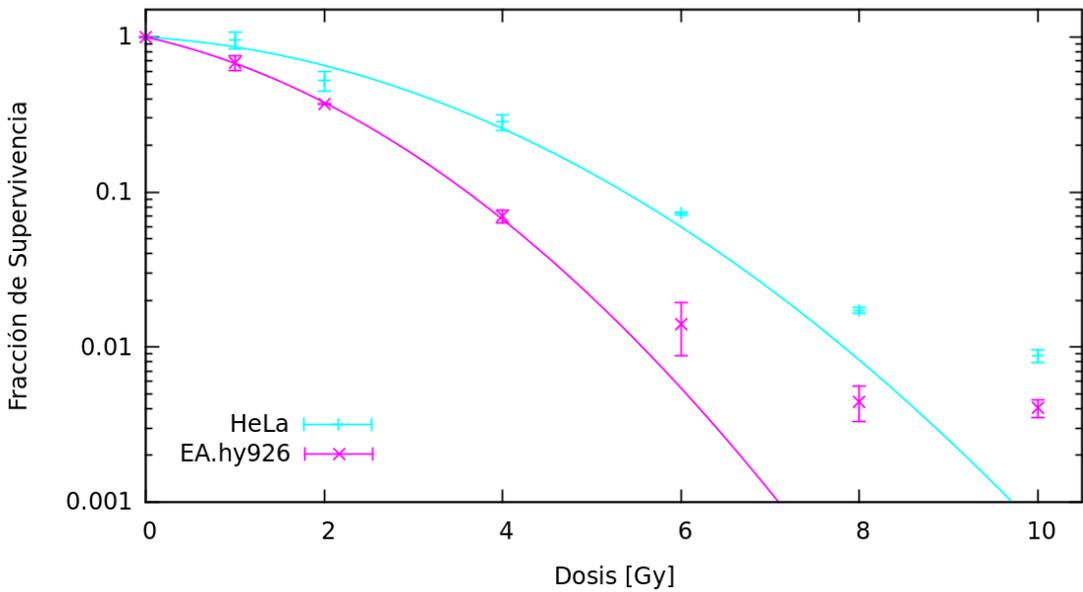
**Figura 5—25:** Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de normoxia en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 MV



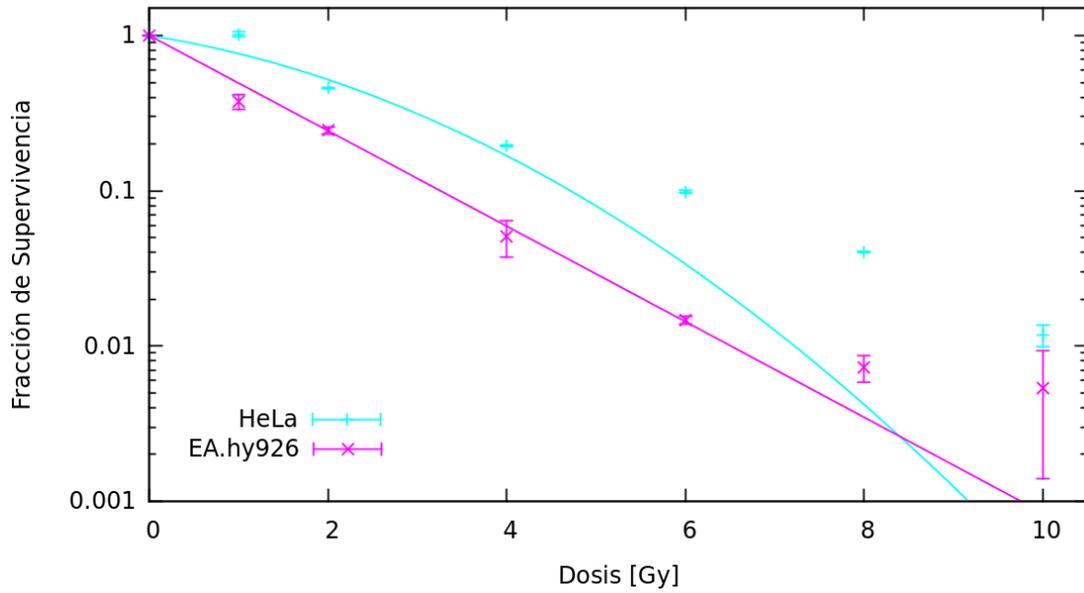
**Figura 5—26:** Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de normoxia en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 15 MV



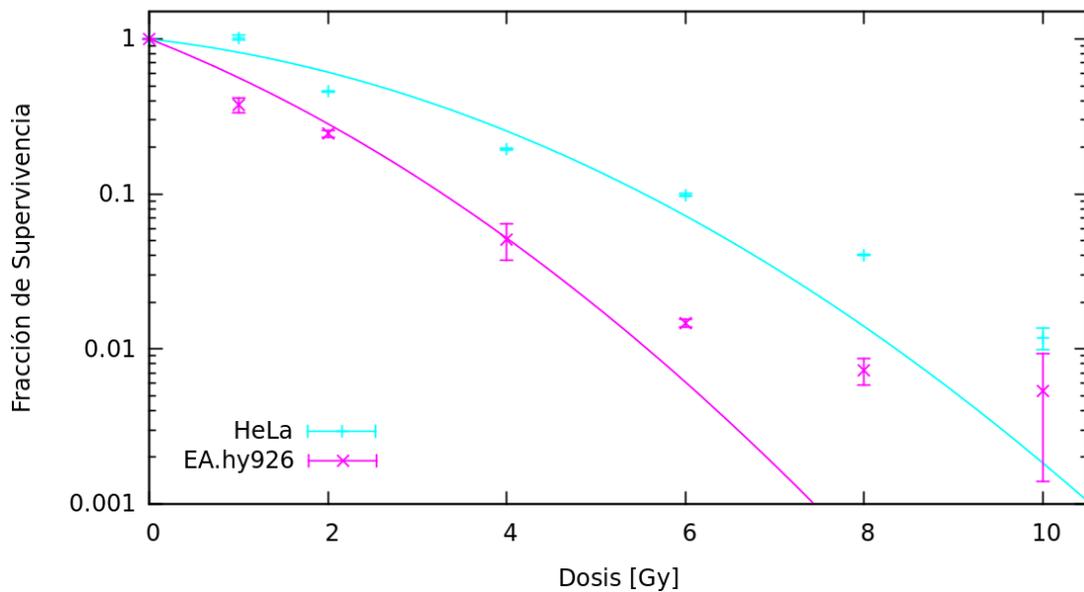
**Figura 5—27:** Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia física y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 MV



**Figura 5—28:** Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia física y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 15 MV



**Figura 5—29:** Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia química y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 6 MV



**Figura 5—30:** Comparación curvas de supervivencia bajo condiciones de hipoxia química y reoxigenación en células HeLa y EA.hy926 irradiadas con fotones a 15 MV

Al comparar las curvas se observa que la fracción de supervivencia de las células EA.hy926 es menor bajo diferentes dosis de irradiación en condiciones de normoxia, hipoxia física y química con las dos unidades de energía utilizadas.



## 6. Discusión

Los microambientes tumorales han cobrado una gran importancia en la comprensión del desarrollo del tumor y su respuesta frente a diferentes estímulos estresores y agentes terapéuticos<sup>16</sup>. Frente a un estímulo ambiental como es la disminución de las concentraciones de oxígeno, las células responden con diversos mecanismos de adaptación que incluyen activación de rutas de señalización molecular implicadas en la proliferación, angiogénesis y regulación metabólica. La activación aberrante de diversas vías de señalización en las células cancerosas ha sido asociada a modificaciones en la supervivencia y el crecimiento tumoral bajo condiciones de hipoxia. Adicionalmente, estas condiciones han mostrado tener un importante efecto sobre el pronóstico del paciente y la respuesta a diferentes formas de tratamiento.

El papel de HIF-1 $\alpha$  en la respuesta a la hipoxia ha sido considerado uno de los procesos críticos para iniciar la respuesta celular frente a este estímulo estresor<sup>140</sup>. La determinación de la activación de HIF-1 permitió confirmar que las concentraciones de oxígeno del 1% y del agente quelante del hierro, mesilato de deferoxamina (DFO) en las concentraciones utilizadas, inducen las condiciones de estrés celular y los valores encontrados muestran diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los obtenidos en condiciones de normoxia, por lo que representan modelos válidos de estudio. Aunque se han descrito efectos de citotoxicidad en varias líneas celulares, estos se han visto tras la exposición a hipoxia crónica a intervalos de tiempo mayores de 24 horas<sup>141,142</sup>, nuestras observaciones muestran que a excepción de las células HeLa expuestas a condiciones de hipoxia física durante 24 horas ( $p < 0.05$ ), las condiciones de hipoxia establecidas no tienen efectos citotóxicos para las células HeLa y EA.hy926 en los periodos de tiempo analizados.

Las rutas de señalización intracelular determinan la forma como una célula integra los estímulos recibidos por el medio ambiente y responde frente a estos mediante diferentes tipos de modificaciones a nivel de la expresión génica y proteica. Entre las rutas de

señalización implicadas en este proceso la vía JAK/STAT, ha demostrado tener un importante papel; las proteínas que hacen parte de esta vía son capaces de detectar una gran variedad de señales del entorno y transducirlas al núcleo, afectando directamente la regulación de la expresión génica<sup>143</sup>. Mientras la activación de estas proteínas es típicamente rápida, el tiempo que permanecen activas es reducido debido a mecanismos específicos de retroalimentación negativa. La activación aberrante y sostenida de esta vía se ha visto asociada a múltiples condiciones patológicas como inflamación crónica, respuestas inmunes anormales o cáncer<sup>144</sup>.

La primera evidencia del papel de la vía JAK/STAT en cáncer fue la identificación de una mutación activadora en la quinasa Hop de *Drosophila*, un miembro de la familia JAK, que causa un fenotipo similar a la leucemia<sup>145</sup>. La activación constitutiva de la vía JAK/STAT también se observó posteriormente en diferentes tipos de líneas celulares transformadas por oncogenes virales como *v-srcyv-Eyk*<sup>146</sup> y en tumores humanos en leucemia mielocítica crónica, aguda y en leucemia linfocítica aguda<sup>147</sup>. El hallazgo de la proteína fusión TEL-JAK2, una forma constitutivamente activa producto de una translocación cromosómica en leucemias humanas, ha mostrado el importante papel de las quinasas Janus en los procesos de desarrollo tumoral<sup>148</sup>. Aunque no se han observado mutaciones en los genes codificantes para las proteínas de la familia STAT en cáncer, se ha encontrado activación persistente y aberrante de estas proteínas en diversos tipos de cánceres humanos<sup>149</sup>, esto hace considerar que existen otras vías de señalización molecular o condiciones medio ambientales que afectan su activación. De las siete proteínas de la familia STAT, la STAT3 y la STAT5 han sido las más ampliamente vinculadas a procesos de desarrollo tumoral<sup>62,66</sup>.

La expresión de STAT3 es ubicua en un gran número de líneas celulares y se ha reportado para líneas celulares como NIH3T3, Hep3B, Caki-1 y HeLa<sup>150</sup>. En nuestro estudio se encontró expresión constitutiva de la proteína STAT3 tanto en la línea tumoral HeLa como en la línea endotelial EAhy926; en esta última, la mayor expresión de STAT3 encontrada puede ser debida a que esta línea es un híbrido entre células de adenocarcinoma de pulmón A459<sup>121</sup> y células endoteliales HUVEC, estas últimas con expresión constitutiva de esta proteína, reportada previamente por Liu y col en el 2005<sup>150</sup>, hecho que se correlaciona con los hallazgos en otras células no tumorales bajo condiciones fisiológicas<sup>151,152</sup>. Sin embargo, es prematuro concluir si esta variación en la

expresión es producto del fenotipo endotelial, del tumoral o de la sinergia entre los dos tipos celulares.

Tras someter a las líneas celulares a hipoxia física,  $[O_2]$  al 1%, e hipoxia química por DFO a concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  por 2, 6 y 24 horas no se observaron cambios en la cantidad de proteína STAT3 total. Se ha descrito que la activación de STAT3, al igual que otros miembros de esta familia no requiere degradación inducible por un inhibidor<sup>153</sup>, por lo que un estímulo que afecte esta vía puede mantener sin modificaciones la cantidad de proteína expresada, lo cual explicaría los resultados observados y plantea el análisis a futuro de su comportamiento a nivel de la expresión génica. Hallazgos previos en los que experimentalmente se incrementa la expresión de la proteína no activada en su forma silvestre han mostrado no tener un efecto sobre la progresión tumoral<sup>154</sup>.

STAT3 es considerada como una oncoproteína la cual se encuentra activa de manera constitutiva en cerca del 70% de tumores sólidos y hematológicos incluyendo mieloma múltiple, varios tipos de linfomas y leucemias, cáncer de seno, cabeza y cuello, cáncer de próstata, carcinoma de ovario, melanoma, carcinoma renal, carcinoma colorectal y tumores del epitelio tímico<sup>155</sup>. Aunque existen formas mutantes activas de manera constitutiva disponibles para investigación como STAT3C, la aparición de estas formas es extremadamente rara en cultivo<sup>156</sup>. Se ha observado que las células obtenidas a partir de tejidos tumorales que muestran activación constitutiva de STAT3 *in vivo* rápidamente pierden la fosforilación de STAT3 una vez son puestas en cultivo sin células estromales o del sistema inmune<sup>157</sup>. Esto lleva a considerar que la activación de STAT3 en cáncer es a menudo un resultado de la estimulación crónica por estímulos extracelulares presentes en el microambiente tumoral. Entre las moléculas que activan esta vía se han descrito citoquinas de las familias de la interleuquina 6 (IL-6, IL-11, oncostatina M, Factor inhibidor de leucemia (LIF), Factor neurotrófico ciliar (CNTF), IL-27, IL-35), y de la interleuquina 10 (IL-10, IL-22, IL-19 e IL-20), miembros de la familia del EGF, Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), VEGF, IL-23 e IL-21<sup>158</sup>.

La activación de STAT3 es producida por la fosforilación de un residuo crítico de tirosina en la posición 705 (Y705) que induce la dimerización de STAT a través del dominio de interacción SH2-fosfotirosina<sup>56</sup>. Adicional a este residuo, se ha descrito que la actividad transcripcional y la unión al ADN son reguladas por otras modificaciones

postransduccionales como la fosforilación de las serinas (S727)<sup>159</sup> y la acetilación reversible del residuo 685 de lisina<sup>160</sup>. La inmunoprecipitación de proteínas con residuos de tirosina fosforilada mostró que tras la estimulación por hipoxia física hay un incremento de las formas fosforiladas de la proteína STAT3 que inicia de manera temprana tras el estímulo estresor, alrededor de las 6 horas para las células HeLa y a las dos horas para las células EAhy926, sugiriendo que el estrés por hipoxia activa esta vía de señalización presuntamente por medio de la fosforilación de la Y705 de la proteína STAT3 tanto en células tumorales como en el modelo endotelial en estudio, cabe mencionar que además de los resultados obtenidos para confirmar estos hallazgos se hace necesario la realización de experimentos adicionales que detecten específicamente la fosforilación de este residuo como espectrometría de masas o uso de anticuerpos específicos.

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta permitieron confirmar la traslocación nuclear de la proteína tras el estímulo con hipoxia física en las células HeLa y EAHy926. Aunque para STAT3 se ha observado que la importación al núcleo puede ocurrir de manera independiente a la fosforilación de tirosinas en diferentes tipos celulares por medio de importina- $\alpha$ 3 sin estímulos externos<sup>150</sup>, nuestros resultados demuestran que la translocación de STAT3 se ve afectada por el tipo de línea celular utilizado, encontrándose mayor translocación en las tumorales con respecto a las endoteliales ( $p < 0.05$ ) y por las condiciones de hipoxia, prevaleciendo la física sobre la química ( $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que la proteína STAT3 se transloca al núcleo y además se fosforila en respuesta a la hipoxia física en las dos líneas anteriormente mencionadas. . Un estudio realizado por Jung *et al*<sup>161</sup>, reportó un incremento significativo de la fosforilación del residuo Y705 de la proteína STAT3 y su posterior translocación nuclear en células de carcinoma renal humano Caki I, apoyando los resultados obtenidos.

De manera interesante la translocación nuclear es menos marcada frente a la exposición a hipoxia química con mesilato de deferoxamina, aunque sigue mostrando diferencias significativas con respecto a su control en normoxia ( $p < 0.05$ ). El mesilato de deferoxamina es un agente quelante del hierro, cuyo mecanismo de acción es el bloqueo de la degradación de HIF-1 $\alpha$  inducido por la proteína VHL, causando su acumulación e imitando la respuesta celular producida bajo un ambiente hipóxico<sup>129</sup>. Diversos estudios

han mostrado la importante relación existente entre HIF-1 $\alpha$  y STAT3<sup>52,162,163</sup>, se ha encontrado que la forma fosforilada de STAT3 se une de manera directa a HIF-1 $\alpha$  y aumenta su estabilidad al impedir su unión a la proteína VHL y su posterior ubiquitinización y degradación<sup>164</sup>. Ensayos de coinmunoprecipitación han permitido identificar que la unión de STAT3 a HIF-1 $\alpha$  es específica para las formas fosforiladas y que la estimulación por citoquinas como IL-6 o LIF también está asociada con sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  incluso en condiciones normóxicas. Un estudio posterior mostró que la inducción cooperativa de STAT3 y HIF-1 está funcionalmente asociada a la adquisición de resistencia tumoral bajo condiciones de hipoxia<sup>165</sup>. Los resultados observados en la localización de la proteína en hipoxia física y química podrían ser producto de diferencias en la interacción entre HIF-1 $\alpha$  y STAT3 frente a estos dos estímulos estresores, lo cual debe ser ampliado en estudios posteriores.

La activación de STAT3 en respuesta a la hipoxia física se observó tanto en la línea celular tumoral como en la endotelial en estudio y si se tiene en cuenta que la hipoxia representa una característica común en tumores, el estrés hipóxico podría proveer una señal común que induce un prolongado incremento de la expresión angiogénica durante el proceso de tumorigénesis<sup>18</sup>. La alta tasa metabólica combinada con un flujo sanguíneo irregular y variable, limita la difusión de oxígeno y otros nutrientes al interior del tejido tumoral manifestándose como hipoxia y estrés celular. La respuesta a estos estímulos desemboca en un cambio del metabolismo celular, migración de las células endoteliales y angiogénesis<sup>166</sup>. Uno de los más potentes y específicos factores angiogénicos es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de manera independiente, HIF-1 $\alpha$  y STAT han sido implicados en su transcripción<sup>167</sup>; la región regulatoria del promotor de VEGF contiene también un elemento regulado por STAT3 que ha sido implicado en su transcripción. Otro aspecto destacable ha sido que la inhibición de STAT3 bloquea de manera significativa la expresión de VEGF inducida por hipoxia, demostrando el papel sinérgico que pueden tener estos dos factores de transcripción en el desarrollo angiogénico<sup>168</sup>.

Existe fuerte evidencia que sugiere que STAT3 contribuye a la transformación maligna y a la progresión tumoral por transactivación de genes blanco involucrados en eventos críticos del desarrollo tumoral incluyendo proliferación, supervivencia, auto-renovación, invasión y angiogénesis<sup>169</sup>. STAT3 parece ser crítico para todos estos procesos, ya que

su inhibición puede reducir e inhibir la progresión tumoral en modelos *in vitro*, mientras que su activación ha mostrado inhibir la apoptosis e inducir un fenotipo más agresivo a través de la activación de rutas de señalización específicas<sup>170-172</sup>. Un reciente estudio analiza el mecanismo por el cual la proteína STAT3 constitutivamente activa conduce a la inmortalización y contribuye de manera potencial a la transformación maligna y el mantenimiento del tejido tumoral en modelos murinos<sup>173</sup>. Entre los factores descritos se encuentran la protección contra la apoptosis por incremento en la expresión de genes anti-apoptóticos como bcl-2, bcl2-l1, bcl-3 y survivina, retraso de la senescencia e incremento de la tasa de proliferación asociadas al aumento de la expresión de c-myc y el aumento de la tasa de glicolisis aeróbica. Se resalta adicionalmente la importancia de la sobre-expresión de HIF-1 y el aumento de enzimas glicolíticas que favorecen un cambio en el fenotipo metabólico y la adaptación a la hipoxia inducida por la activación de STAT3.

STAT3 en células cancerosas no solo funciona como un mediador de la señalización intracelular sino que también afecta la interacción célula-célula. Se ha establecido que STAT3 modula de manera indirecta la comunicación entre células tumorales y células del sistema inmune<sup>157</sup>. De hecho una nueva molécula inhibidora de STAT3 ha sido reportada para revertir la tolerancia inmune en pacientes con gliomas malignos<sup>170</sup>. Considerando además el importante papel que esta molécula ha cobrado en procesos de angiogénesis y por nuestras observaciones, podemos afirmar que la mejora en el entendimiento de la activación de STAT3 por estímulos estresores del microambiente tumoral podría proveer una estrategia más efectiva de tratamiento del cáncer.

En este orden de ideas, el papel de las condiciones de hipoxia en la respuesta de las células cancerosas y su microambiente tiene una gran importancia para comprender el efecto biológico de diversas opciones terapéuticas en el manejo de cáncer<sup>174</sup>, como es el caso de la radioterapia.

Las células bajo condiciones hipóxicas son menos sensibles a la radiación, se han propuesto diversos factores que influyen en este fenómeno los cuales podrían estar actuando de manera simultánea y potencializando el efecto global<sup>175</sup>. Uno de los mecanismos más ampliamente aceptados es que el oxígeno molecular es fundamental para extender el daño causado por los radicales libres productos de radiaciones

ionizantes, haciendo a las células más sensibles a la radiación. Al reducir el número de células que se encuentran próximas a un vaso sanguíneo tras su exposición a la radiación ionizante, las células ubicadas en la periferia pueden alcanzar mayores concentraciones de oxígeno y ser más sensibles a la radiación en la siguiente dosis de radiación. Algunas de las moléculas críticas asociadas a este fenómeno son el factor HIF-1 $\alpha$ , VEGF, el óxido nítrico y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).

Entre las herramientas disponibles para evaluar la respuesta a la radiación ionizante, las curvas de supervivencia proveen una valiosa fuente de información ya que permiten evaluar la muerte reproductiva y por apoptosis, ambas de gran impacto para el control tumoral<sup>114</sup>. El presente trabajo permitió construir y comparar curvas de supervivencia en dos modelos celulares bajo condiciones de normoxia e hipoxia física y química utilizando fotones a 6 y 15 MV.

Es importante considerar que aunque las células en cultivo estuvieron expuestas a condiciones de hipoxia química o física, se irradiaron bajo condiciones de normoxia, por lo que en dicho momento el efecto biológico más aproximado correspondería a condiciones de reoxigenación. El efecto de la exposición a condiciones de hipoxia, ha mostrado tener diferentes efectos sobre la supervivencia celular al variar parámetros de exposición como el tiempo y las concentraciones de oxígeno antes, durante y después del estímulo estresor<sup>176</sup>. Estas observaciones junto con experimentos que evidencian el efecto de la hipoxia cíclica y la reoxigenación muestran que el efecto de la exposición a hipoxia no siempre corresponde a un efecto de radioprotección<sup>177,178</sup>. El comportamiento encontrado en las células HeLa tras la exposición a condiciones de hipoxia física a 6 y 15 MV, sugiere que se requiere una mayor dosis de radiación para alcanzar el mismo efecto biológico (D50) que en condiciones de normoxia sugiriendo que actúa como un agente radioprotector, mientras que para la línea celular EA.hy926 con las dos unidades de energía utilizadas y bajo los dos tipos de hipoxia se requirieron menores dosis de irradiación para alcanzar el mismo efecto biológico y son por lo tanto más radiosensibles tras la exposición a hipoxia. Estos resultados parcialmente contradictorios pueden ser explicados al considerar las diferencias en los comportamientos biológicos de las líneas celulares utilizadas durante los ensayos, entre los que se pueden incluir diferencias a nivel del genoma, la expresión génica, proteoma y comunicación intercelular<sup>179</sup>, aproximación que podría ser ampliada en futuros ensayos.

La respuesta de las células frente a diferentes calidades de radiación varía en términos de supervivencia<sup>97</sup>. Cuando se habla de calidades de radiación se tiene en cuenta el tipo de radiación, así como las unidades de energía o el espectro de energía con que cuentan estas. Es de esperar que altas unidades de energía muestren caídas más rápidas de la curva, siendo necesarias menores dosis para alcanzar daños letales y a medida que las unidades de energía disminuyen, la supervivencia se incrementa. Se observa este comportamiento al comparar las D50 bajo condiciones de normoxia e hipoxia física en las dos líneas analizadas, sin embargo en condiciones de hipoxia química no se observa la misma tendencia sugiriendo que el tipo de estrés hipóxico u otro factor modifica la respuesta de supervivencia a diferentes unidades de energía en las líneas utilizadas.

Al analizar la calidad del ajuste para las curvas se encontró que para muchas de ellas el ajuste no es estadísticamente satisfactorio, lo cual se observa en las diferencias entre la función y los valores encontrados. Estas diferencias pueden ser en parte debidas a que el modelo lineal cuadrático no se acopla muy bien a las regiones de altas dosis, esta observación ha sido descrita previamente y ha llevado a que las consideraciones biológicas en tratamientos de radiocirugía y radioterapia estereotáxica, en los cuales se deposita una gran dosis, generalmente mayor a 5 - 6Gy, en fracciones únicas sean ampliamente cuestionadas<sup>180</sup>. Teóricamente la supervivencia para dosis altas sigue una línea recta más pronunciada que demuestra el mayor daño letal de las células debido al incremento de la dosis ya que se aumenta el número de partículas que podrían impactar en los blancos de la célula ampliando la probabilidad que ocurran mayores efectos letales<sup>97</sup>. Para llevar este modelo a las regiones de dosis en cuestión existen varios métodos alternativos que parten de razonamientos matemáticos y funciones con ecuaciones diferenciales. Uno de estos modelos es el modelo lineal cuadrático cúbico en donde se mantienen los mismos  $\alpha$  y  $\beta$  para dar sentido biológico al comportamiento inherente de las células en el rango respectivo de supervivencia a ciertas dosis, y se incorpora un término  $\gamma$  a la fracción cúbica de la nueva función.

Los  $\alpha/\beta$  reportados en la literatura para tejidos no-tumorales se encuentran entre 7 y 20<sup>97</sup>, es importante tener en cuenta dos consideraciones en los valores obtenidos la primera es que se ha descrito que estos valores no son constantes y pueden variar ampliamente de acuerdo con la energía, la naturaleza de la radiación, el equipo utilizado y el modelo

biológico escogido<sup>97</sup>, la segunda consideración es que para tejidos tumorales se ha descrito valores mucho mas amplios.

En algunos de los casos los parámetros  $\alpha$  o  $\beta$  son cercanos a 0, lo que impide el cálculo de los valores  $\alpha/\beta$ , estos valores pueden ser resultado de la incertidumbre introducida durante el conteo en la cámara de Neubauer y/o a la recolección o sembrado de células en las cajas de cultivo.

El estudio del modelo celular endotelial mostró resultados correlacionados con hallazgos previos de la literatura. Uno de los mecanismos por los cuales la radioterapia causa regresión tumoral, involucra la destrucción de la vasculatura tumoral y un daño extenso a este nivel<sup>181</sup>. Diversos estudios han mostrado que la respuesta de las células endoteliales tanto en tejidos normales como tumorales determina en gran medida los efectos de la radiación ionizante<sup>174</sup>. La pérdida de las células endoteliales posterior a la irradiación con altas dosis en modelos murinos, ha demostrado tener un gran impacto en la toxicidad del tejido normal y tumoral<sup>182</sup>. De manera muy interesante se ha sugerido con base en la observación de células endoteliales intestinales que existe una apoptosis masiva de estas células en respuesta a altas dosis de radiación causando una profunda alteración en la irrigación que conduce a la muerte de células madre en las criptas intestinales. Nuestras observaciones muestran pendientes mas pronunciadas y D50 menores al compararlo con la línea tumoral analizada, sugiriendo una mayor radiosensibilidad intrínseca de esta línea bajo todas las condiciones de experimentación.

El endotelio vascular ha sido reconocido como un componente crítico de la respuesta a la irradiación de manera dependiente e independiente a las condiciones de oxigenación tumoral. Se ha considerado que la terapia coadyuvante con agentes anti-angiogénicos puede mejorar la respuesta a quimio y radioterapia<sup>183</sup>. El tratamiento con terapia anti-angiogénica podría potenciar la respuesta frente a la radioterapia al tener un impacto tanto sobre células endoteliales como tumorales, disminuyendo la dosis y minimizando el daño tisular. Los mecanismos por los cuales alteraciones en el endotelio vascular modifican la respuesta a la radioterapia continúan siendo motivo de investigación. La combinación de radiación ionizante con angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis ha mostrado inducir muerte celular endotelial principalmente por muerte mitótica<sup>184</sup>. Estudios adicionales muestran que la radiación ionizante también induce

muerte por apoptosis<sup>32</sup>. Aunque algunos tipos de células pueden ser inherentemente resistentes a la apoptosis inducida por radiación, otras células muestran una respuesta apoptótica variable de acuerdo con las condiciones del microambiente, entre los que se han involucrado hipoxia y diversos factores de señalización como VEGF y bFGF<sup>185</sup>. Nuestros resultados sugieren diferencias en el comportamiento de las curvas de supervivencia para diferentes líneas celulares, destacando la importancia del modelo celular endotelial, de las unidades de energía y la exposición a condiciones de hipoxia en la respuesta celular frente a las radiaciones ionizantes.

## 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los microambientes tumorales han cobrado un importante papel dentro del proceso de desarrollo tumoral. La presencia de células endoteliales así como los estímulos provenientes de las diversas condiciones ambientales y en este caso específico, los cambios en las concentraciones de oxígeno (hipoxia-reoxigenación) pueden jugar un papel crítico en este proceso por medio de la activación de la vía JAK/STAT y la modificación de la supervivencia tras la exposición a radiaciones ionizantes. Nuestros resultados permiten concluir que:

- Las condiciones de hipoxia física y química analizadas durante el estudio inducen la estabilización de HIF-1 de manera temprana y su translocación nuclear a partir de las dos horas del estímulo hipóxico en las dos líneas celulares.
- La línea HeLa y la línea de células endoteliales EAhy926 mantienen inalterada la expresión de la proteína STAT3 bajo condiciones de hipoxia física y química con mesilato de deferoxamina a las 2, 6 y 24 horas.
- La hipoxia física es un importante estímulo estresor en las dos líneas celulares de estudio produciendo activación de la proteína STAT3 por fosforilación y translocación nuclear.
- La traslocación de la proteína STAT3 hacia el núcleo se induce mayoritariamente en las células HeLa sometidas a hipoxia física y química comparada con las células EAhy926.
- Existen diferencias en la translocación nuclear de STAT3 en las líneas celulares de estudio entre condiciones de hipoxia física y química.
- Existe un comportamiento coherente de la supervivencia de las células que obedece al modelo lineal cuadrático para regiones de bajas dosis. El ajuste se pierde en la mayoría de los casos a dosis superiores a 5–6 Gy, por lo que se debe considerar la implementación de un modelo alternativo que describa el comportamiento observado a altas dosis.

- La hipoxia física y química modifica la respuesta celular en términos de supervivencia actuando como agentes radiosensibilizadores o radioprotectores de acuerdo con las características de la energía, el periodo de exposición al agente estresor y la línea celular utilizados.
- El comportamiento diferencial de las células endoteliales en relación con las líneas cancerosas analizadas destaca la importancia del estudio de la respuesta celular frente a estímulos estresores del microambiente tumoral.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, los siguientes esfuerzos estarán enfocados a ampliar nuestras observaciones sobre otras líneas tumorales y aunque la línea EA.hy926 ha sido un modelo endotelial ampliamente utilizado hemos también considerado utilizar una línea endotelial primaria para apoyar nuestras observaciones. El papel de otros miembros de la familia STAT como STAT1 y STAT5, las proteínas JAK y de proteínas corriente arriba de esta vía, también se ha considerado de gran interés en el proceso oncogénico por lo que podrían constituir interesantes moléculas de estudio y potenciales blancos terapéuticos. El análisis más detallado de condiciones de hipoxia / reoxigenación variando los intervalos de exposición y las concentraciones de oxígeno podrían brindar información adicional para comprender la respuesta celular tanto a nivel de vías de señalización como de supervivencia celular. Dado que entre los principales intereses del grupo de investigación se encuentra el estudio de la respuesta celular frente a diferentes tipos de estrés, trabajos futuros también buscan analizar la interacción de las vías de señalización en respuesta a radiaciones ionizantes e hipoxia en un modelo multicelular que integre las condiciones tumorales *in vivo* para comprender y mejorar las opciones terapéuticas disponibles actualmente.

## Bibliografía

1. Farmer, P. *et al.* Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action. *Lancet* **376**, 1186–93 (2010).
2. Mathers, C. D. & Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS medicine* **3**, e442 (2006).
3. World Health Organization *The Global burden of Disease : 2004 Update*. 8–13 (World Health Organization: Geneva, 2008).
4. Ferlay, J. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **127**, 2893–917 (2010).
5. Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 69–90 (2011).
6. Organización Panamericana de la Salud *Indicadores Básicos 2010: Situación de Salud en Colombia*. (2011).at <<http://www.minproteccionsocial.gov.co/Documentos y Publicaciones/Indicadores Básicos 2010.pdf>>
7. Grupo Vigilancia Epidemiológica del Cáncer INC *Mortalidad por cáncer según primeras causas y sexo, Colombia 2000-2009*. (2011).at <<http://www.cancer.gov.co/documentos/Mortalidad/Mortalidad nacional por tipo de cáncer 2000-2009.pdf>>
8. Varmus, H. The new era in cancer research. *Science (New York, N.Y.)* **312**, 1162–5 (2006).
9. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine* **10**, 789–99 (2004).
10. Cao, Y., Depinho, R. a, Ernst, M. & Vousden, K. Cancer research: past, present and future. *Nature reviews. Cancer* **11**, 749–754 (2011).
11. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
12. Gatenby, R. a & Gillies, R. J. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nature reviews. Cancer* **8**, 56–61 (2008).

13. Hanahan, D. & Weinberg, R. a Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
14. Littlepage, L. E., Egeblad, M. & Werb, Z. The Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Cancer Research* **14**,
15. Liotta, L. a & Kohn, E. C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* **411**, 375–9 (2001).
16. Joyce, J. a Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer cell* **7**, 513–20 (2005).
17. Sullivan, R. & Graham, C. H. Hypoxia-driven selection of the metastatic phenotype. *Cancer metastasis reviews* **26**, 319–31 (2007).
18. Brahimi-Horn, M. C., Chiche, J. & Pouyssegur, J. Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **85**, 1301–7 (2007).
19. Liao, D. & Johnson, R. S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer metastasis reviews* **26**, 281–90 (2007).
20. Kenneth, N. S. & Rocha, S. Regulation of gene expression by hypoxia. *The Biochemical journal* **414**, 19–29 (2008).
21. Tatum, J. L. *et al.* Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy. *International journal of radiation biology* **82**, 699–757 (2006).
22. Vaupel, P. & Harrison, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *The oncologist* **9 Suppl 5**, 4–9 (2004).
23. Russell, J. *et al.* Immunohistochemical detection of changes in tumor hypoxia. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **73**, 1177–86 (2009).
24. Malec, V. *et al.* HIF-1 alpha signaling is augmented during intermittent hypoxia by induction of the Nrf2 pathway in NOX1-expressing adenocarcinoma A549 cells. *Free radical biology & medicine* **48**, 1626–35 (2010).
25. Martinive, P. *et al.* Preconditioning of the tumor vasculature and tumor cells by intermittent hypoxia: implications for anticancer therapies. *Cancer research* **66**, 11736–44 (2006).
26. Hendriksen, E. M. *et al.* Angiogenesis, hypoxia and VEGF expression during tumour growth in a human xenograft tumour model. *Microvascular research* **77**, 96–103 (2009).
27. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307 (2011).

28. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews. Cancer* **3**, 401–10 (2003).
29. Fukumura, D. & Jain, R. K. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvascular research* **74**, 72–84 (2007).
30. Ahmed, Z. & Bicknell, R. Angiogenic signalling pathways. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **467**, 3–24 (2009).
31. Keith, B. & Simon, M. C. Tumor Angiogenesis. *Nature* (1945).
32. Kobayashi, H. & Lin, P. C. Antiangiogenic and radiotherapy for cancer treatment. *Histology and histopathology* **21**, 1125–34 (2006).
33. Melillo, G. Targeting hypoxia cell signaling for cancer therapy. *Cancer metastasis reviews* **26**, 341–52 (2007).
34. Vaupel, P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The oncologist* **9 Suppl 5**, 10–7 (2004).
35. Semenza, G. L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* **20**, 51–6 (2010).
36. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399–408 (2012).
37. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **3**, 721–32 (2003).
38. Lendahl, U., Lee, K. L., Yang, H. & Poellinger, L. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nature reviews. Genetics* **10**, 821–32 (2009).
39. Pouyssegur, J., Dayan, F. & Mazure, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* **441**, 437–43 (2006).
40. Carroll, V. A. & Ashcroft, M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert reviews in molecular medicine* **7**, 1–16 (2005).
41. Ryan, H. E., Lo, J. & Johnson, R. S. HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *The EMBO journal* **17**, 3005–15 (1998).
42. Maxwell, P. H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8104–9 (1997).
43. Stoeltzing, O. *et al.* Role of hypoxia-inducible factor 1alpha in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *Journal of the National Cancer Institute* **96**, 946–56 (2004).

44. Tang, N. *et al.* Loss of HIF-1 $\alpha$  in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer cell* **6**, 485–95 (2004).
45. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* **16**, 4604–13 (1996).
46. Kelly, B. D. *et al.* Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circulation research* **93**, 1074–81 (2003).
47. Heinzman, J. M., Brower, S. L. & Bush, J. E. Comparison of angiogenesis-related factor expression in primary tumor cultures under normal and hypoxic growth conditions. *Cancer cell international* **8**, 11 (2008).
48. Mizukami, Y. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-independent regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia in colon cancer. *Cancer research* **64**, 1765–72 (2004).
49. Calvani, M., Rapisarda, A., Uranchimeg, B., Shoemaker, R. H. & Melillo, G. Hypoxic induction of an HIF-1 $\alpha$ -dependent bFGF autocrine loop drives angiogenesis in human endothelial cells. *Blood* **107**, 2705–12 (2006).
50. Yoshida, D., Kim, K., Noha, M. & Teramoto, A. Hypoxia inducible factor 1- $\alpha$  regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *Journal of neuro-oncology* **76**, 13–21 (2006).
51. Schmidt, D. *et al.* Critical role for NF- $\kappa$ B-induced JunB in VEGF regulation and tumor angiogenesis. *The EMBO journal* **26**, 710–9 (2007).
52. Xu, Q. *et al.* Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* **24**, 5552–60 (2005).
53. Kizaka-Kondoh, S., Inoue, M., Harada, H. & Hiraoka, M. Tumor hypoxia: a target for selective cancer therapy. *Cancer science* **94**, 1021–8 (2003).
54. Taylor, C. T. & Cummins, E. P. The role of NF- $\kappa$ B in hypoxia-induced gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1177**, 178–84 (2009).
55. Dudley, A. C., Thomas, D., Best, J. & Jenkins, A. The STATs in cell stress-type responses. *Cell communication and signaling : CCS* **2**, 8 (2004).
56. Li, W. X. Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends in cell biology* **18**, 545–51 (2008).
57. Pietras, K. & Ostman, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research* **316**, 1324–31 (2010).

58. Harrison, D. A. The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4**, (2012).
59. Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J. & Schindler, C. W. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* **285**, 1–24 (2002).
60. Levy, D. E. & Darnell, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 651–62 (2002).
61. Grote, K., Luchtefeld, M. & Schieffer, B. JANUS under stress--role of JAK/STAT signaling pathway in vascular diseases. *Vascular pharmacology* **43**, 357–63 (2005).
62. Constantinescu, S. N., Girardot, M. & Pecquet, C. Mining for JAK-STAT mutations in cancer. *Trends in biochemical sciences* **33**, 122–31 (2008).
63. Valentino, L. & Pierre, J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochemical pharmacology* **71**, 713–21 (2006).
64. Spano, J.-P., Milano, G., Rixe, C. & Fagard, R. JAK/STAT signalling pathway in colorectal cancer: a new biological target with therapeutic implications. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **42**, 2668–70 (2006).
65. Lai, S. Y. & Johnson, F. M. Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: implications for future therapeutic approaches. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* **13**, 67–78 (2010).
66. Hsiao, J.-R. *et al.* Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis. *British journal of cancer* **89**, 344–9 (2003).
67. Wei, L.-H. *et al.* Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* **22**, 1517–27 (2003).
68. Yu, H. & Jove, R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nature reviews. Cancer* **4**, 97–105 (2004).
69. Dudley, A. C., Thomas, D., Best, J. & Jenkins, A. A VEGF/JAK2/STAT5 axis may partially mediate endothelial cell tolerance to hypoxia. *The Biochemical journal* **390**, 427–36 (2005).
70. Sullivan, R. *et al.* Delivering affordable cancer care in high-income countries. *The lancet oncology* **12**, 933–80 (2011).
71. Dancey, J. E., Bedard, P. L., Onetto, N. & Hudson, T. J. The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* **148**, 409–20 (2012).

72. Barton, M. B., Frommer, M. & Shafiq, J. Role of radiotherapy in cancer control in low-income and middle-income countries. *The lancet oncology* **7**, 584–95 (2006).
73. Ahmad, K. Millions in developing world deprived of radiotherapy. *The lancet oncology* **4**, 456 (2003).
74. Ward, E. *et al.* Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. *CA: a cancer journal for clinicians* **54**, 78–93 (2010).
75. Siegel, R., Ward, E., Brawley, O. & Jemal, A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**, 212–36 (2011).
76. Zubizarreta, E. H., Poitevin, A. & Levin, C. V. Overview of radiotherapy resources in Latin America: a survey by the International Atomic Energy Agency (IAEA). *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **73**, 97–100 (2004).
77. Bernier, J., Hall, E. J. & Giaccia, A. Radiation oncology: a century of achievements. *Nature reviews. Cancer* **4**, 737–47 (2004).
78. E.J. Hall; A.J. Giaccia *Radiobiology for the Radiologist*. (Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2006).
79. Hirst, D. G. The importance of radiobiology to cancer therapy: current practice and future perspectives. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* **19**, 367–9 (2007).
80. Brown, J. M. & Wilson, W. R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature reviews. Cancer* **4**, 437–47 (2004).
81. Bristow, R. G. & Hill, R. P. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature reviews. Cancer* **8**, 180–92 (2008).
82. Moeller, B. J., Richardson, R. a & Dewhirst, M. W. Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer metastasis reviews* **26**, 241–8 (2007).
83. Wu, W., Platoshyn, O., Firth, A. L. & Yuan, J. X.-J. Hypoxia divergently regulates production of reactive oxygen species in human pulmonary and coronary artery smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **293**, L952–9 (2007).
84. Clanton, T. L. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **102**, 2379–88 (2007).
85. Fan, J., Cai, H., Yang, S., Yan, L. & Tan, W. Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex

- vivo culture of CD34(+) cells. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **151**, 153–8 (2008).
86. Gonchar, O. & Mankovska, I. Moderate hypoxia/hyperoxia attenuates acute hypoxia-induced oxidative damage and improves antioxidant defense in lung mitochondria. *Acta physiologica Hungarica* **99**, 436–46 (2012).
  87. Keysar, S. B., Trncic, N., Larue, S. M. & Fox, M. H. Hypoxia/reoxygenation-induced mutations in mammalian cells detected by the flow cytometry mutation assay and characterized by mutant spectrum. *Radiation research* **173**, 21–6 (2010).
  88. Cataldi, A. Cell responses to oxidative stressors. *Current pharmaceutical design* **16**, 1387–95 (2010).
  89. Milosevic, M. *et al.* Tumor Hypoxia Predicts Biochemical Failure following Radiotherapy for Clinically Localized Prostate Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 2108–14 (2012).
  90. Kaanders, J. H. A. M., Bussink, J. & Van der Kogel, A. J. Clinical studies of hypoxia modification in radiotherapy. *Seminars in radiation oncology* **14**, 233–40 (2004).
  91. Hoogsteen, I. J., Marres, H. a M., Van der Kogel, a J. & Kaanders, J. H. a M. The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* **19**, 385–96 (2007).
  92. Harrington, K., Jankowska, P. & Hingorani, M. Molecular biology for the radiation oncologist: the 5Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* **19**, 561–71 (2007).
  93. Dartnell, L. R. Ionizing Radiation and Life. *Astrobiology* **11**, (2011).
  94. Hamada, N. *et al.* Recent advances in the biology of heavy-ion cancer therapy. *Journal of radiation research* **51**, 365–83 (2010).
  95. Beuve, M. *et al.* Radiobiologic parameters and local effect model predictions for head-and-neck squamous cell carcinomas exposed to high linear energy transfer ions. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **71**, 635–42 (2008).
  96. Kamada, T. Clinical evidence of particle beam therapy (carbon). *International journal of clinical oncology / Japan Society of Clinical Oncology* (2012).doi:10.1007/s10147-012-0388-6
  97. Joiner, M. & Kogel, A. van der *Basic Clinic Radiobiology*. (Hodder Harnold: 2009).
  98. Morgan, W. F., Day, J. P., Kaplan, M. I., McGhee, E. M. & Limoli, C. L. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiation research* **146**, 247–58 (1996).

99. Spitz, D. R., Azzam, E. I., Li, J. J. & Gius, D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer metastasis reviews* **23**, 311–22 (2004).
100. Azzam, E. I., Jay-Gerin, J.-P. & Pain, D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer letters* (2011).doi:10.1016/j.canlet.2011.12.012
101. Bielski, B. H. & Cabelli, D. E. Highlights of current research involving superoxide and perhydroxyl radicals in aqueous solutions. *International journal of radiation biology* **59**, 291–319 (1991).
102. O'Neill, P. & Wardman, P. Radiation chemistry comes before radiation biology. *International journal of radiation biology* **85**, 9–25 (2009).
103. Wolff, S. The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environmental health perspectives* **106 Suppl**, 277–83 (1998).
104. De Toledo, S. M. *et al.* Adaptive responses to low-dose/low-dose-rate gamma rays in normal human fibroblasts: the role of growth architecture and oxidative metabolism. *Radiation research* **166**, 849–57 (2006).
105. Mikkelsen, R. B. & Wardman, P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* **22**, 5734–54 (2003).
106. Valerie, K. *et al.* Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Molecular cancer therapeutics* **6**, 789–801 (2007).
107. Prise, K. M., Schettino, G., Folkard, M. & Held, K. D. New insights on cell death from radiation exposure. *The lancet oncology* **6**, 520–8 (2005).
108. Fuchs, Y. & Steller, H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* **147**, 742–58 (2011).
109. Yanagihara, K. [Radiation induced apoptosis in cultured human epithelial tumor cells]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* **54**, 1943–8 (1996).
110. Shinomiya, N. New concepts in radiation-induced apoptosis: “premitotic apoptosis” and “postmitotic apoptosis”. *Journal of cellular and molecular medicine* **5**, 240–53 (2001).
111. Rashi-Elkeles, S. *et al.* Transcriptional modulation induced by ionizing radiation: p53 remains a central player. *Molecular oncology* **5**, 336–48 (2011).
112. Firat, E., Heinemann, F., Grosu, A.-L., Hermann, F. & Niedermann, G. Molecular radiobiology meets clinical radiation oncology. *International journal of radiation biology* **86**, 252–9 (2010).

113. PUCK, T. T. & MARCUS, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. *The Journal of experimental medicine* **103**, 653–66 (1956).
114. Munshi, A., Hobbs, M. & Meyn, R. E. Clonogenic cell survival assay. *Methods in molecular medicine* **110**, 21–8 (2005).
115. Franken, N. a P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J. & Van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols* **1**, 2315–9 (2006).
116. Carlson, D. J., Stewart, R. D. & Semenenko, V. A. Effects of oxygen on intrinsic radiation sensitivity: A test of the relationship between aerobic and hypoxic linear-quadratic (LQ) model parameters. *Medical physics* **33**, 3105–15 (2006).
117. American Type Culture Collection <http://www.atcc.org/>. at <<http://www.atcc.org/>>
118. Masters, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature reviews. Cancer* **2**, 315–9 (2002).
119. Macville, M. *et al.* Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer research* **59**, 141–50 (1999).
120. Edgell, C. J., McDonald, C. C. & Graham, J. B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 3734–7 (1983).
121. Bauer, J. *et al.* In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. *Journal of cellular physiology* **153**, 437–49 (1992).
122. Bouïs, D., Hospers, G. A., Meijer, C., Molema, G. & Mulder, N. H. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* **4**, 91–102 (2001).
123. Maney, S. K. *et al.* Effect of apoptosis-inducing antitumor agents on endocardial endothelial cells. *Cardiovascular toxicology* **11**, 253–62 (2011).
124. Freshney, I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. (2005).
125. Frezza, C. *et al.* Metabolic profiling of hypoxic cells revealed a catabolic signature required for cell survival. *PloS one* **6**, e24411 (2011).
126. Martorell, L. *et al.* The hypoxia-inducible factor 1/NOR-1 axis regulates the survival response of endothelial cells to hypoxia. *Molecular and cellular biology* **29**, 5828–42 (2009).
127. Lu, H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha blocks differentiation of malignant gliomas. *The FEBS journal* **276**, 7291–304 (2009).

128. Guo, M. *et al.* Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1alpha independent mechanisms. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **11**, 67–77 (2006).
129. Hirsilä, M. *et al.* Effect of desferrioxamine and metals on the hydroxylases in the oxygen sensing pathway. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1308–10 (2005).
130. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55–63 (1983).
131. Smith, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76–85 (1985).
132. Wiechelman, K. J., Braun, R. D. & Fitzpatrick, J. D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry* **175**, 231–7 (1988).
133. Renard, P. *et al.* Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic acids research* **29**, E21 (2001).
134. Bolt, M. W. & Mahoney, P. A. High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* **247**, 185–92 (1997).
135. Dickson, C. Protein techniques: immunoprecipitation, in vitro kinase assays, and Western blotting. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **461**, 735–44 (2008).
136. Kaboord, B. & Perr, M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **424**, 349–64 (2008).
137. Wheatley, S. P. & Wang, Y. L. Indirect immunofluorescence microscopy in cultured cells. *Methods in cell biology* **57**, 313–32 (1998).
138. PUCK, T. T., MORKOVIN, D., MARCUS, P. I. & CIECIURA, S. J. Action of x-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissues. *The Journal of experimental medicine* **106**, 485–500 (1957).
139. Quintero Mejía, P. A. Estudio in vitro de la supervivencia en células tumorales irradiadas con un acelerador lineal de uso clínico. (2012).
140. Kaelin, W. G. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular cell* **30**, 393–402 (2008).

141. Dai, Z.-J. *et al.* Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **31**, 28 (2012).
142. Zhu, P., Ning, Y., Yao, L., Chen, M. & Xu, C. The proliferation, apoptosis, invasion of endothelial-like epithelial ovarian cancer cells induced by hypoxia. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **29**, 124 (2010).
143. Schindler, C., Levy, D. E. & Decker, T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *The Journal of biological chemistry* **282**, 20059–63 (2007).
144. Paukku, K. & Silvennoinen, O. STATs as critical mediators of signal transduction and transcription: lessons learned from STAT5. *Cytokine & growth factor reviews* **15**, 435–55 (2004).
145. Yan, R., Luo, H., Darnell, J. E. & Dearolf, C. R. A JAK-STAT pathway regulates wing vein formation in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 5842–7 (1996).
146. McManus, E. J. & Alessi, D. R. Cancer, oncogenes and signal transduction. *Genome biology* **5**, 332 (2004).
147. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474–88 (2000).
148. Lacronique, V. *et al.* A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science (New York, N.Y.)* **278**, 1309–12 (1997).
149. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474–88 (2000).
150. Liu, L., McBride, K. M. & Reich, N. C. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- $\alpha$ 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8150–5 (2005).
151. Hirano, T., Ishihara, K. & Hibi, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. *Oncogene* **19**, 2548–56 (2000).
152. Buettner, R., Mora, L. B. & Jove, R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 945–54 (2002).
153. Levy, D. E. The house that Jak/Stat built. *Cytokine & growth factor reviews* **8**, 81–90 (1997).

154. Okamoto, W. *et al.* Differential roles of STAT3 depending on the mechanism of STAT3 activation in gastric cancer cells. *British journal of cancer* **105**, 407–12 (2011).
155. Pensa, S., Regis, G. & Boselli, D. STAT1 and STAT3 in Tumorigenesis: Two Sides of the Same Coin? *Madame Curie Bioscience Database, Landes Bioscience* (2009).at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6568/>>
156. Pilati, C. *et al.* Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. *The Journal of experimental medicine* **208**, 1359–66 (2011).
157. Yu, H., Kortylewski, M. & Pardoll, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* **7**, 41–51 (2007).
158. Grivennikov, S. I. & Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **21**, 11–9 (2010).
159. Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J. E. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241–50 (1995).
160. Yuan, Z.-L., Guan, Y.-J., Chatterjee, D. & Chin, Y. E. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 269–73 (2005).
161. Jung, J. E. *et al.* STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 1296–8 (2005).
162. Gray, M. J. *et al.* HIF-1alpha, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene* **24**, 3110–20 (2005).
163. Darnell, J. E. STAT3, HIF-1, glucose addiction and Warburg effect. *Aging* **2**, 890–1 (2010).
164. Jung, J. E. *et al.* STAT3 inhibits the degradation of HIF-1alpha by pVHL-mediated ubiquitination. *Experimental & molecular medicine* **40**, 479–85 (2008).
165. Noman, M. Z. *et al.* The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 3510–21 (2009).
166. Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O2 availability on human cancer. *Nature reviews. Cancer* **8**, 967–75 (2008).

167. Niu, G. *et al.* Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* **21**, 2000–8 (2002).
168. Anglesio, M. S. *et al.* IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 2538–48 (2011).
169. Demaria, M. & Poli, V. From the nucleus to the mitochondria and back: the odyssey of a multitask STAT3. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **10**, 3221–2 (2011).
170. Blaskovich, M. A. *et al.* Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer research* **63**, 1270–9 (2003).
171. Bonner, J. a *et al.* Inhibition of STAT-3 results in greater cetuximab sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* **99**, 339–43 (2011).
172. Aggarwal, B. B. *et al.* Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1171**, 59–76 (2009).
173. Demaria, M. *et al.* STAT3 can serve as a hit in the process of malignant transformation of primary cells. *Cell death and differentiation* 1–8 (2012).doi:10.1038/cdd.2012.20
174. Barcellos-Hoff, M. H., Park, C. & Wright, E. G. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nature reviews. Cancer* **5**, 867–75 (2005).
175. Semenza, G. L. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer cell* **5**, 405–6 (2004).
176. Shrieve, D. C. & Harris, J. W. The in vitro sensitivity of chronically hypoxic EMT6/SF cells to X-radiation and hypoxic cell radiosensitizers. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* **48**, 127–38 (1985).
177. Pawlik, T. M. & Keyomarsi, K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **59**, 928–42 (2004).
178. Höckel, M., Schlenger, K., Mitze, M., Schäffer, U. & Vaupel, P. Hypoxia and Radiation Response in Human Tumors. *Seminars in radiation oncology* **6**, 3–9 (1996).
179. Amundson, S. A. *et al.* Differential responses of stress genes to low dose-rate gamma irradiation. *Molecular cancer research : MCR* **1**, 445–52 (2003).

180. Park, C., Papiez, L., Zhang, S., Story, M. & Timmerman, R. D. Universal survival curve and single fraction equivalent dose: useful tools in understanding potency of ablative radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **70**, 847–52 (2008).
181. Abdulkarim, B. & Deutsch, E. Endothelial-cell apoptosis and tumour response to radiotherapy. *The lancet oncology* **5**, 9 (2004).
182. Maj, J. G. *et al.* Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer research* **63**, 4338–41 (2003).
183. Vaupel, P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Seminars in radiation oncology* **14**, 198–206 (2004).
184. Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y. & Dewhirst, M. W. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer cell* **5**, 429–41 (2004).
185. Lewanski, C. R. & Gullick, W. J. Radiotherapy and cellular signalling. *The lancet oncology* **2**, 366–70 (2001).

## A. Anexo 1: Datos de construcción de las figuras y análisis estadístico

Activación de HIF-1 en células HeLa bajo condiciones de hipoxia física y química.				
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Absorbancia 450 nm	Desviación estandar	Varianza	P(T<=t) dos colas Normoxia - Condición de experimentación
Normoxia	0,4290	0,0200	0,0008	
Hipoxia Física 2 Horas	1,5275	0,0065	0,0001	0,0154
Hipoxia Física 6 Horas	1,3655	0,0205	0,0008	0,0275
Hipoxia Física 24 Horas	1,3115	0,0205	0,0008	0,0004
Hipoxia Química 2 Horas	1,6860	0,0010	0,0000	0,0106
Hipoxia Química 6 Horas	1,9255	0,0205	0,0008	0,0002
Hipoxia Química 24 Horas	1,9320	0,0070	0,0001	0,0114
Control Positivo	1,4710	0,0090	0,0002	0,0177
Control Negativo	0,0690	0,0040	0,0000	0,0283

Activación de HIF-1 en células EA.hy926 bajo condiciones de hipoxia física y química.				
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Absorbancia 450 nm	Desviación estandar	Varianza	P(T<=t) dos colas Normoxia - Condición de experimentación
Normoxia	0,1255	0,0005	0,0000	
Hipoxia Física 2 Horas	0,5935	0,0235	0,0011	0,0326
Hipoxia Física 6 Horas	0,6730	0,0060	0,0001	0,0064
Hipoxia Física 24 Horas	0,6455	0,0345	0,0024	0,0428
Hipoxia Química 2 Horas	0,6790	0,0260	0,0014	0,0293
Hipoxia Química 6 Horas	0,9745	0,0045	0,0000	0,0030
Hipoxia Química 24 Horas	0,9570	0,0570	0,0065	0,0440
Control Positivo	1,2285	0,0455	0,0041	0,0260
Control Negativo	0,0840	0,0150	0,0005	0,2276

Viabilidad celular normalizada por ensayo de MTT en células HeLa				
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Porcentaje Viabilidad	Desviación estandar	Varianza	P(T<=t) dos colas Normoxia - Condición de experimentación
Normoxia	1,0000	0,0164	0,0004	
Hipoxia Química 50 µM DFO 2 Horas	0,9608	0,0364	0,0020	0,1091
Hipoxia Química 100 µM DFO 2 Horas	0,9948	0,0526	0,0042	0,9105
Hipoxia Química 200 µM DFO 2 Horas	1,0601	0,0512	0,0039	0,2846
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	1,0823	0,0946	0,0134	0,2975
Hipoxia Química 50 µM DFO 6 Horas	1,0888	0,0483	0,0035	0,1789
Hipoxia Química 100 µM DFO 6 Horas	1,2076	0,1328	0,0264	0,1391
Hipoxia Química 200 µM DFO 6 Horas	1,0679	0,0580	0,0051	0,2856
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	0,9843	0,1097	0,0180	0,8579
Hipoxia Química 50 µM DFO 24 Horas	1,1293	0,0731	0,0080	0,0964
Hipoxia Química 100 µM DFO 24 Horas	0,9843	0,0905	0,0123	0,8497
Hipoxia Química 200 µM DFO 24 Horas	1,1671	0,1141	0,0195	0,1447
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	0,3225	0,0121	0,0002	0,0002

Viabilidad celular normalizada por ensayo de MTT en células EA.hy926				
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Porcentaje Viabilidad	Desviación estandar	Varianza	P(T<=t) dos colas Normoxia - Condición de experimentación
Normoxia	1,0000	0,0459	0,0032	
Hipoxia Química 50 µM DFO 2 Horas	0,9555	0,0683	0,0070	0,3446
Hipoxia Química 100 µM DFO 2 Horas	0,9582	0,1051	0,0166	0,4463
Hipoxia Química 200 µM DFO 2 Horas	0,9690	0,0538	0,0043	0,4044
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	1,1093	0,0736	0,0081	0,0542
Hipoxia Química 50 µM DFO 6 Horas	1,0040	0,0541	0,0044	0,9496
Hipoxia Química 100 µM DFO 6 Horas	1,0148	0,0353	0,0019	0,8063
Hipoxia Química 200 µM DFO 6 Horas	0,9555	0,0459	0,0032	0,5637
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	1,0094	0,0265	0,0011	0,8638
Hipoxia Química 50 µM DFO 24 Horas	0,9960	0,0402	0,0024	0,9480
Hipoxia Química 100 µM DFO 24 Horas	0,9568	0,0369	0,0020	0,2064
Hipoxia Química 200 µM DFO 24 Horas	0,9730	0,0449	0,0030	0,1345
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	0,8138	0,1073	0,0173	0,0772

Inmunodetección de (p)STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física.		
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Linea Celular	Densidad óptica relativa
Normoxia	HeLa	0,0140
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	HeLa	0,0120
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	HeLa	0,4140
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	HeLa	0,7780
Normoxia	EA.hy926	0,0130
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	EA.hy927	0,5530
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	EA.hy928	0,8150
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	EA.hy929	1,0010

Inmunodetección de (p)STAT3 en células HeLa y EA.hy926 expuestas a hipoxia física normalizada		
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Linea Celular	Densidad óptica relativa
Normoxia	HeLa	0,0010
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	HeLa	0,0010
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	HeLa	0,7550
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	HeLa	1,0001
Normoxia	EA.hy926	0,0010
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	EA.hy927	0,1844
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	EA.hy928	0,4370
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	EA.hy929	0,4892

Translocación nuclear de la proteína STAT3						
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Línea Celular	Porcentaje	Desviación estandar	Varianza	P(T<=t) dos colas Normoxia - Condición de experimentación	P(T<=t) dos colas Hipoxia física - Química
Normoxia	HeLa	0,2733	0,0125	0,0002		
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	HeLa	0,5300	0,0294	0,0013	0,0022	0,0051
Hipoxia Química 100 µM DFO 2 Horas	HeLa	0,4367	0,0287	0,0012	0,0054	
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	HeLa	0,9367	0,0170	0,0004	0,0000	0,0001
Hipoxia Química 100 µM DFO 6 Horas	HeLa	0,4800	0,0163	0,0004	0,0003	
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	HeLa	0,8867	0,0287	0,0012	0,0004	0,0001
Hipoxia Química 100 µM DFO 24 Horas	HeLa	0,3567	0,0368	0,0020	0,0420	
Normoxia	EA.hy926	0,1233	0,0205	0,0006		
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	EA.hy927	0,4267	0,0205	0,0006	0,0023	0,0092
Hipoxia Química 100 µM DFO 2 Horas	EA.hy928	0,2000	0,0163	0,0004	0,0237	
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	EA.hy929	0,6767	0,0205	0,0006	0,0027	0,0025
Hipoxia Química 100 µM DFO 6 Horas	EA.hy930	0,1767	0,0170	0,0004	0,0263	
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	EA.hy931	0,6867	0,0249	0,0009	0,0000	0,0026
Hipoxia Química 100 µM DFO 24 Horas	EA.hy932	0,1800	0,0141	0,0003	0,1358	

Translocación nuclear de la proteína STAT3, comparación entre líneas celulares						
Tipo y tiempo de exposición al agente estresor	Línea Celular	Porcentaje	Desviación estandar	Varianza	P(T<=t) dos colas Células HeLa - EAhy926	
Normoxia	HeLa	0,2733	0,0125	0,0002	0,00148	
Normoxia	EA.hy926	0,1233	0,0205	0,0006		
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	HeLa	0,5300	0,0294	0,0013	0,03641	
Hipoxia Física 1% Oxígeno 2 Horas	EA.hy927	0,4267	0,0205	0,0006		
Hipoxia Química 100 µM DFO 2 Horas	HeLa	0,4367	0,0287	0,0012	0,00609	
Hipoxia Química 100 µM DFO 2 Horas	EA.hy928	0,2000	0,0163	0,0004		
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	HeLa	0,9367	0,0170	0,0004	0,01020	
Hipoxia Física 1% Oxígeno 6 Horas	EA.hy929	0,6767	0,0205	0,0006		
Hipoxia Química 100 µM DFO 6 Horas	HeLa	0,4800	0,0163	0,0004	0,00084	
Hipoxia Química 100 µM DFO 6 Horas	EA.hy930	0,1767	0,0170	0,0004		
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	HeLa	0,8867	0,0287	0,0012	0,00083	
Hipoxia Física 1% Oxígeno 24 Horas	EA.hy931	0,6867	0,0249	0,0009		
Hipoxia Química 100 µM DFO 24 Horas	HeLa	0,3567	0,0368	0,0020	0,03764	
Hipoxia Química 100 µM DFO 24 Horas	EA.hy932	0,1800	0,0141	0,0003		



## B. Anexo 2: Archivo para ajuste de las curvas

```
#set terminal jpeg #set output'prueba1load.jpeg'
settitle'Curva de supervivencia LQM para HeLa'
setxlabel'Dosis [Gy]' set ylabel'Supervivencia [%]'
setxrange[0:10.2] set yrange[0.005:1.01] set log y
g(x)= exp(-((A*x)+(B*x**2)))
f(x)= exp (-A*x)
y(x)= exp (-B*x**2)
q(x)= exp(-((A*Dl)+(B*Dl**2)+(C*(x-Dl))))
w(x)= g(x)+q(x)
A= 0.159497 B= 0.0335798 Dl= 8.5 C= B/(3*Dl)
#set label "A/B= 4.8" at 3.15,0.450 #set arrow from 4.4,0.450 to 4.7,0.45
plot"/curvaerror.txt" using 1:2:3 with error title"Celulas de cervix-HeLa" ,
g(x) lt 2 lc 8 title"Ajuste {LQ}" ,
w(x) title"Ajuste {LQ-C}" #fit g(x)"/curvaerror.txt" via A, B
```