



UNIVERSIDAD DEL ROSARIO

Efecto de la hipoxia-reoxigenación y las radiaciones ionizantes en la captación de glucosa en líneas tumorales de seno y colon cocultivadas con células endoteliales.

Adriana María Agudelo Ramírez.

Universidad del Rosario
Facultad de Medicina, Unidad de Genética
Bogotá, Colombia

2012

Efecto de la hipoxia-reoxigenación y las radiaciones ionizantes en la captación de glucosa en líneas tumorales de seno y colon cocultivadas con células endoteliales.

Adriana María Agudelo Ramírez M.D.

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

Director:

Alejandro Ondo, Ph.D

Línea de Investigación:

Mecanismos bioquímicos y moleculares de respuesta celular al estrés.

Grupo de Investigación:

Grupo de Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio) de la Unidad de Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad del Rosario

Universidad del Rosario

Facultad de Medicina, Unidad de Genética

Bogotá, Colombia

2012

Je suis de ceux qui pensent que la Science a une grande beauté. Un savant dans son laboratoire n'est pas seulement un technicien: c'est aussi un enfant placé en face des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme un conte de fées.

Marie Curie.

Agradecimientos

A la unidad de Bioquímica y al grupo de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad del Rosario; A la Dra. Ruth Garzón por permitirme trabajar en su grupo, por su dedicación y valiosas enseñanzas. Al Dr. Alejandro Ondo por su paciencia y dedicación en la dirección de este trabajo. A los demás miembros de la unidad de Bioquímica por sus aportes a este trabajo.

Al Centro Internacional de Física de la Universidad Nacional de Colombia, por permitir el uso del microscopio; en especial a la Dra. Marcela Camacho y a Lina García.

Al departamento de Física de la Universidad Nacional, a la Fundación Santafé de Bogotá y al Centro de Control de Cáncer, en especial a la Profesora María Cristina Plazas y a Paulo Quintero por la colaboración con la planeación y ejecución de las sesiones de irradiación.

Al Dr. Thierry Pourcher por su apoyo a nuestro grupo de investigación.

A mis compañeros de maestría, en especial a Óscar Ortega por su apoyo incondicional.

A la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario, a mis profesores, en especial a la Dra. Dora Fonseca, por demostrarme que enseñar es apasionante.

A mi familia, mis padres, mi hermano y en especial a Migue, por la paciencia y apoyo constantes.

Resumen

La captación de glucosa y su conversión en lactato juegan un papel muy importante en el metabolismo tumoral independientemente de la concentración de oxígeno presente en el tejido (efecto Warburg). Dicha captación varía de un tipo tumoral a otro y dentro del mismo tumor, situación que podría depender de las características microambientales tumorales (fluctuaciones de la concentración de oxígeno disponible y presencia de otros tipos celulares no cancerosos, por ejemplo) y de factores estresores asociados a los tratamientos. En este trabajo se estudió el efecto de la variación en la concentración de oxígeno y las radiaciones ionizantes sobre la captación de glucosa, en cultivos de líneas celulares tumorales MCF-7 (seno) y HT-29 (colon), cultivadas de forma aislada o en cocultivo con la línea celular EAhy296 (endotelio). La variación en la concentración de oxígeno se modeló sometiendo a las células a una hipoxia de 24 horas y permitiendo su posterior reoxigenación; para la irradiación, se utilizó un acelerador lineal de uso clínico.

El modelo de estudio elegido permitió un acercamiento al estudio de algunas de las interacciones existentes en el microambiente tumoral *in vitro*. Vale la pena insistir que las condiciones de oxigenación en los tumores está variando constantemente, y de allí la importancia de hacer estudios de hipoxia y reoxigenación.

Se encontró que la captación de glucosa en hipoxia-reoxigenación es diferente para lo descrito en condiciones de hipoxia permanente y que es modificada al evaluar las células en cocultivo. Además se identificaron subpoblaciones celulares dentro de la misma línea celular, de alta y baja captación de glucosa, lo que implicaría una simbiosis metabólica de la célula como respuesta adaptativa a las condiciones tumorales. Adicionalmente, se evaluó la expresión de NRF2 y la translocación nuclear de NRF2 y HIF1 α , como vías de respuesta a hipoxia y estrés celular, posiblemente implicadas en la alteración del metabolismo glucolítico. De acuerdo a los resultados obtenidos, la translocación nuclear de las proteínas evaluadas explicaría el comportamiento metabólico de las células tumorales de seno, pero no de colon, por lo cual deben existir otras vías metabólicas implicadas en la regulación del metabolismo de esta línea celular.

Estos hallazgos son de gran importancia ya que el entendimiento de las diferencias en el comportamiento de las células tumorales en hipoxia-reoxigenación en relación con hipoxia permitirá realizar planeaciones dosimétricas más dinámicas, que reevalúen las condiciones de oxigenación tumoral constantemente. Así mismo, la simbiosis metabólica puede facilitar el uso de herramientas diagnósticas (por ejemplo otros radiofármaco diferentes a la ¹⁸ FDG) que permitan la identificación de las sobpoblaciones celulares presentes en cada tumor. Al ahondar en el estudio de las proteínas evaluadas en este trabajo y estudiar otras proteínas, se podrán identificar blancos terapéuticos para otro tipo de terapias o realizar tratamientos combinados.

Palabras clave: Hipoxia-reoxigenación, Efecto Warburg, Radiaciones ionizantes, Cáncer de seno y colon, Cocultivo, HIF1 α , NRF2, Simbiosis metabólica.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XVI
Lista de fórmulas	XVII
Introducción	19
1. Marco teórico	23
1.1 Definición de Cáncer	23
1.2 Epidemiología del cáncer	24
1.3 Radioterapia como tratamiento contra el cáncer	26
1.3.1 Efecto biológico de las radiaciones ionizantes	26
1.3.2 Planeación de la radioterapia	29
1.4 Metabolismo tumoral	30
1.5 Microambiente tumoral	33
1.6 NRF2	35
1.6.1 NRF2 en cáncer	38
1.7 HIF1 α	39
1.7.1 HIF1 α en cáncer	43
2. Objetivo de la investigación	45
2.1 Pregunta de Investigación	45

2.2	Objetivos	45
2.2.1	Objetivo general.....	45
2.2.2	Objetivos específicos	46
3.	Metodología.....	47
3.1	Cultivo celular.....	47
3.1.1	Líneas celulares.....	47
3.1.2	Mantenimiento y preparación de los cultivos celulares.....	48
3.1.3	Cocultivos	49
3.1.4	Inducción de hipoxia-reoxigenación	50
3.2	Construcción de curvas de supervivencia.....	51
3.2.1	Conteo de colonias	53
3.3	Irradiación de cultivos celulares.....	54
3.4	Análisis de la captación de glucosa	54
3.4.1	Adquisición de imágenes	56
3.5	Ensayo de citotoxicidad por MTT	58
3.6	Análisis de proteínas	59
3.6.1	Extracción de proteínas	59
3.6.2	Cuantificación de proteínas.....	60
3.6.3	Electroforesis en gel de Poliacrilamida y Sodio Dodecyl sulfato (SDS-PAGE)	61
3.6.4	Transferencia de proteínas	63
3.6.5	Incubación con Anticuerpos Primarios	64
3.7	Inmunocitoquímica	66
3.8	Análisis estadístico	68
4.	Resultados y discusión	71
4.1	Curvas de calibración de glucosa	71
4.2	Confirmación de las condiciones de hipoxia	71
4.3	Ensayo de citotoxicidad por MTT	74
4.4	Curvas de supervivencia celular	76
4.5	Captación de glucosa en respuesta al estrés celular	78
4.6	Modificación de la captación de glucosa en respuesta al estrés celular en células en cocultivo.....	81
4.7	Poblaciones celulares como respuesta adaptativa a condiciones de estrés	86
4.8	Interacción metabólica de células en cocultivo como respuesta adaptativa al estrés	92
4.9	Expresión de NRF2 en cultivos de células tumorales y endoteliales en respuesta a condiciones de estrés celular	106
4.10	Translocación nuclear de NRF2 en cultivos individuales y en cocultivos de células EAhy926, MCF7 y HT29	109
4.11	Translocación nuclear de HIF1 α en cultivos individuales y en cocultivos de EAhy926, MCF7 y HT29	118
5.	Conclusiones y perspectivas.....	130
5.1	Conclusiones.....	130
5.2	Perspectivas.....	131
	Bibliografía	133

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes en tiempo y en espacio.....	9
Figura 1-2: Volúmenes tumorales en planeación de radioterapia.....	12
Figura 1-3: Microambiente tumoral.....	16
Figura 1-4: Dominios de la proteína NRF2.....	18
Figura 1-5: Regulación de NRF2.....	19
Figura 1-6: Dominios de las subunidades α y β del HIF1.....	22
Figura 1-7: Regulación de HIF1 α . Degradación bajo condiciones de normoxia y translocación nuclear en condiciones de hipoxia.....	24
Figura 3-1: Curva de absorbancia de Albúmina sérica bovina.....	43
Figura 4-1: Variación de la fluorescencia según la captación de glucosa.....	54
Figura 4-2: Confirmación de las condiciones de hipoxia.....	55
Figura 4-3: Ensayo de citotoxicidad por MTT para células EAhy 926, MCF7 y HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación.....	56
Figura 4-4: Ensayo de citotoxicidad por MTT para células sometidas a ensayos con la sonda de glucosa.....	57
Figura 4-5: Curvas de supervivencia a la radiación. Normoxia vs hipoxia-reoxigenación.....	59
Figura 4-6: Captación de sonda de glucosa en células EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	61

Figura 4-7: Captación de sonda de glucosa en células MCF7 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	61
Figura 4-8: Captación de sonda de glucosa en células HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	62
Figura 4-9: Captación de sonda de glucosa en células EAhy926 en cocultivo con células tumorales.....	64
Figura 4-10: Captación de sonda de glucosa en células MCF7 en cocultivo con células EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	66
Figura 4-11: Captación de sonda de glucosa en células HT29 en cocultivo con células EAhy926. A. Comparación normoxia e hipoxia-reoxigenación.....	67
Figura 4-12: Conteo celular en cultivo de células MCF7.....	68
Figura 4-13: Porcentaje de células que captan glucosa en el cultivo de EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	69
Figura 4-14: Porcentaje de células que captan glucosa en el cultivo de MCF7 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	70
Figura 4-15: Porcentaje de células que captan glucosa en el cultivo de HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	70
Figura 4-16: Diferencias en la captación de la sonda de glucosa dentro de la misma línea celular.....	71
Figura 4-17: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	72
Figura 4-18: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células MCF7 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	73
Figura 4-19: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	73
Figura 4-20: Cocultivos de células endoteliales con células tumorales en campo claro y fluorescencia.....	75
Figura 4-21: Porcentaje de células EAhy926 que captan glucosa en cocultivo con MCF7 y HT29.....	76
Figura 4-22: Porcentaje de células MCF7 que captan glucosa en cocultivo con células en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	77
Figura 4-23: Porcentaje de células HT29 que captan glucosa. en cocultivo con células en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	78

Figura 4-24: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células EAhy926 cocultivadas con células MCF7 y HT29.....	79
Figura 4-25: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células EAhy926 cocultivadas con células MCF7 y HT29.....	80
Figura 4-26: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células MCF7 cocultivadas con células EAhy926.....	82
Figura 4-27: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células MCF7 cocultivadas con células EAhy926.....	83
Figura 4-28: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células HT29 cocultivadas con células EAhy926.....	84
Figura 4-29: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células HT29 cocultivadas con células EAhy926.....	85
Figura 4-30: Simbiosis metabólica. Hay células tumorales que hacen glicólisis anaerobia y expresan MCT4 exportando lactato.....	88
Figura 4-31: Expresión de NRF2 por western blot en cultivos celulares sometidos en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	90
Figura 4-32: Inmunocitoquímica para NRF2 en células EAhy926, MCF7 y HT29 cultivadas en hipoxia-reoxigenación.....	91
Figura 4-33: Translocación nuclear de NRF2 en células EAhy926 en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	92
Figura 4-34: Translocación nuclear de NRF2 en células MCF7 en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	93
Figura 4-35: Translocación nuclear de NRF2 en células HT29 en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.....	94
Figura 4-36: Inmunocitoquímica para NRF2 en cocultivos de EAhy926 con MCF7 y EAhy926 con HT29.....	95
Figura 4-37: Translocación nuclear de NRF2 en células EAhy926 en cocultivo con MCF7 y HT29.....	97
Figura 4-38: Translocación nuclear de NRF2 en células MCF7 en cocultivo con EAhy926.....	98
Figura 4-39: Translocación nuclear de NRF2 en células HT29 en cocultivo con EAhy926.....	99

Figura 4-40: Translocación nuclear de HIF1 α en células EAhy926, MCF7 y HT29 cultivadas en hipoxia-reoxigenación.....	101
Figura 4-41: Translocación nuclear de HIF1 α en células EAhy926 sometidas a normoxia, hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	102
Figura 4-42: Translocación nuclear de HIF1 α en células MCF7 sometidas a normoxia, hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	103
Figura 4-43: Translocación nuclear de HIF1 α en células HT29 sometidas a normoxia, hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.....	104
Figura 4-44: Inmunocitoquímica para HIF1 α en cocultivos de EAhy926 con MCF7 y EAhy926 con HT29.....	104
Figura 4-45: Translocación nuclear de HIF1 α en células EAhy926 en cocultivo con MCF7 y HT29.....	106
Figura 4-46: Translocación nuclear de HIF1 α en células MCF7 en cocultivo con EAhy926.....	107
Figura 4-47: Translocación nuclear de HIF1 α en células HT29 en cocultivo con EAhy926 en normoxia e hipoxia-reoxigenación.....	109

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Incidencia de cáncer en Colombia en Hombres.....	7
Tabla 1-2: Incidencia de cáncer en Colombia en Mujeres.....	7
Tabla 1-3: Mortalidad por cáncer en Colombia en Hombres.....	7
Tabla 1-4: Mortalidad por cáncer en Colombia en Mujeres.....	7
Tabla 1-5: Clasificación de sensibilidad a la radiación, según tipo tumoral.....	10
Tabla 1-6: Concentración de oxígeno en los tejidos.....	13
Tabla 3-1: Número de células a sembrar, según la dosis de radiación.....	34
Tabla 3-2: Reactivos para geles de poliacrilamida y Sodio Dodecyl Sulfato.....	43

Lista de fórmulas

	Pág.
Fórmula 3-1: Conteo de células en hemocitómetro.....	31
Fórmula 3-2: Eficiencia de sembrado.....	34
Fórmula 3-3: Fracción de supervivencia celular.....	35
Fórmula 3-4: Fluorescencia total del campo.....	39
Fórmula 3-5: Porcentaje de células fluorescentes por campo.....	39
Fórmula 3-6: Fluorescencia individual.....	40
Fórmula 3-7: Cálculo de viabilidad celular.....	41
Fórmula 3-8: Porcentaje de translocación nuclear de NRF2 y HIF1 α	50

Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial. En Países en vía de desarrollo, en los últimos años se ha observado un aumento en la incidencia de esta entidad, en parte debido al envejecimiento de la población y a la disminución de la mortalidad por enfermedades infecciosas (Organización Mundial de la Salud 2009). En Colombia, según las últimas estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, el tumor más frecuente en los hombres es el de próstata, seguido por el de estómago, pulmón, colon y recto. Los que causan una mayor mortalidad son los tumores de estómago seguidos por tumores de pulmón, próstata, colon y recto. En las mujeres el más frecuentemente encontrado es el cáncer de seno, seguido por el de cérvix, estómago, colon y recto. La mortalidad en mujeres es debida a los tumores de seno, seguida por, cérvix, pulmón, colon y recto (Ministerio de la Protección Social & Instituto Nacional de Cancerología 2010).

Dentro de los tratamientos existentes para el manejo del cáncer, la radioterapia es una buena alternativa ya que es una estrategia más costo-efectiva, ofrece un manejo no invasivo, afecta directamente la proliferación celular y es una buena opción paliativa. A nivel mundial se ha identificado que aproximadamente el 60% de los pacientes diagnosticados con cáncer, tienen indicación de radioterapia (Barton et al. 2006). A pesar de ello, los mecanismos biológicos de la respuesta celular a la radiación aún no se conocen en su totalidad. Una parte fundamental del manejo con radioterapia es la planeación dosimétrica, es decir, el establecimiento de la dosis y la ubicación de radiación que se le aplicará al paciente (Korreman et al. 2010). Para ello, se han empleado nuevas estrategias

como la tomografía por emisión de positrones (PET), la cual se basa en el metabolismo tumoral y utiliza radiofármacos como la deoxiglucosa marcada con flúor radioactivo (^{18}FDG), para la obtención de imágenes. Esta técnica se basa en conocimientos previos del metabolismo tumoral (Sattler et al. 2010).

En condiciones normales de oxigenación, una célula metaboliza la glucosa hasta piruvato, que posteriormente ingresa a la mitocondria y es oxidado hasta CO_2 y H_2O . Este proceso mitocondrial es dependiente de oxígeno. En condiciones de poca oxigenación (o hipoxia), la célula adapta su metabolismo y el piruvato es preferencialmente convertido a lactato (glucólisis anaerobia), fenómeno conocido como efecto Pasteur (Gatenby & Gillies 2004) (Busk et al. 2008). Sin embargo, en las células tumorales se presenta un fenómeno conocido como efecto Warburg, en el cual, incluso en condiciones normales de oxigenación, se produce una glucólisis anaerobia. Se plantea que este efecto está dado como una respuesta adaptativa de la célula a las cambiantes condiciones de oxigenación, pues debido a la rápida proliferación celular, la cercanía a los vasos sanguíneos, la vasoconstricción y el hematocrito del paciente, entre otras, el aporte de oxígeno a los tumores es cambiante, incluso en cuestión de horas (Gatenby & Gillies 2004).

Gracias a esta observación hecha un siglo atrás y a la utilización del PET, en la actualidad se ha logrado identificar que el tumor no se comporta como una masa homogénea, y que existen zonas con una mayor captación de glucosa que otras y que no necesariamente estas zonas se correlacionan con regiones hipóxicas del tumor. Ello ha contribuido a un nuevo enfoque en el estudio de los tumores, evaluando el microambiente tumoral.

El tumor sólido no está compuesto únicamente por células tumorales. Allí llegan células del sistema inmune, hay células endoteliales, las células del tejido mismo en el que se encuentra la lesión y, además, la matriz extracelular juega un papel fundamental en la migración tumoral y la metástasis. Las células endoteliales y la angiogénesis cumplen un papel fundamental para la supervivencia tumoral, ya

que no sólo garantiza el aporte de oxígeno, sino también la llegada de nutrientes a ese tejido. Existe una compleja red de señalización a nivel del tumor, que incluye factores relacionados con la respuesta y adaptación a la hipoxia y al estrés (M. Allen & Louise Jones 2011).

La proteína NRF2 es un factor de transcripción que se activa en respuesta al estrés y está encargado del mantenimiento del estado redox de la célula (Osburn & Kensler 2008). Favorece la transcripción de enzimas, proteínas de balance redox y transportadores en relación con la respuesta celular al estrés. Cumple un papel protector frente al cáncer, pero recientemente también ha sido implicada en favorecer la proliferación y supervivencia de las células tumorales (Lau et al. 2008). Las variaciones en la concentración de oxígeno y el sometimiento a tratamientos como las radiaciones ionizantes en los tumores, afectan directamente esta vía de señalización (Magesh et al. 2012).

La proteína HIF1 α es la subunidad α de un heterodímero, la HIF1. Este es un factor de transcripción encargado de la respuesta celular a la hipoxia y muy relacionado con la glicólisis, ya que favorece la transcripción de genes relacionados con esta ruta metabólica, así como de factores angiogénico (Ke & Costa 2006) (Bertout et al. 2008) (Brahimi-Horn et al. 2007b) (Semenza 2003).

El conocimiento del micorambiente tumoral y las modificaciones del metabolismo de la célula cancerosa al ser expuesta a las células y señalización de dicho microambiente, son fundamentales para un mejor entendimiento del metabolismo tumoral que permitirá postular blancos terapéuticos. Además, entender las modificaciones en el tumor al ser expuesto a tratamientos como la radioterapia permitirá realizar modificaciones en la planeación y tratamiento actuales, con el fin de optimizar el tratamiento y garantizar una mayor radiosensibilidad tumoral.

Por ello se planteó un modelo con la línea tumoral de seno MCF7 y de colon HT29 y una línea endotelial EAhy926, para lograr un acercamiento al

microambiente tumoral. Se consideró el uso de un modelo endotelial, dada la importancia que tiene este tejido en la proliferación y mantenimiento tumoral. Para la evaluación de la captación de glucosa, se eligió una sonda fluorescente de glucosa (2NBDG) y para el estudio de las proteínas, se hizo Western Blot e Inmunocitoquímica con el fin de identificar la localización subcelular de las proteínas mencionadas al ser sometidas a las condiciones de estrés.

1. Marco teórico

1.1 Definición de Cáncer

La Organización Mundial de la Salud define el cáncer como “un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis.” Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (Organización Mundial de la Salud 2009). Sin embargo, más que tumores o masas de células que proliferan rápidamente, son tejidos de gran complejidad conformados por distintos tipos celulares, que se encuentran en permanente interacción (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011).

El fenómeno del cáncer se ha presentado como un mecanismo adaptativo de las células a las características ambientales y las restricciones a la proliferación celular que existen en los tejidos sanos, confiriéndole a dichas células una ventaja selectiva (Gatenby & Gillies 2004).

Las capacidades funcionales adquiridas de las células tumorales, que les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse, se han reunido en 8 características fundamentales del cáncer (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011),(Douglas Hanahan & R. A. Weinberg 2000) La habilidad de mantener una proliferación permanente, la capacidad de evadir las vías de señalización de supresión del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la replicación de células inmortales, la capacidad de inducir angiogénesis, la capacidad de invasión y metástasis, la capacidad de superar al sistema inmune y la

reprogramación del metabolismo energético. Esta última característica, pero no por eso menos importante, ha sido añadida recientemente a la descripción hecha por los autores a pesar de haber sido descrita hace años por Otto Warburg (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011).

1.2 Epidemiología del cáncer

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de muerte con 7,6 millones de muertes (13%) en el 2008, según los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (Organización Mundial de la Salud 2009). La incidencia a nivel mundial oscila entre 288 y 356 por cada 100 mil habitantes. Se estima además que en el 2008, la mortalidad en países de ingresos medio y bajos a causa del cáncer fue entre un 72 y 75% (Organización Mundial de la Salud 2009) (Farmer et al. 2010), la mayoría de ellas se deben a cánceres de pulmón, de mama, de colon y recto, de estómago o de hígado. En el 2030, habrán 12 millones de muertes por la entidad, a nivel mundial (Organización Mundial de la Salud 2009).

En los últimos años, se ha observado un aumento en la proporción de cáncer en los países en vía de desarrollo, posiblemente relacionado con el aumento y envejecimiento de la población, además de la reducción en la mortalidad a causa de enfermedades infecciosas (Farmer et al., 2010).

En Colombia, según los datos más recientes reportados en los “Indicadores Básicos 2010 Situación de Salud en Colombia” (Ministerio de la Protección Social & Instituto Nacional de Cancerología 2010) entre los años 2006 y 2008 la tasa de mortalidad por neoplasias malignas fue de 76,5 por cada 100000 habitantes, cifra alentadora en comparación con América Latina (94,3 muertes por cada 100000 habitantes) (Ministerio de la Protección Social & Instituto Nacional de Cancerología 2010). En los hombres, el cáncer más frecuente es el de próstata, seguido de los tumores de estómago, pulmón, colon y recto y linfoma no Hodgking (Tabla 1-1). En el caso de las mujeres, el cáncer de seno ocupa el primer lugar en incidencia, seguido del cáncer de cérvix, el de estómago, colon y recto y tiroides (Tabla 1-2) (Salud n.d.) (Instituto Nacional de Cancerología 2010)

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología, la mortalidad masculina por cáncer en nuestro país en el 2009 fue causada por tumores de estómago, seguido del

tumor de pulmón, próstata y colon (Tabla 1-3). En el caso de las mujeres, la mortalidad más alta fue debida a tumor de seno, seguido de cáncer del cuello uterino, el tumor de pulmón y vías respiratorias bajas y cáncer de colon, recto y ano (Tabla 1-4) (Instituto Nacional de Cancerología 2010).

Tablas 1-1 y 1-2: Frecuencia de cáncer en Colombia en Hombres (Izquierda) y Mujeres (Derecha). Adaptado de www.cancer.gov.co.

TIPO DE TUMOR	% Presentación (hombres)
Próstata	23,6
Estómago	14,3
Pulmón	9,8
Colon y Recto	6,6
Linfoma no Hodgking	4,7

TIPO DE TUMOR	% Presentación (mujeres)
Seno	21,5
Cérvix	15,3
Estómago	8,7
Colon y Recto	7,4
Tiroides	5,9

Tablas 1-3 y 1-4: Mortalidad por cáncer en Colombia en Hombres (izquierda) y Mujeres (derecha). Adaptado de www.cancer.gov.co.

TIPO DE TUMOR	Mortalidad por 100000 hab
Estómago	13,3
Pulmón	11,8
Próstata	11,2
Colon y Recto	5,2

TIPO DE TUMOR	Mortalidad por 100000 hab
Seno	9,6
Cérvix	8,0
Pulmón	6,4
Colon y Recto	4,7

1.3 Radioterapia como tratamiento contra el cáncer

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los objetivos del tratamiento del cáncer son tres: Cura, Prolongación de la vida y/o Mejoramiento de la calidad de vida. Para lograr un adecuado control tumoral, se busca afectar directamente las células tumorales clonogénicas, para que al final del tratamiento, haya detención de la proliferación celular (Zaider & Hanin 2011). Existen varias opciones terapéuticas, las cuales están indicadas según el tipo de tumor, la localización, el estadio al momento del diagnóstico, el género y la edad, y el costo-beneficio, entre otras. Dentro de los tratamientos más usados y de más fácil acceso, se encuentran la cirugía, la quimioterapia, la terapia hormonal, la terapia molecular, la radioterapia y combinaciones entre estas. La radioterapia es un tratamiento no invasivo, con una adecuada relación costo-beneficio, dirigido al tumor, que afecta directamente la proliferación celular, en el que se ha demostrado un mejor control local del tumor y se puede usar como opción paliativa (Barton et al. 2006). Esto confiere ciertas ventajas sobre las demás opciones terapéuticas, sobretodo en países en vía de desarrollo como el nuestro (Barton et al. 2006). Se estima que a nivel mundial, el 60% de los pacientes diagnosticados con cáncer tienen indicación de radioterapia (Barton et al. 2006). A pesar de ello, el conocimiento de los efectos biológicos de la radiación sobre las células tumorales es aún insuficiente.

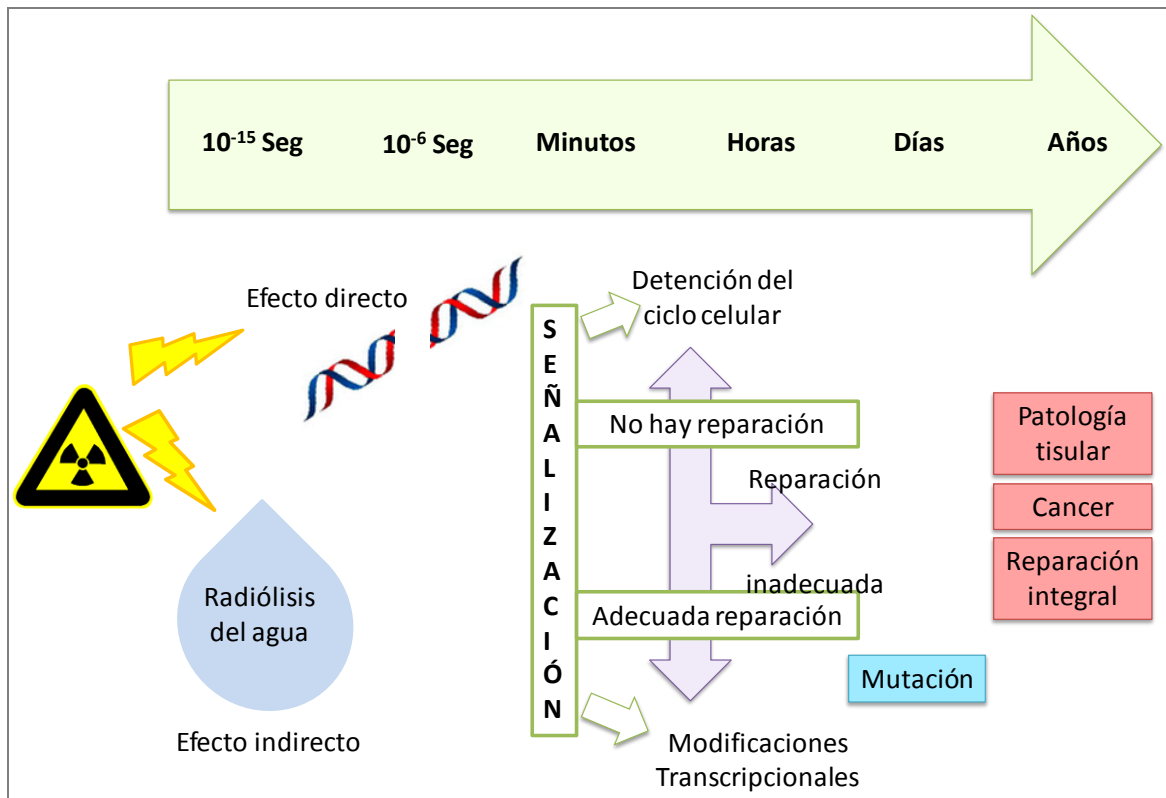
1.3.1 Efecto biológico de las radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes son partículas con energía suficiente para desplazar un electrón de una molécula, ionizándola, y fueron descritas por Röntgen en 1895 (Hall D.Phil, Eric J. Giaccia 2006). Al interactuar con la célula, las radiaciones ionizantes ejercen dos tipos de efectos: Los efectos directos y los indirectos.

Los efectos directos hacen referencia al resultado de la incidencia directa de la partícula (fotón o electrón) sobre el DNA, produciendo una ruptura de una o de las dos hélices de la molécula. Los efectos indirectos hacen referencia a los efectos producidos en la molécula de DNA, secundarios a la radiólisis del agua, proceso en el cual se producen

especies reactivas de oxígeno por la acción de la partícula de radiación en las moléculas de agua (Vogin, 2011) (Hall D.Phil, Eric J. Giaccia, 2006) (Douki, Ravanat, Pouget, Testard, & Cadet, 2006). Estos efectos son causantes del 60,8% (Douki et al., 2006) al 66% (Hall D.Phil, Eric J. Giaccia, 2006) de los daños en la célula. Esta transferencia de energía en la célula va a producir efectos biológicos en tiempo y espacio. La actividad inicia en cuestión de microsegundos posterior a la radiación y desencadena una cascada de reacciones fisicoquímicas, desde un nivel molecular hasta el nivel del organismo completo. A nivel molecular, en los primeros minutos seguidos a la exposición a la radiación se activan vías metabólicas que favorecen la detención del ciclo celular (en cuestión de horas), posterior a lo cual habrá reparación del daño, mutación o muerte celular, días después de la exposición a la irradiación (Figura 1-1).

Figura 1-1: Efectos biológicos de las radiaciones ionizantes en tiempo y en espacio. Adaptado de (Vogin 2011).



En radioterapia, la respuesta celular o sensibilidad a la radiación, se evalúa teniendo en cuenta la capacidad proliferativa de la célula al ser expuesta a dichas radiaciones (Munshi, Hobbs, & Meyn, 2005) (Vogin, 2011). Teniendo en cuenta esta respuesta, se tienen tejidos radiosensibles, en los cuales hay una mayor afectación de la respuesta proliferativa celular cuando se someten a radiaciones ionizantes, y tejidos radorresistentes, cuando la respuesta proliferativa no se ve seriamente afectada al exponerlos a radiación. Además, hay otros factores que participan en dicha sensibilidad: el tipo celular, el tejido adyacente y la concentración de oxígeno tisular.

- Tipo celular.

En 1906, Bergonié y Tribondeau evidenciaron que los tumores más diferenciados y por consiguiente los menos proliferativos, son menos sensibles a la radiación que aquellos menos diferenciados y de proliferación rápida. Gracias a ello, en 1936, Paterson propuso una clasificación de la radiosensibilidad tumoral, según el tipo de tejido (Tabla 1-5) (Vogin, 2011).

Tabla 1-5: Clasificación de sensibilidad a la radiación, según tipo tumoral.

SENSIBILIDAD A LA RADIACIÓN	TIPO TUMORAL
Radiosensibles	Tumores embrionarios y hematolinfoides
Radiosensibilidad intermedia	Ca epidermoides y adenocarcinomas
Radorresistentes	Sarcomas y melanomas

- Tejido Adyacente.

El efecto biológico como consecuencia de la irradiación, en células que no han sido tocadas directa o indirectamente (por hidrólisis del agua) por la radiación, es conocido como efecto espectador, testigo o “bystander” y ha cobrado importancia en los últimos 20 años (Morgan & Sowa 2007) (Rzeszowska-Wolny et al. 2009) (Q. Wu et al. 2011). En aquellas células no irradiadas, se han descrito disminución en la supervivencia clonogénica, aumento del intercambio entre cromátidas hermanas, formación de micronúcleos y apoptosis (Rzeszowska-Wolny et al. 2009). Del mismo modo, se han

encontrado efectos favorables de supervivencia de las células tumorales no expuestas a la radiación, por señales de células irradiadas con el diseño de diversas estrategias como el cultivo de células no irradiadas con medio de cultivo de células expuestas a la radiación y viceversa (Q. Wu et al. 2011).

- Concentración de oxígeno.

El aporte de oxígeno a un tejido, depende del balance entre la llegada de oxígeno hasta ese tejido y el consumo del mismo.

La rápida proliferación celular, la cercanía a los vasos sanguíneos, el hematocrito y la vasoconstricción del paciente, la angiogénesis mediada por el tumor mismo, contribuyen con éste fenómeno (Vaupel & Mayer 2007) (Brahimi-Horn et al. 2007a) (Bertout et al. 2008) (Gatenby & Gillies 2004) (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011) y se sabe que la hipoxia favorece la resistencia celular a la radiación (Arvold et al. 2005).

Sin embargo, el proceso de hipoxia tumoral es un proceso dinámico en el que las células no permanecerán expuestas a hipoxia a lo largo del desarrollo tumoral. Por el contrario, estas células estarán expuestas a variaciones en la concentración de oxígeno, fenómeno que se conoce como hipoxia cíclica. En este proceso, la célula tumoral está expuesta a condiciones de hipoxia, seguido de exposición a concentraciones normales de oxígeno y en ocasiones, nuevamente son sometidas a condiciones de hipoxia (Dewhirst 2009).

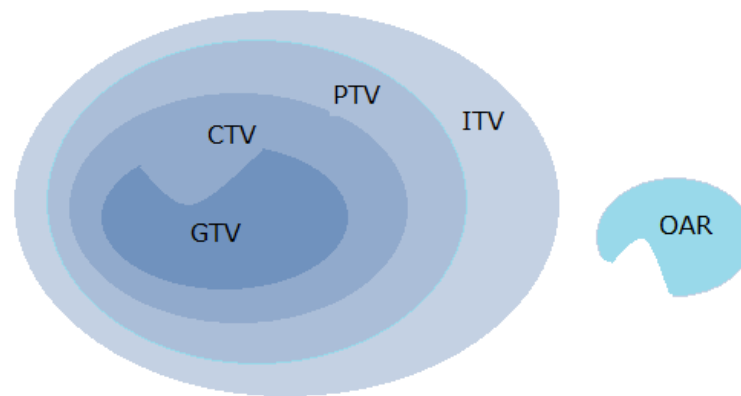
Es importante señalar que se ha identificado que la exposición a radiaciones ionizantes, también general en las células tumorales un fenómeno de reoxigenación, modificando las condiciones de oxigenación del tejido (B. J. Moeller et al. 2004).

1.3.2 Planeación de la radioterapia

Para garantizar una adecuada respuesta terapéutica, que logre afectar principalmente a las células tumorales, aboliendo su capacidad proliferativa y disminuyendo al máximo el daño del tejido sano, se requiere de una adecuada planeación de la forma como será distribuida la radiación en la región donde se encuentra el tumor. Para ello, se tienen en cuenta los volúmenes tumorales: La totalidad del volumen tumoral (Gross Tumor Volume,

GTV), el volumen tumoral clínico (CTV), dentro del que se considera la presencia de células tumorales no visibles con la técnica de planeación utilizada (TAC, PET, PET-TAC), el volumen blanco interno (ITV) y el volumen tumoral planeado para ser tratado (PTV), así como los órganos a riesgo (OAR) dentro de la planeación y la irradiación (Figura 1-2) (Korreman et al. 2010).

Figura 1-2: Volúmenes tumorales en planeación de radioterapia. Tomado de (Korreman et al., 2010).



Gracias al desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y planeación, como la Tomografía por Emisión de Positrones (PET) y la fusión del PET y la Tomografía Axial Computarizada (TAC), se ha logrado una mayor definición del volumen tumoral, al incluir información del metabolismo tumoral en las imágenes obtenidas, como se discutirá más adelante.

1.4 Metabolismo tumoral

Hace casi un siglo (1920), el químico y médico Oto Warburg observó que incluso bajo condiciones normales de oxigenación (normoxia), las células tumorales presentaban un metabolismo anaerobio de la glucosa (glucólisis anaerobia).

En una célula no tumoral, bajo condiciones de normoxia, la glucosa se metaboliza hasta piruvato, el cual ingresa a la mitocondria y es oxidado hasta CO_2 y H_2O . Por otro lado, cuando hay bajas concentraciones de oxígeno (hipoxia), la glucosa es metabolizada hasta lactato, el cual no ingresa a la mitocondria y es exportado fuera de la célula. Este comportamiento es conocido como efecto Pasteur (Gatenby & Gillies 2004) (Busk et al. 2008).

Tabla 1-6: Concentración de oxígeno en los tejidos. Adaptado de (Bertout et al., 2008)

Condición	% de Oxígeno
Concentración de oxígeno Ambiental	21%
Normoxia en tejidos mamíferos	2 – 9%
Hipoxia en tejidos mamíferos	Menor del 2%
Anoxia en tejidos mamíferos	Menor del 0.02%

Se ha evidenciado que la adquisición de dicho fenotipo se da al inicio del proceso de carcinogénesis, en el cuál hay unas células de rápida proliferación, que poco a poco se van distanciando de los vasos sanguíneos, haciéndose más difícil la llegada de sustratos como el oxígeno y la glucosa. Estos cambios en la disponibilidad de oxígeno, permanecen a lo largo del desarrollo y la vida tumoral, habiendo sido descritas alteraciones en cuestión de horas, por vasoconstricción o cambios en el hematocrito o alteraciones de varios días de duración, debidas a remodelación vascular (Gatenby & Gillies 2004). De este modo, las células que mantienen un metabolismo anaerobio, sobrevivirían a los cambios constantes en la disponibilidad de oxígeno. Se ha postulado entonces que el fenotipo glucolítico concede una ventaja adaptativa a la célula tumoral, convirtiéndose en un componente fundamental del fenotipo maligno (Gatenby & Gillies

2004). Además, como se ha mencionado, tendrían una ventaja de supervivencia frente a las células tumorales que tienen metabolismo aeróbico.

Por otro lado, aunque la cantidad de energía producida aparentemente es menor (a diferencia del metabolismo aerobio de la glucosa, en el que la oxidación completa de la molécula produce 36 ATP, la glucólisis anaerobia, produce solamente 2 moléculas de ATP), dentro de los mecanismos adaptativos al metabolismo hipóxico, se favorece la regulación de los transportadores de glucosa (GLUT-1) (Marín-Hernández et al. 2011), la angiogénesis y el desvío de metabolitos intermedios de la glucólisis a otras vías metabólicas (Bertout et al. 2008) (Gatenby & Gillies 2004) (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011). Otro concepto que soporta la glucólisis anaerobia, como mecanismo adaptativo de la célula tumoral, esta dado por la proliferación celular, la cual en tejidos sanos, está restringida por la disponibilidad de sustrato. Esto no sucede en el tejido tumoral, ya que la rápida proliferación es debida a mutaciones en genes que regulan dicha proliferación (Gatenby & Gillies 2004).

Como consecuencia de la glucólisis anaerobia el tejido tumoral presenta un pH bajo, y alteraciones en el estado redox de la célula. La acidificación del medio favorece la invasión y la metástasis secundaria a la activación de metaloproteinasas y otros factores que favorecen la degradación de la matriz extracelular, facilitando la migración de la célula tumoral (Rødningen et al. 2005) (Brahimi-Horn et al. 2007a).

La glicólisis anaerobia ha cobrado nuevamente importancia en los últimos años, en parte gracias al advenimiento de nuevas técnicas de diagnóstico como el PET, que usa como marcador un análogo de la glucosa (¹⁸Fluorodeoxiglucosa) permitiendo la visualización de lesiones primarias y metastásicas (Gatenby & Gillies 2004) (Sattler et al. 2010) (Gregoire & Chiti 2010). Como se mencionó anteriormente, la técnica del PET se fundamenta en el metabolismo tumoral ávido por glucosa. Se han utilizado radiofármacos como la ¹⁸FDG, una glucosa radio marcada con flúor, útil no sólo en la planeación sino también en el diagnóstico de las lesiones tumorales. Con la técnica se pretende irradiar aquellas regiones que muestren una mayor captación de glucosa, pues se presuponen zonas hipóxicas y por lo tanto de mayor radorresistencia (Aristophanous et al. 2012)(Sattler et al. 2010) (Gregoire & Chiti 2010). Sin embargo, este tema ha sido ampliamente discutido y hay autores que afirman que no por ser zonas de mayor captación de glucosa, se tratan de zonas hipóxicas del tejido tumoral (Christian et al.

2010)(Busk et al. 2008), tema que ha causado gran controversia e interés dentro del campo de la radioterapia.

La angiogénesis es otro evento fundamental dentro de la tumorigénesis. Por la rápida proliferación celular y la estabilización de factores de transcripción gracias al metabolismo hipóxico tumoral (ver abajo HIF1 α), se da un proceso de angiogénesis dentro del tumor (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011) (Gatenby & Gillies 2004) (D Hanahan & Folkman 1996) (Dewhirst et al. 2008). De hecho, se ha descrito que el proceso angiogénico inicia muy temprano en el proceso de tumorigénesis, incluso desde la hiperplasia de los tejidos (D Hanahan & Folkman 1996). Este proceso también se ha asociado a factores inhibitorios de la migración de células del sistema inmune al tumor en algunos tipos de cáncer (Xu et al. 2008). Se ha evidenciado que los vasos sanguíneos formados durante estos procesos dentro del tumor son diferentes a los que se encuentran en el tejido sano. Este proceso rápido y la presencia de vasos aberrantes contribuye con los constantes cambios en las concentraciones de oxígeno presentes en el tumor y el establecimiento del fenotipo metabólico descrito, lo cual a su vez regula de forma positiva el proceso angiogénico.

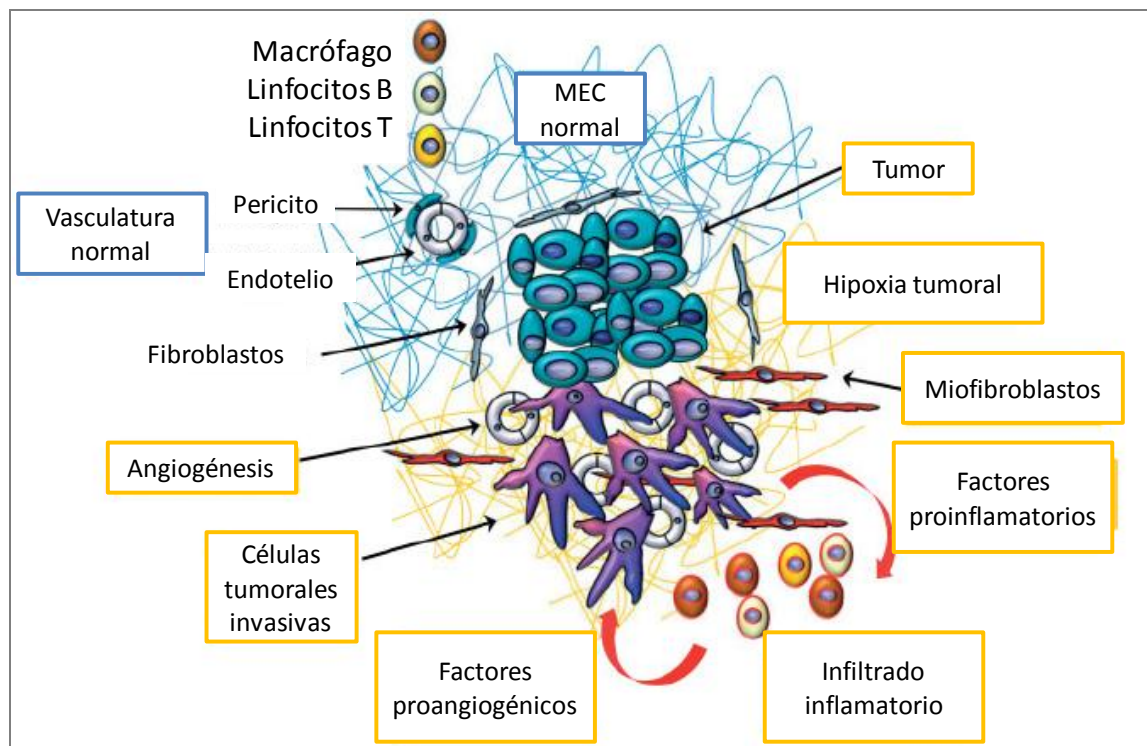
1.5 Microambiente tumoral

Hanahan y colaboradores afirmaron en el 2011 que “La biología de un tumor sólo puede ser entendida estudiando los tipos celulares individuales especializados dentro de éste” (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011)

Gracias a los conocimientos descritos del metabolismo tumoral y el efecto Warburg, herramientas diagnósticas, de planeación y seguimiento de tratamientos (radioterapia) como el PET, han permitido evidenciar diferencias en el tejido tumoral. Se han identificado dentro de los tumores, zonas de mayor y menor captación del radiofármaco (generalmente glucosa) indicando diferente metabolismo dentro del mismo tejido tumoral. Esto ha contribuido en gran parte al estudio actual de los tumores sólidos y todos los componentes que hacen parte de este. Es decir, que el cáncer ya no es estudiado como una célula tumoral con muchas copias de sí misma, sino como diferentes tipos celulares

que están presentes en el mismo tejido y mantienen una estrecha comunicación y señalización y que además luchan por sobrevivir.

Figura 1-3: Microambiente tumoral. Adaptado de (M. Allen & Louise Jones 2011).



Se ha encontrado que un tipo celular predominante dentro de los tumores son los fibroblastos (M. Allen & Louise Jones 2011)(Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011), los cuales favorecen la proliferación y migración de las células tumorales, por la liberación de factores de crecimiento y diferentes quimiocinas (M. Allen & Louise Jones 2011).

Por otro lado, células del sistema inmune como macrófagos y linfocitos B y T, ejercen funciones de supresión tumoral, como ya se mencionó (M. Allen & Louise Jones 2011).

No menos importantes, se encuentran las células endoteliales, las cuales son diferentes a las encontradas en tejido sano y se ha visto que favorecen cascadas de señalización que incrementan la angiogénesis asociada al crecimiento tumoral y son ayudadas en

este proceso por pericitos con proceso de señalización también anormales (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011).

El tejido linfático ha cobrado importancia dentro de este microambiente tumoral, ya que aunque normalmente colapsa dentro del tumor, éste se ha podido identificar en la periferia de los tumores invasivos, sugiriendo una vía para la invasión (Douglas Hanahan & R. a Weinberg 2011).

La matriz extracelular juega un papel fundamental en el desarrollo del cáncer, ya que no sólo sirve como soporte para este tejido y ruta para la comunicación intercelular, sino que también va a favorecer la metástasis. Se ha visto que por la presencia de otras células, como los fibroblastos, se altera el microambiente de la matriz extracelular, siendo variable la composición proteica de ésta, dependiendo del tipo tumoral. Además, como ya se mencionó, dados el metabolismo tumoral glucolítico y la acidificación del medio, se favorece la producción de metaloproteinasas que la degradan y facilitan la invasión tumoral (M. Allen & Louise Jones 2011)(Gatenby & Gillies 2004).

Dado el fenotipo metabólico en que prevalece la glucólisis anaerobia, el microambiente tumoral que favorece un estado de estrés celular y la interacción y señalización de todos los componentes celulares dentro del tumor, se favorece la expresión de ciertas proteínas y la degradación de otras, que en condiciones normales no se presentarían. Hay factores de transcripción que bajo estas condiciones se estabilizan y se translocan, ejerciendo su actividad sobre genes que contribuyen al mantenimiento del fenotipo tumoral y que son candidatos a tratamientos específicamente dirigidos. Dentro de dichos factores, existen 2 proteínas de gran interés; HIF1 α (factor inducible por hipoxia, subunidad α) activado en condiciones normales por la hipoxia, y NRF2 (Factor 2 relacionado con NF-E2), encargado del mantenimiento del estado redox de la célula y que es activado bajo condiciones de estrés, como las radiaciones ionizantes, entre otras.

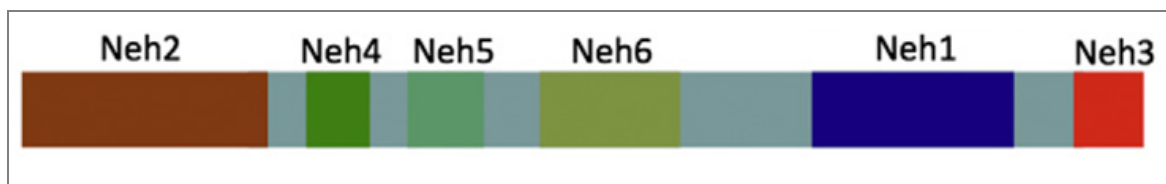
1.6 NRF2

El gen NFE2L2 ó Factor nuclear semejante al derivado eritroide 2, está localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q31) y codifica para el factor de transcripción (NRF2) de

605 aminoácidos y 67827 Da de peso. En condiciones normales, se encuentra en el citoplasma y es translocado al núcleo bajo condiciones de estrés celular (Weizmann Institute of Science 2012).

En 1994 se clonó y caracterizó por primera vez la proteína NRF2 (Moi et al. 1994). Este es un factor de transcripción que contiene un dominio básico de unión al ADN del tipo cremallera de leucina en su extremo C terminal. Además es miembro de la subfamilia de factores de transcripción cap 'n' collar (CNC) (Magesh et al. 2012) (Lau et al. 2008) (Osburn & Kensler 2008). Se encuentra de forma constitucional en diferentes órganos y conserva una alta homología entre especies (Lau et al. 2008).

Figura 1-4: Dominios de la proteína NRF2. Adaptado de (Uruno & Motohashi, 2011)

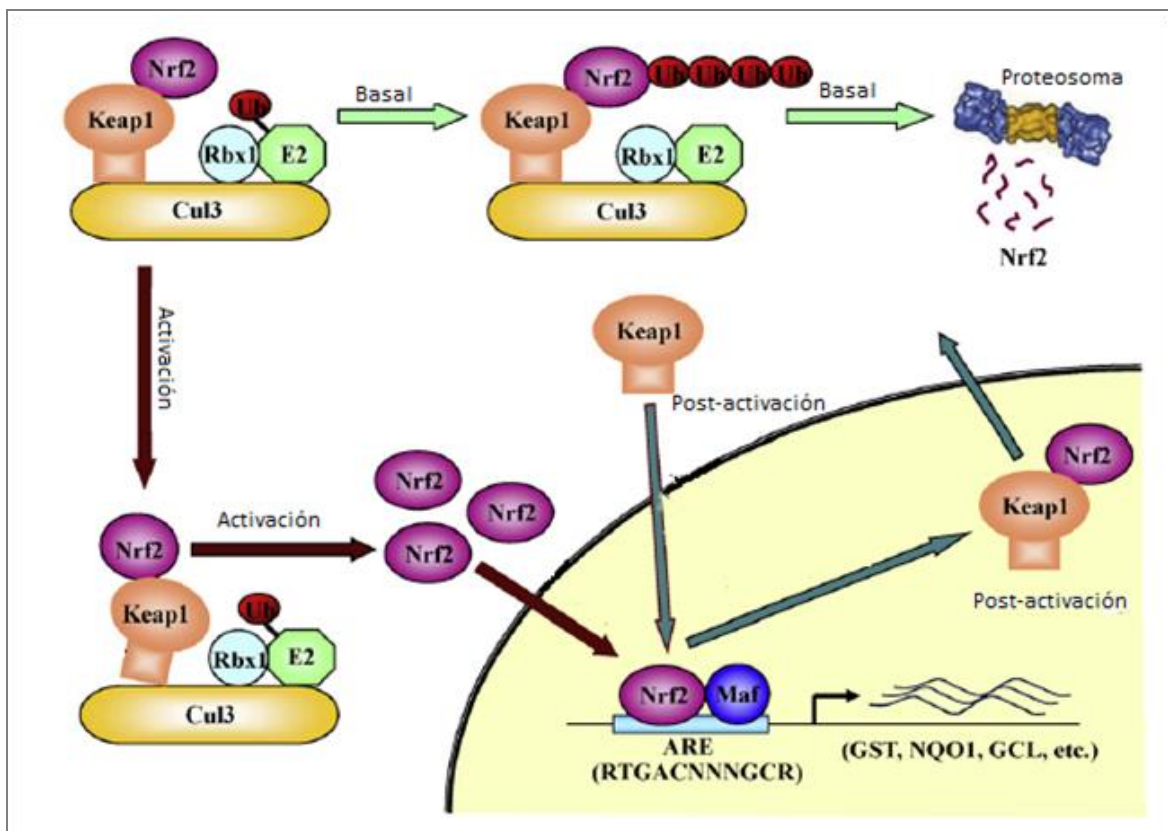


Esta proteína está formada por 6 dominios Neh1 al Neh6 (Figura 1-4). Dentro del dominio 1, se encuentra el dominio de unión al DNA de cremallera de leucina. En el Neh2, se encuentra el sitio de unión al dominio Kelch de la proteína KEAP1, la cual regula de forma negativa a NRF2 al secuestrarla en el citoplasma y favorecer su degradación. Neh3, es requerido para la activación transcripcional, por el coactivador CHD6. Finalmente los dominios Neh4 y 5 son dominios de transactivación ricos en residuos acídicos, a los que se une la proteína de unión a CREB (CBP). No se tiene información de la función del dominio Neh6 (Lau et al. 2008).

Bajo condiciones normales, la proteína NRF2 está en el citoplasma unida a KEAP1. Esta última es el sustrato para el complejo Cul3-E3-ubiquitín ligasa, el cual favorece la ubiquitinación de la proteína NRF2 y la degradación en el proteosoma (Lau et al. 2008)(Osburn & Kensler 2008)(Magesh et al. 2012) y tiene una vida media de 9 minutos (Lau et al. 2008) (figura 1-5).

Al ser expuesta a condiciones de estrés oxidativo u otros elementos como quimioterapéuticos, es la proteína KEAP1 la que censa el cambio en el estado redox de la célula y libera a la proteína NRF2. Esta se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo formando un heterodímero con la proteína MAF (figura 1-6) (Lau et al. 2008)(Magesh et al. 2012)(Osburn & Kensler 2008). Allí, se une a los elementos de respuesta a estrés en las regiones promotoras de los genes blancos de este factor, con la secuencia -GTGACNNGC-. Se ha postulado que el coactivador CBP y el P300, los cuales se unen a los dominios Neh4 y 5 del NRF2, pueden regular la transcripción de algunos genes blanco de NRF2. Se ha demostrado que al ser activada, la vida media de la proteína se incrementa a unos 51 minutos (Lau et al. 2008). Finalmente, cuando el estado redox de la célula es recuperado, es la proteína KEAP1 la que se transloca al núcleo, uniéndose nuevamente a NRF2 para salir al citoplasma, donde es degradada (figura 1-6) (Lau et al. 2008).

Figura 1-5: Regulación de NRF2. Adaptado de (Lau et al., 2008).



Los genes regulados por la proteína NRF2 han sido agrupados en categorías, según su actividad en la célula: Proteínas del balance redox intracelular, enzimas detoxificantes de fase II, y Transportadores (Lau et al. 2008).

El papel principal de las proteínas de balance redox, es mantener los niveles de Glutación y tioredoxina, de modo que haya una disminución de las especies reactivas de oxígeno dentro de la célula. Algunos de los genes regulados por este factor de transcripción son: el gen que codifica para la glutamato cistein ligasa (*GCL*), La glutación peroxidasa (*GPx*), tioredoxina (*TRX*), y la Hem-Oxygenase-1 (*HMOX-1*) (Lau et al. 2008)(Tsukimoto et al. 2010).

La enzimas detoxificantes de fase II, como la glutación S-transferasa (*GST*) y la NAD(P)H quinona oxidoreductasa-1 (*NQO1*), ayudan a metabolizar algunas moléculas tóxicas, en formas menos tóxicas o a solubilizarlas para hacer más fácil su eliminación (Lau et al. 2008)(Magesh et al. 2012).

Las proteínas transportadoras reguladas por NRF2, como la proteína asociada a multirresistencia a drogas *MRP*, están encargadas del ingreso o salida de los xenobióticos. En este caso, cobran gran importancia pues facilitan la progresión de algunos tumores (Lau et al. 2008).

1.6.1 NRF2 en cáncer

El metabolismo tumoral ávido por la glucosa, así como las variaciones en la concentración de oxígeno y la rápida proliferación celular, favorecen la producción de especies reactivas de oxígeno en el tumor. Esto sin contar con elementos a los que son expuestos dichos tumores, como la radioterapia, que favorece el incremento de dichas especies. Todas estas condiciones son un medio favorable para la activación de proteínas de respuesta al estrés, como NRF2.

Desde hace más de 50 años, se ha descrito el efecto benéfico de algunas moléculas derivadas de plantas que luego se han confirmado como inductores de NRF2 (Lau et al. 2008)(Magesh et al. 2012), otorgándole un papel protector frente al cáncer. Sin embargo, en los últimos años, han surgido datos que le confieren a la proteína un papel carcinogénico. En algunos tipos tumorales, se ha encontrado sobreexpresión de NRF2

asociada a proliferación y crecimiento tumoral. Incluso, se ha encontrado que en algunos tipos de cáncer éste factor de transcripción promueve quimiorresistencia y radiorresistencia (Magesh et al. 2012)(Lau et al. 2008).

Como se ha mencionado, las radiaciones ionizantes producen especies reactivas de oxígeno, debido a la radiólisis del agua, generando un estado de estrés celular. Se ha demostrado como NRF2 es activada por la radiación gamma incluso a bajas dosis (100 CGy) verificando su translocación al núcleo y evaluando la expresión de la hemoxigenasa, la cual, como ya se mencionó, es regulada por este factor de transcripción (Tsukimoto et al. 2010). Esta activación se puede estar presentando tanto en tejido tumoral, como en tejido sano, protegiendo a las células sanas que son expuestas a las radiaciones ionizantes y también al tejido tumoral.

Se han propuesto moléculas que inactiven NRF2 en células radiorresistentes y se ha evidenciado que posterior a la exposición a dichas moléculas estas células tumorales, recuperan radiosensibilidad (S. Lee et al. 2012).

1.7 HIF1 α

El factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) es un factor de transcripción heterodimérico, responsable de la activación de genes relacionados con la adaptación celular a la hipoxia. Está conformado por 2 subunidades, una alfa (HIF 1 α), regulada por el oxígeno y una beta (HIF 1 β) constitutiva. Fue descrito por primera vez en 1991 como regulador de la expresión del gen para la eritropoyetina (*EPO*) al identificar una secuencia reguladora en el promotor de dicho gen (Goldberg et al. 1988)(Semenza et al. 1991). Hace parte de la familia de factores de transcripción helix-loop-helix y cada subunidad (α y β) tiene un dominio PAS, que permite la dimerización, o unión de una subunidad con la otra (Ke & Costa 2006)(Bertout et al. 2008)(Brahimi-Horn et al. 2007b)(Semenza 2003).

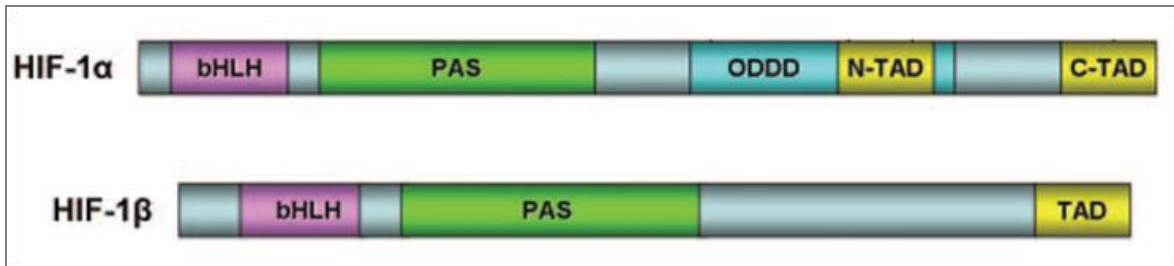
El gen *ARNT* localizado en el brazo largo del cromosoma 1 en humanos (1q21), codifica para una proteína de 789 aminoácidos y con un peso de 86636 Da., la subunidad β del HIF1, también conocida ARNT (por su sigla en inglés Aryl Hydrocarbon Nuclear

Translocator). Esta proteína se localiza en el núcleo, donde no ejerce actividad, hasta que es dimerizada con la subunidad α del HIF1 (Weizmann Institute of Science 2012).

El gen *HIF1A* localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (14q23.2), codifica para una proteína de 826 aminoácidos y un peso de 92670 Da (Weizmann Institute of Science 2012). Esta proteína es la subunidad α del HIF1 y es regulada por oxígeno, como ya se mencionó (Weizmann Institute of Science 2012). La proteína tiene dos dominios de transactivación hacia su extremo C terminal, denominados N-TAD y C-TAD según su cercanía a uno u otro extremo de la proteína. Además tiene un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD), fundamental para su degradación (Ke & Costa 2006)(Brahimi-Horn et al. 2007b)(Bertout et al. 2008) (Figura 1-6).

Posterior a su traducción y bajo concentraciones normales de oxígeno, la subunidad α es hidroxilada por dioxigenasas que contienen dominios proil hidroxilasa (PHD), dependientes de 2-Oxoglutarato y Fe (II). Esta hidroxilación se da en los residuos de prolina 402 y 564 en el ODDD, lo cual favorece la unión del complejo proteico Von Hippel-Lindau – UbiquitinE3 ligasa, que marca la proteína para la poliubiquitinación y degradación vía proteosoma (Brahimi-Horn et al. 2007b)(Ke & Costa 2006)(Bertout et al. 2008). Se ha determinado que la vida media de esta proteína es muy corta, de unos 5 minutos (Ke & Costa 2006). Como parte de las modificaciones postraduccionales, el factor inhibidor de HIF1 (FIH) es otra dioxigenasa que hidroxila un residuo de Asparagina en la posición 803, en el dominio C-TAD, inhibiendo la interacción con CBP/p300, impidiendo así la transcripción de genes blanco (Ke & Costa 2006)(Brahimi-Horn et al. 2007b).

Figura 1-6: Dominios de las subunidades α y β del HIF1. Adaptado de (Ke & Costa, 2006). BHLH: Dominio Helix-loop-helix, PAS: dominio PAS, ODDD: Dominio de degradación dependiente de oxígeno, N-TAD: Dominio de transactivación N terminal, C-TAD: Dominio de transactivación C terminal.



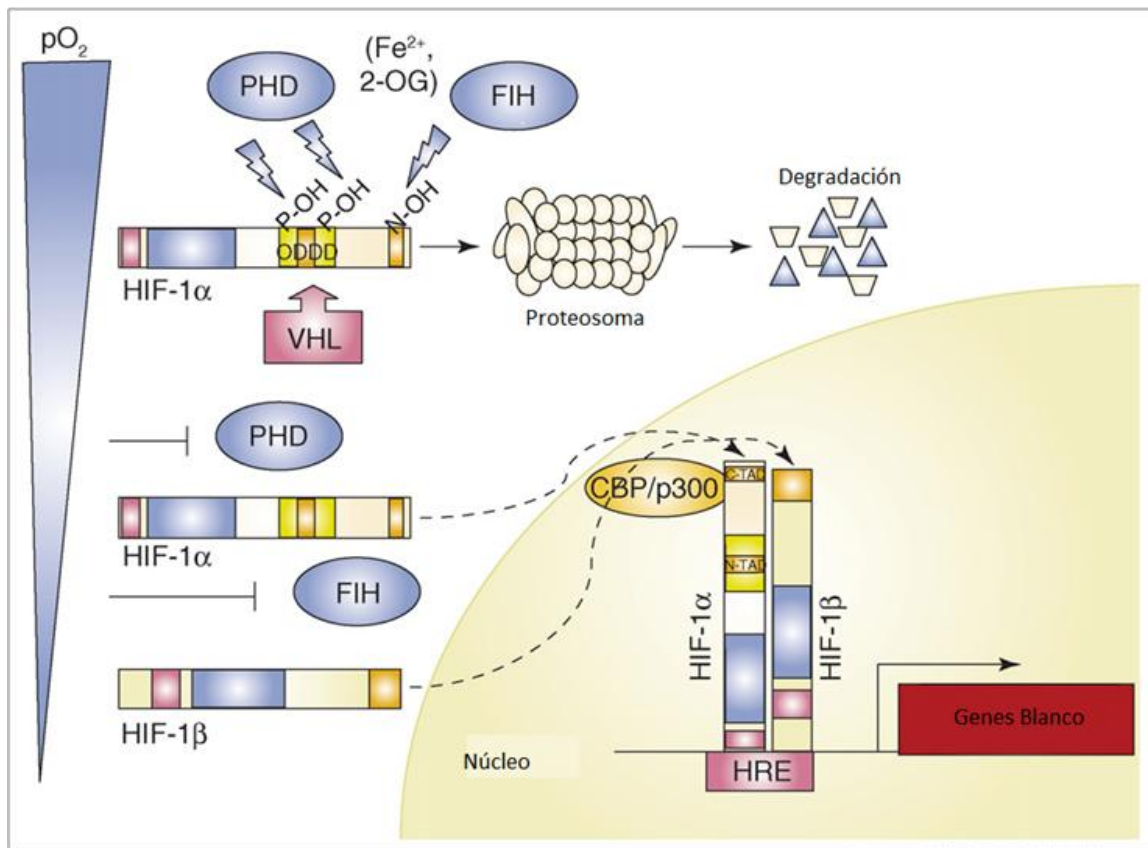
Al disminuir las concentraciones de oxígeno en los tejidos, las proteínas PHD y la FIH, son inactivadas y favorecen la dimerización de las proteínas HIF en el núcleo y la unión del complejo CBP/p300, para luego unirse a los elementos respondedores de hipoxia en las regiones promotoras de los genes regulados por éste (Figura 1-7) (Ke & Costa 2006)(Bertout et al. 2008)(Brahimi-Horn et al. 2007b)(Kizaka-Kondoh et al. 2009). Estos elementos respondedores de hipoxia, son una secuencia de 6 nucleótidos: (A/G)CGT(G/C)(G/C)(Kizaka-Kondoh et al. 2009).

Aunque la fosforilación no determina la activación de la proteína, se ha demostrado que si hay un incremento en su actividad, ya que la fosforilación de la subunidad α por la MAPK facilita su unión a la subunidad β (Ke & Costa 2006).

Se ha evidenciado que la vía de señalización PI3K favorece la transcripción de HIF1 α , encontrándose aumentados los niveles de esta subunidad in vitro (Kizaka-Kondoh et al. 2009). Esto no implica que se facilite la activación del HIF1, pero si aumenta la biodisponibilidad de la subunidad α .

Se conocen aproximadamente 70 genes activados por este factor (Semenza 2003)(Brahimi-Horn et al. 2007b), relacionados con: Metabolismo de la glucosa, proliferación celular, regulación de la transcripción, supervivencia celular, regulación del pH, regulación de la actividad de HIF1, homeostasis del epitelio, resistencia a medicamentos, metabolismo de los nucleótidos, metabolismo del hierro, apoptosis, motilidad celular, estructura del citoesqueleto, adhesión celular, eritropoyesis, angiogénesis, metabolismo de la matriz extracelular, tono vascular, metabolismo energético y metabolismo de aminoácidos.

Figura 1-7: Regulación de HIF1 α . Degradación bajo condiciones de normoxia y translocación nuclear en condiciones de hipoxia. Tomado de (Brahimi-Horn et al. 2007b)



1.7.1 HIF1 α en cáncer

Este factor de transcripción juega un papel fundamental en el desarrollo, metabolismo y tratamiento del cáncer. Se ha podido establecer que en múltiples tumores sólidos hay una sobreexpresión de HIF1 α (Ke & Costa 2006)(J. Kim et al. 2007)(Bertout et al. 2008), lo cual puede ser explicado por la hipoxia intratumoral y por alteraciones genéticas de las células tumorales y se ha asociado a pobre pronóstico al ser detectado en estadios tumorales tempranos (Bertout et al. 2008). En los tumores en que se ha visto una mayor expresión de HIF1 α , respecto al tejido sano son: cáncer de colon, seno, estómago, pulmón, ovario, páncreas, próstata, piel y riñón (W. Liu et al. 2012).

Al disminuir las concentraciones de oxígeno, las células modifican el metabolismo aerobio de la glucosa, en el cual esta molécula es metabolizada hasta piruvato, para ingresar a la mitocondria y producir energía, a uno anaerobio en el que se degrada la glucosa hasta lactato, produciendo una menor cantidad de energía, que la que se produce en condiciones de normoxia. Sin embargo, como ya se ha mencionado, la célula tumoral incluso en condiciones de normoxia lleva a cabo una glucólisis anaerobia, lo cual se ha demostrado como un metabolismo adaptativo de la célula a las variables concentraciones de oxígeno. Ello implica que la célula tumoral requiere una mayor cantidad de glucosa, para garantizar el aporte de energía suficiente. Los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 y enzimas de la glucólisis como la fosfoglicerato cinasa 1 (PGK 1) y la piruvato cinasa M2 (PKM2), la lactato deshidrogenasa (LDH), así como el transportador de monocarboxilato 4 (MCT4) encargado de la salida de lactato de la célula (W. Liu et al. 2012)(J. Kim et al. 2007), son regulados por el HIF1a, en respuesta a la hipoxia facilitando los cambios metabólicos requeridos para ello.

Debido a la rápida proliferación celular tumoral y las variables condiciones de oxígeno dentro de este tejido, la angiogénesis juega un papel importante en el desarrollo tumoral. En este proceso, HIF1 también está involucrado. Dentro de los genes regulados por este factor, se encuentra el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual favorece la creación de neovascularización dentro del tumor. Además de esta proteína, la Angiopoyetina 2 (ANGPT2), el Receptor Similar a Receptor de Calcitonina (CRLR), la semaforina 4D (SEMA4D), entre otras, también han sido identificadas como blancos

activados por HIF1 y están directamente relacionadas con la angiogénesis (Brahimi-Horn et al. 2007a)(W. Liu et al. 2012). La generación de una nueva red vascular, facilita el aporte de oxígeno al tejido en crecimiento y la llegada de nutrientes como la glucosa, de alto consumo en este tejido, como ya se mencionó.

Como consecuencia de este metabolismo el pH extracelular disminuye, generando un ambiente acidótico que progresivamente lleva a la célula a su muerte. Sin embargo, se ha observado que las células tumorales mantienen su pH intracelular normal o incluso más alcalino respecto al extracelular. Esto se ha relacionado con la actividad de HIF1, ya que la anhidrasa carbónica IX y algunas proteínas de membrana y bombas como el intercambiador de Na^+/H^+ (NHE-1) que favorecen la regulación y mantenimiento del pH intracelular, son reguladas por este factor de transcripción (Brahimi-Horn et al. 2007a)(J. Kim et al. 2007).

La metástasis es determinante en la progresión del tumor y el pronóstico del mismo. El factor de transcripción HIF1 también ha sido implicado en esta característica del tejido tumoral, pues se ha demostrado que regula de forma negativa proteínas de adhesión celular como la E-caderina y otras moléculas de adhesión como $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 5\beta 5$ e intergrinas $\beta 1$ expresadas en la matriz extracelular, lo que resalta la importancia del microambiente tumoral. Así mismo, las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP2 y MMP9) son reguladas de forma positiva por HIF1 y la acidificación del espacio extracelular facilita su activación (W. Liu et al. 2012).

Además de cumplir un papel fundamental en el desarrollo y sostenimiento tumoral, así como en la metástasis, HIF1 también es protagonista en la respuesta tumoral a la radiación. Se ha demostrado que esta proteína es activada en la célula tumoral posterior a la irradiación confiriéndole radorresistencia (B. J. Moeller et al. 2004)(Dewhirst et al. 2007)(Dewhirst et al. 2008).

2. Objetivo de la investigación

Se ha planteado que las células tumorales presentan un metabolismo ávido por la glucosa. Sin embargo, como se ha mencionado, gracias al estudio del microambiente tumoral y tecnologías como el PET, se ha logrado la identificación de zonas en el tumor que no están captando la glucosa. Las variaciones en la concentración de oxígeno juegan un papel fundamental en el establecimiento de este fenotipo metabólico y perduran a lo largo de la vida tumoral. Dentro de múltiples factores relacionados con la adaptación a este fenotipo, la angiogénesis y el tejido endotelial han sido de gran importancia. Estas observaciones nos llevaron a plantearnos la pregunta de investigación.

2.1 Pregunta de Investigación

¿Existen diferencias en la captación de glucosa en células tumorales de mama y colon al ser cocultivadas con células endoteliales y sometidas a condiciones de hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes?

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la hipoxia-reoxigenación, las radiaciones ionizantes y el cocultivo con células endoteliales sobre la captación de glucosa en células tumorales de seno y colon.

2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar las diferencias en la captación de glucosa en células tumorales de seno y colon, y en células endoteliales al cultivarlas en condiciones de normoxia o hipoxia-reoxigenación.
- Establecer los cambios en la captación de glucosa en las células tumorales en cocultivo con células endoteliales sometidas a condiciones de hipoxia-reoxigenación y normoxia.
- Analizar el efecto de la exposición a radiaciones ionizantes en la captación de glucosa de las células en cultivos aislados y en cocultivos en condiciones de normoxia e hipoxia-reoxigenación.
- Establecer una relación entre la expresión de la proteína NRF2 y la posible variación en la captación de glucosa en los cultivos de células tumorales y endoteliales, en respuesta a hipoxia-reoxigenación e irradiación, como estresores.
- Determinar la localización subcelular de los factores de transcripción NRF2 y HIF1 α tanto en los cultivos aislados, como en los cocultivos de las células tumorales y endoteliales, en respuesta a la hipoxia-reoxigenación e irradiación.

3. Metodología

3.1 Cultivo celular

3.1.1 Líneas celulares

Este trabajo se realizó utilizando como modelo cultivos de líneas celulares de cáncer de seno (MCF-7) y colon (HT-29), y cultivos de una línea celular derivada de células endoteliales de cordón umbilical (EA.hy926). La línea MCF-7 fue aislada por primera vez en 1970 de un adenocarcinoma de mama, con metástasis pulmonar, de una mujer caucásica de 69 años. Esta línea expresa receptores de estrógeno y es, además, positiva para el oncogen *WNT7*. La línea conserva muchas de las características del epitelio mamario diferenciado, como la capacidad de procesar el estradiol a través del receptor estrogénico mencionado y expresa proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP).

La línea HT-29 es una línea celular epitelial, que fue obtenida en 1964 a partir de adenocarcinoma colorrectal, de un tumor extirpado de una mujer caucásica de 44 años de edad. Los hallazgos ultraestructurales mencionados en la literatura incluyen microvellosidades, microfilamentos, mitocondrias grandes, vacuolas con gránulos oscuros, retículo endoplásmico rugoso y liso con ribosomas libres, gotas lipídicas, escasos lisosomas primarios y abundantes lisosomas secundarios. La línea es positiva para la expresión de los oncogenes C-MYC, K-RAS, H-RAS, N-RAS, MYB, SIS y FOS.

La línea EA.hy926 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 un clon resistente a la tioguanina de A459 (Carcinoma de pulmón) por exposición a polietilenglicol. Esta línea tiene funciones de células endoteliales diferenciadas tales como angiogénesis, homeostasis/trombosis, presión sanguínea e inflamación y en las fotomicrografías

electrónicas se evidencian cuerpos de Weibel-Paladel y organelas específicas de tejido endotelial en el citoplasma.

3.1.2 Mantenimiento y preparación de los cultivos celulares

Las líneas celulares tumorales y la línea endotelial se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium), suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% (Medio de cultivo completo). Para la preparación del medio de cultivo, se utilizó Medio DMEM en polvo (Gibco®), aminoácidos no esenciales 1X (Gibco®), Bicarbonato de sodio (Sigma®) 3.8 mM, piruvato de sodio 1.21 mM (Sigma®), y Suero fetal bovino (SFB) a una concentración de 10% (v/v) (Eurobio®), ajustando el pH a 7.2. El medio fue filtrado con membranas de acetato de celulosa de 0.2 (µm). Se comprobó la esterilidad de todos los medios de cultivo por siembra en agar sangre durante 3 días y Sabouraud durante 8 días.

Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm², y se realizaron cambios de medio cada 3 días. Al alcanzar una confluencia del 90%, se retiró el medio de cultivo de la caja, se realizaron tres lavados un Buffer Fosfato Salino (PBS, 10 mM Fosfato monosódico, 10 mM Fosfato disódico y 100 mM Cloruro de Sodio a un pH de 7.4) y se adicionó una solución de tripsina al 0.25% (2.8 mM Ácido etilendianimotetraacético (EDTA) y Tripsina en polvo Gibco® 1:250 disuelta en PBS a un pH ajustado a 7.3) para despegar y disgregar las células de la caja de cultivo. Se incubó por 5 minutos a 37°C y se detuvo la actividad de la tripsina con medio de cultivo completo. Se centrifugó la suspensión obtenida de la disgregación celular por 5 minutos a 1500 RPM, y el precipitado celular obtenido, fue resuspendido en 5 mL de medio completo.

Se realizó un conteo del número de células en la suspensión utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Este instrumento consta de dos placas de vidrio entre las cuales se deposita un volumen conocido de muestra. Una de las placas posee una cuadrícula de dimensiones predeterminadas que es visible al microscopio. Para el procedimiento de conteo se agregaron 100 µL del medio de cultivo en el que se encontraban suspendidas las células en 400 µL del colorante vital azul Tripan al 1%. Las células viables, son impermeables al colorante Azul Tripan, ya que su membrana se encuentra íntegra. Cuando la integridad de la membrana celular es afectada, el colorante ingresa a la célula,

tiñéndola de azul. De este modo, las células viables serán identificadas al no tener ninguna coloración (Edited By Celis 2006). Dicha solución fue resuspendida y de allí se tomaron 8 μL que se introdujeron en el hemocitómetro. Se observó al microscopio invertido y se realizó el conteo de las células en 5 campos de la cuadrícula. Teniendo en cuenta la cantidad de células contadas allí y conociendo el volumen de líquido depositado en la cámara, se calculó la concentración de células por unidad de volumen de la solución en la que se encontraban suspendidas las células, de acuerdo a la siguiente fórmula:

Fórmula 3-1: Conteo de células en hemocitómetro

$$N = \frac{\text{Conteo celular}}{5} \times \frac{1}{\text{Factor de dilución}} \times 10^4$$

Según el experimento a realizar, las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 25 ó 75 cm^2 , cajas de cultivo de 6 ó 24 pozos, o colocadas en suspensión en tubos de centrífuga de 15 mL.

3.1.3 Cocultivos

Las células de las líneas MCF-7, HT-29 y EA.hy926 fueron cultivadas en frascos de cultivo de 25 cm^2 , hasta alcanzar una confluencia del 90%. Posteriormente, las células fueron disgregadas con tripsina al 0.25% y contadas de acuerdo al protocolo previamente descrito.

Se realizaron cocultivos de células tumorales con células endoteliales. Para ello, las condiciones de cultivo fueron estandarizadas utilizando diferentes razones entre las células endoteliales y tumorales, a saber: 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 y 1:7. Además, se permitió la adherencia de las células endoteliales antes de colocar las células tumorales, durante 2 y

24 horas. Se observó que la dilución en la que mejor se diferenciaban las células tumorales de las endoteliales en microscopía óptica y había suficiente cantidad de unas y otras para ser contadas, fue de 1:5 para ambas líneas tumorales. En cuanto al tiempo de adherencia permitido a la célula endotelial, no se encontraron diferencias. Se eligió entonces la siembra de la célula tumoral a las 2 horas de haber sembrado la célula endotelial, para optimizar el tiempo de los experimentos.

Finalmente se estableció la siembra en cada pozo de una caja de 24 pozos, de 20000 células endoteliales en medio de cultivo completo. A las 2 horas, fueron sembradas 5000 células tumorales (HT29 ó MCF-7) y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por 24 horas, para luego someterlas a las condiciones requeridas (hipoxia-reoxigenación, normoxia, irradiación, etc.).

3.1.4 Inducción de hipoxia-reoxigenación

La inducción de condiciones de hipoxia se realizó mediante el uso de una cámara de hipoxia aislada (C-Chamber, BioSpherix®) y un controlador de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono ProOx C-21 (BioSpherix ®), previamente calibrado con nitrógeno puro y una mezcla de gases de 90% de oxígeno y 10% de dióxido de carbono.

Las líneas celulares y/o los cocultivos fueron incubados dentro de la cámara de hipoxia, con una confluencia celular del 70 - 80 % para la extracción de proteínas y la Inmunocitoquímica. Para los ensayos con sonda de glucosa, se obtuvo una confluencia celular del 50%. Se colocó medio de cultivo fresco, con una composición de gases de 1%O₂ y 5%CO₂, balanceado con N₂ y a una temperatura de 37°C, humidificado, por un lapso de 24 horas. El tiempo de permanencia en la cámara se tomó desde el momento en que la cantidad de oxígeno y dióxido de carbono se estabilizó en el monitor del controlador. Las condiciones de hipoxia se mantuvieron mientras las cajas de cultivo permanecían dentro de la cámara de hipoxia. Al ser retiradas de allí, los cultivos celulares fueron expuestos a oxígeno ambiental durante 30 minutos, presentándose reoxigenación.

3.2 Construcción de curvas de supervivencia

Las condiciones de irradiación fueron establecidas y estandarizadas con la colaboración del Grupo de Física Medica de la Universidad Nacional. Las células fueron sometidas a radiaciones ionizantes en un acelerador de partículas de uso clínico (Clinac IX Trilogy) facilitado por el Centro de Control del Cáncer de Bogotá. Para garantizar el equilibrio electrónico y la homogeneidad de dosis en el volumen blanco, se utilizó un simulador físico construido en parafina, de densidad electrónica equivalente a la del agua. Los niveles adecuados de radiación requeridos para irradiar los cultivos fueron determinados por tres técnicas de dosimetría diferentes: dosimetría en un arreglo de diodos Map-Check®, dosimetría en cámara de ionización y dosimetría en placa radiográfica (Quintero 2012).

Las células a irradiar fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 cm² hasta lograr una confluencia del 80%. A las 24 horas de la siembra, fueron sometidas a condiciones de hipoxia-reoxigenación o normoxia por 24 horas. Posteriormente, se realizó la disgregación celular utilizando tripsina según el protocolo mencionado previamente. El pellet celular obtenido se resuspendió en un volumen de 5 ml y se llevó a cabo el conteo celular con hemocitómetro, según las condiciones descritas previamente. Se colocaron 50000 células en tubos de centrifuga cónicos de 15 ml, con 5 ml de medio DMEM completo. Cada tubo se rotuló de acuerdo a la dosis a irradiar y los estresores a los que fueron sometidas las células. Previo a la irradiación se resuspendió por inversión el tubo que contenía las células y se colocó en el simulador físico. Luego se procedió a la irradiación dividiendo la energía a utilizar repartida en 2 dosis entregadas al cubo de parafina desde dos ángulos diametralmente opuestos, garantizando una entrega de dosis homogénea. Las dosis elegidas para la construcción de las curvas fueron 0 (control), 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy. Posterior a ello, se prepararon cajas de cultivo celular de 6 pozos con 2 ml de medio DMEM completo y se marcaron con las dosis, el tipo de células y las condiciones de irradiación, por triplicado.

Luego se procedió a la siembra celular. El número de células a sembrar varió de acuerdo a la dosis recibida, ya que lo que se pretende con la curvas de supervivencia es evaluar la capacidad reproductiva de las células. Para ello, se calculó la eficiencia de sembrado,

la cual hace referencia a la capacidad de de formación de las colonias de cada línea celular (Munshi et al. 2005), con la fórmula mostrada a continuación:

Fórmula 3-2: Eficiencia de sembrado

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

A partir de la eficiencia de sembrado calculada, se determinó el número de células a sembrar para cada condición:

Tabla 3-1: Número de células a sembrar, según la dosis de radiación

0 Gy	200 células
1 Gy	200 células
2 Gy	400 células
4 Gy	800 células
6 Gy	1200 células
8 Gy	1600 células
10 Gy	2000 células

Se verificó la existencia de células en cada uno de los pozos mediante microscopio invertido y se llevaron a la incubadora a 5% de CO₂ a una temperatura 37 °C y atmosfera humidificada durante 14 días. Regularmente, se verificó el crecimiento de las colonias y descartó contaminación de los cultivos.

Al finalizar los 14 días las colonias se tiñeron utilizando violeta de metilo. Para ello, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Se colocó formaldehído al 8% en cada pozo (2 mL) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el formaldehído y se realizaron 3 lavados con PBS nuevamente, posterior a lo cual

se colocó el violeta de metilo (Violeta de metilo 10 mg/ml, Metanol 70 % y H₂O 30 mL) en cada pozo, durante media hora. Se realizaron lavados exhaustivos de cada pozo con agua destilada, retirando el exceso de colorante.

3.2.1 Conteo de colonias

Partiendo de la definición de colonia, en la que se toma en cuenta la capacidad reproductiva de la célula sometida a un estresor (Munshi et al. 2005), previo al conteo se verificó en el microscopio la presencia de más de 50 células en cada colonia visible a simple vista. Posteriormente, las cajas de cultivo previamente teñidas fueron escaneadas y se realizó el conteo de las colonias con la herramienta *Cell Counter*, del programa Image J ®. Después del conteo de colonias se calculó la eficiencia de sembrado (ES), definida como un porcentaje dado por el número de colonias compuestas de al menos 50 células (C) en relación al número de células sembradas (M) (ver fórmula 3-2).

Se determinó además la fracción de supervivencia (FS) definida como la relación de la eficiencia de sembrado para una dosis determinada, en relación a una dosis 0 Gy control (fórmula 3-3).

Fórmula 3-3: Fracción de supervivencia celular.

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

La información fue analizada y procesada por un físico médico, con ayuda de los programas OpenOce® y Gnuplot®, ajustando los datos al modelo lineal cuadrático y el modelo lineal cuadrático cúbico para ajustar las regiones de altas dosis y construir las curvas.

3.3 Irradiación de cultivos celulares

Al igual que para las curvas de supervivencia, para todos los procedimientos que involucraron radiaciones, las células fueron irradiadas en la Clínica del Country, con el acelerador lineal de partículas de uso clínico Clinac IX Trilogy. En todos los casos, las células fueron irradiadas con fotones a una dosis de 2 Gy, con 6MeV y una tasa de dosis de 500 cGy/UM.

Para la extracción de proteínas, las células fueron irradiadas en las cajas de cultivo de 75 cm². Las células fueron sembradas para lograr una confluencia del 80% y a las 24 horas, sometidas a las condiciones de oxigenación requeridas (normoxia, hipoxia – reoxigenación) por 24 horas más. Posteriormente fueron sometidas a radiaciones ionizantes y se continuó con el protocolo de extracción de proteínas (ver adelante).

Para los ensayos con sonda de glucosa e irradiación, las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 24 pozos. Se colocaron 25000 células para lograr una confluencia del 50% y a las 24 horas se sometieron a hipoxia-reoxigenación o normoxia, según el experimento. Finalmente, a las 24 horas, fueron sometidas a radiaciones ionizantes y se completó el protocolo establecido para la sonda de glucosa (ver abajo).

En el caso de la Inmunocitoquímica, se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos con portaobjetos sobre los que se sembraron 30000 células, para lograr una confluencia del 50%. Al igual que para los dos procedimientos anteriores, se cultivaron por 24 horas, tras lo cual se sometieron a las variaciones en la concentración de oxígeno por 24 horas más. Estas células, también fueron irradiadas directamente sobre la caja de cultivo.

En todos los casos los cultivos celulares fueron transportados a -4°C desde y hacia el sitio de irradiación. Además, la planeación dosimétrica también fue elaborada por un físico médico del departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia.

3.4 Análisis de la captación de glucosa

La determinación de los niveles de captación de glucosa en líneas celulares tumorales y en células endoteliales, se realizó analizando la fluorescencia emitida por el fluoróforo de la sonda 2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino-2deoxiglucosa (2-NBDG Invitrogen

®). La 2-NBDG es una forma no metabolizable de la glucosa que consiste en un pequeño fluorocromo unido a D-glucosa por el carbono 2. Esta sonda tiene un pico de excitación a 465 nm y un pico de emisión a 540 nm. La sonda ingresa a la célula gracias a los transportadores GLUT y es fosforilada en el carbono 6 por la hexoquinasa y retenida intracelularmente por el mismo mecanismo que la glucosa (O'Neil et al. 2005).

Se realizó una solución stock de la sonda de glucosa a una concentración de 0.05 M diluyendo el liofilizado en agua destilada desionizada y se alicuotó y almacenó en tubos de microcentrífuga a -20°C , según las indicaciones del producto y protegida de la luz, para su posterior uso.

Para determinar la concentración de la sonda a utilizar, se realizaron mediciones con diferentes concentraciones de la sonda de glucosa, para elegir aquella concentración en que se obtuviera una adecuada fluorescencia en cada línea celular.

Las células se cultivaron en cajas de 24 pozos a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y oxígeno al 21%. Se sembraron 25000 células por pozo y al alcanzar una confluencia del 90%, el medio de cultivo fue retirado y las células lavadas tres veces con 0.5 mL de una solución modificada de sal (MBSS) con una osmolaridad final de 300 mOsm/L (NaCl 140 mM, KCl 5.4 mM, MgCl_2 0.5 mM, MgSO_4 0.4 mM, NaHCO_3 3.3 mM, CaCl_2 2.0 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4). Luego, se incubó cada pozo con una concentración diferente de glucosa: 0, 0.05, 0.15, 0.25 ó 0.3 mM de 2-NBDG, por triplicado para cada concentración, durante 30 minutos, protegido de la luz. La sonda de glucosa fue disuelta en la solución de sal MBSS (la cual no contiene glucosa) logrando la concentración requerida para cada pozo. Al cumplir el tiempo de la incubación, se realizaron lavados de cada pozo con MBSS, protegiendo la caja de cultivo de la luz, durante 10 minutos. Finalmente, se retiró la solución de sal de cada pozo y se colocaron 0.5 ml de D-MEM completo, para su visualización y fotodocumentación.

Se realizaron ensayos de captación de glucosa para las líneas celulares individuales (EAhy 926, MCF7 y HT29) y para los cocultivos de células endoteliales con células tumorales. Se utilizaron 3 condiciones de estrés celular; hipoxia – reoxigenación, normoxia e irradiación e hipoxia – reoxigenación e irradiación, con normoxia como control. Para estos ensayos, se sembraron 25000 células por cada pozo, para el caso de los cultivos individuales y 20000 células endoteliales y 5000 células tumorales en el caso

de los cocultivos, siguiendo el protocolo descrito para cocultivo (ver sección 3.1.3. cocultivos). Se realizaron los ensayos por triplicado y en cada caso, se utilizó un control con 0 mM de glucosa.

Los cultivos y cocultivos se colocaron en incubación por 24 horas a 37°C, con O₂ al 21% y CO₂ al 5%, para lograr una adecuada adherencia celular. A las 24 horas, fueron sometidas a las condiciones de oxigenación (normoxia, hipoxia-reoxigenación), según el ensayo a realizar y 24 horas después se irradiaron, en los casos en que correspondía. Posterior a ello, se retiró el medio de cultivo de cada pozo, se realizaron 3 lavados con MBSS y se colocó la sonda en cada pozo a una concentración de 0.3 mM en MBSS para los experimentos y solución MBSS para los controles, con un volumen final de 0.5 ml en ambos casos. Se incubaron a 37°C por 30 minutos protegidos de la luz y posterior a ello, se realizaron lavados con MBSS por 10 minutos. Finalmente, se colocó medio de cultivo completo (D-MEM) y se llevaron las células para fotodocumentación.

3.4.1 Adquisición de imágenes

Las imágenes de la sonda fueron obtenidas con ayuda de un microscopio de fluorescencia Zeiss AXIO Observer A1 (Zeiss) equipado con una lámpara de fluorescencia HBO100 VE y una cámara monocromática adaptada a este (AXIO camHRm Carl Zeissmicroimagin 6 GMBH), configurada con el programa AxioVision Release 4,8,2 (06-2010). Las condiciones para la toma de las fotos fueron estandarizadas para lograr la toma de cada foto bajo las mismas condiciones de exposición. Se tomaron 3 fotos por cada pozo, con un objetivo de 40X. Se eligió éste objetivo con el fin de capturar un mayor número de células por foto y disminuir la exposición a la luz fluorescente, para reducir el posible blanqueamiento de la sonda. Estos instrumentos fueron facilitados por el Centro Internacional de Física (CIF) de la Universidad Nacional de Colombia. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas para su posterior análisis, con ayuda del programa ImageJ®.

Inicialmente, se realizó un conteo celular en campo claro, con la herramienta *Cell Counter* del programa Image J®. Luego, en fluorescencia, se contaron el número de células presentes y se calculó la diferencia entre estas y las observadas en campo claro. Con la herramienta *ROI manager* del programa mencionado, se delineó cada célula

presente en el campo y se midió la fluorescencia. Se midió la emisión de máximo 30 células por foto, elegidas aleatoriamente. Además, se evaluó la fluorescencia del fondo del campo (Background) utilizando la misma herramienta, en 6 puntos diferentes de dicho campo. Se estimó la fluorescencia total del campo, promediando los valores obtenidos del cálculo de la fluorescencia del total de células y restando a este resultado el promedio de fluorescencia del background (fórmula 3-4).

Fórmula 3-4: Fluorescencia total del campo

$$\text{Fluorescencia del campo} = \text{Prom. Fluorescencia Células} - \text{Prom. Background}$$

También se llevó a cabo el cálculo de la diferencia entre el número de células totales, contadas en el campo claro y el número de células fluorescentes, obteniendo el porcentaje de células fluorescentes por campo (fórmula 3-5).

Fórmula 3-5: Porcentaje de células fluorescentes por campo

$$\text{Células fluorescentes por campo} = \frac{\# \text{ células contadas en fluorescencia}}{\# \text{ células contadas en campo claro}}$$

Al realizar el análisis de las imágenes, se encontró que había algunas células con una mayor fluorescencia que otras y esto variaba de una línea celular a otra. Por esta razón, se decidió hacer un cálculo de la fluorescencia individual de cada célula dentro de la foto. Se tomó como 100% de fluorescencia el valor más alto de la foto y a partir de allí, se calculó el porcentaje individual. Luego, se agruparon las células por rangos de fluorescencia; 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% y 80-100% y se calculó el porcentaje de células pertenecientes a cada rango (Fórmula 3-6), para agruparlas en poblaciones, según la captación de glucosa de cada una.

Fórmula 3-6: Fluorescencia individual

$$\text{Porcentaje de fluorescencia individual} = \frac{\text{Fluorescencia de la célula} \times 100}{\text{Fluorescencia máxima del campo}}$$

3.5 Ensayo de citotoxicidad por MTT

En cajas de 96 pozos, se sembraron 25000 células de cada línea celular estudiada (EA.hy 926, MCF7, HT29) y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y O₂ al 21%. A las 24 horas, se sometieron a hipoxia – reoxigenación, con normoxia como control, por 24 horas. Completado el tiempo, se procedió a verificar LA viabilidad celular. Para ello, se dejaron 3 pozos para evaluar el comportamiento en normoxia e hipoxia-reoxigenación e irradiación. En otros 3 pozos, se colocó peróxido de hidrógeno al 30%, como control positivo y en 3 pozos se realizó un ensayo con sonda de glucosa, a una concentración de la sonda de 300 μM. Completado el procedimiento de la sonda, se procedió a retirar el medio de cultivo de cada pozo y el peróxido de hidrógeno de los pozos correspondientes y se adicionó a cada pozo un volumen de 100 μL de medio DMEM con bromuro de 3-4,5-dimetitiazol-2-ilo-2,-5 difeniltetrazol (MTT, Sigma ®) a una concentración de 1 mg/mL y se incubó por 2 horas a 37°C en normoxia. Al cabo de este tiempo, se retiró el medio de cultivo de cada pozo y se añadieron 100 μL de isopropanol 0.05 N HCl. Se cubrió de la luz y se incubó por 1 hora en plataforma balanceante por una hora más. Finalmente, se llevó para ser leída en un lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader de BioRad (Ref. 168 – 1130) y se calculó el porcentaje de viabilidad teniendo en cuenta el número de células sometidas a tratamiento y las que no (fórmula 3-7).

Fórmula 3-7: Cálculo de viabilidad celular

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

3.6 Análisis de proteínas

3.6.1 Extracción de proteínas

Se sembraron las células en cajas de cultivo de 75 cm² y fueron incubadas en una atmósfera húmeda a 37°C, con una concentración de oxígeno del 21% y de CO₂ del 5% por 24 horas, para permitir su adecuada adherencia. Al cabo de ese tiempo, se sometieron a las condiciones de oxigenación requerida (normoxia ó hipoxia – reoxigenación) y 24 horas más tarde, se sometieron a condiciones de irradiación, en los casos en que correspondiera. Se realizó extracción de proteínas en 4 condiciones: normoxia, hipoxia – reoxigenación, normoxia e irradiación, hipoxia – reoxigenación e irradiación.

Al finalizar la exposición a las condiciones estresantes, se procedió a la extracción de las proteínas. Para ello, se retiró el medio de cultivo de las cajas y se realizaron 3 lavados con PBS 1X, el cual fue retirado en su totalidad. Luego, se colocó en cada caja 500 µl de Buffer de lisis RIPA. Este buffer se preparó con: Tris-Cl pH 7.4 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 (SIGMA ®) 0.5% y agua estéril desionizada. Previo al momento de ser agregado en la caja de cultivo, por cada 500 µL del buffer, se agregaron 3 inhibidores de proteasas: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF Phenylmethylsulfonyl fluoride SIGMA ®) 1 mM, Na₃VO₄ 1mM y un coctel inhibidor de proteasas (Protease Inhibitor Cokctail for use with mammalian cell and tissue extracts SIGMA-ALDRICH ®) 2,5 µL. Luego, se raspó la caja de cultivo con un escobillón específico para esta función y el lisado fue transferido a un tubo de microcentrífuga. Se lisaron las células al resuspender la solución varias veces con una jeringa de 1 mL. Posterior a ello, la solución se incubó por 15 minutos a 4°C. Luego, se centrifugó por 15 minutos a 14000 revoluciones por minuto y con una temperatura de 4°C. Al finalizar la centrifugación, se

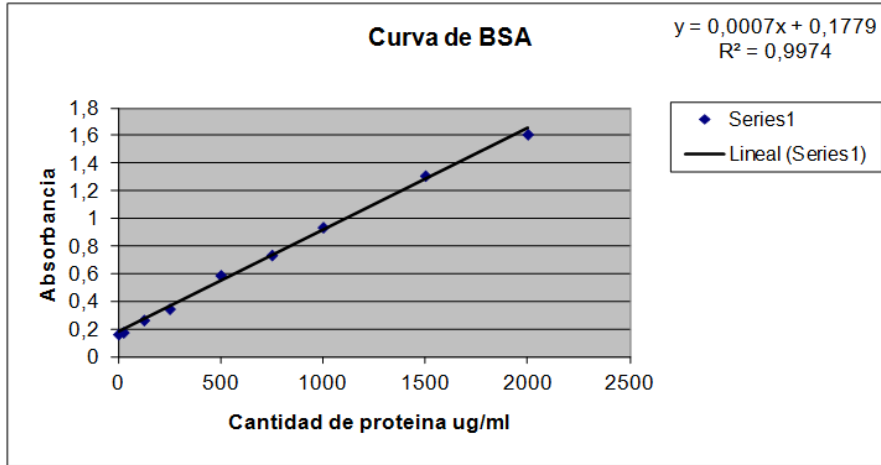
tomó el sobrenadante, descartando el precipitado, donde se encuentran los detritus celulares, y se almacenó a -80°C para su posterior cuantificación y uso.

3.6.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas, se utilizó un kit de cuantificación con Ácido Bicinconiónico (BCA Protein Assay Reagent (bicinchoninic acid)) de Thermo SCIENTIFIC®. El fundamento de ésta técnica se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^{+} por las proteínas en medio alcalino, con la detección colorimétrica del catión cuproso por el ácido biconconiónico. Para la cuantificación, se siguieron las instrucciones del producto. Se preparó un estándar de albúmina, con concentraciones de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 25 y 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En una caja de 96 pozos, se colocaron 25 μL de cada estándar de albúmina por triplicado, así como 25 μL de cada muestra a cuantificar, igualmente por triplicado. Se utilizó como control el buffer de lisis. Se adicionó a cada pozo 200 μL el agente de trabajo BCA, el cual fue preparado según indicaciones del fabricante, con una relación de 50:1 del reactivo A y el B. Posterior a ello, se cubrió la caja y se colocó por 30 segundos en un agitador. Se colocó en incubación a 37°C por 1 hora. Al cabo de este tiempo, se dejó enfriar la muestra por 5 minutos y se realizó la medición de la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader de BioRad (Ref. 168 – 1130).

Para la construcción de la curva de absorbancia, se calculó el promedio de cada estándar, al cual se le restó el valor obtenido en los controles (blanco). En Microsoft Excel, se realizó la una regresión lineal, obteniendo un gráfico de dispersión y líneas de tendencia.

Figura 3-1: Curva de absorbancia de Albúmina sérica bovina.



Para la obtención de las concentraciones de las muestras a analizar, se utilizó la fórmula de la pendiente $y = mx + b$, donde y es la absorbancia obtenida de cada muestra, m es la pendiente la cual se obtiene del gráfico, x es la concentración obtenida, o sea el valor a despejar y b es el intercepto en y , valor que también es obtenido del gráfico.

3.6.3 Electroforesis en gel de Poliacrilamida y Sodio Dodecyl sulfato (SDS-PAGE)

Para el corrido electroforético, se utilizaron geles de poliacrilamida al 8%, con los reactivos para cada gel, como se indica a continuación:

Tabla 3-2: Reactivos para geles de poliacrilamida y Sodio Dodecyl Sulfato.

GEL	ddH2O mL	ACRILAMIDA AL 30% mL	BUFFER*	SDS 10% mL	Persulfato de amonio 10% µL	TEMED µL
Corrido (Resolving)	4.7	2.7	2.5	0.1	50	5
Carga (Stacking)	2.35	1.35	1.25	0.05	25	5

Se utilizó acrilamida-bis 40% MERK ®. Para el buffer de corrido que se utilizó Tris (SIGMA ®) 1.5M, con pH de pH de 8.8 y el de carga Tris (SIGMA ®) 0.5M con pH de 6.8 y SDS (SIGMA ®).

Como buffer de carga, se utilizó el buffer (laemmli) 4X, el cual fue almacenado en alícuotas de 1 mL a -20°C:

Tris 0.5 M, pH 6.8	375 mM
Glicerol	60%
SDS	6%
Azul Bromofenol 1%	0.5 mL
Betamercaptoetanol	2.5%

Se preparó un stock 10X para el buffer de corrido electroforético y fue almacenado a 4°C. Al momento de realizar la electroforesis, se preparó una solución de trabajo 1X, en agua destilada. El stock se preparó como se muestra a continuación:

Tris	30.3 gr
Glicina	144,0 gr
SDS	10 gr
ddH ₂ O	1 Litro

Para cada electroforesis, se utilizó una cámara de electroforesis vertical de BIO-RAD (Mini-PROTEAN® Tetra Cell BIO-RAD), con los vidrios para los geles y los soportes correspondientes.

Se sembraron 20 µg de muestra por cada pozo. Para la preparación de las muestras, inicialmente se realizó el cálculo de volumen de muestra a utilizar y el volumen de buffer de carga correspondiente. En tubos de microcentrífuga, se colocó la muestra y el buffer laemmli y se calentaron a 100°C por 5 minutos. Posterior a ello, se centrifugaron a 14000 revoluciones por minuto por 5 minutos y el sobrenadante fue colocado en el pozo correspondiente. Se utilizó el patrón de peso molecular de Thermo SIENTIFIC Page

Ruler™ Prestained Protein Ladder. Se utilizaron 5 μ L de patrón de peso por gel, como está indicado en las instrucciones del producto. El corrido electroforético se realizó a 100 V, hasta permitir que el buffer de carga saliera en su totalidad del gel y obtener el peso requerido, en la altura deseada. Tanto para la electroforesis como para la transferencia de proteínas se utilizó una fuente de poder marca *Lightning Volt™ PowerSupply*, modelo OSP-500. Posterior al corrido electroforético, se procedió a la transferencia de proteínas.

3.6.4 Transferencia de proteínas

Se realizó un electroblotting con transferencia húmeda, por su velocidad de transferencia y porque permite una transferencia completa del gel a la membrana (Kurien & Scofield 2006). Para ello, se utilizó una cámara de transferencia Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD). Se preparó un Stock 10X de buffer de transferencia para utilizar a una concentración final (1X) como se muestra a continuación:

Tris	15 mM
Glicina	120 mM
Metanol	20%

La solución de trabajo para preparar a partir de este buffer, se preparó previamente a cada transferencia.

Para este procedimiento se utilizaron membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de Amersham Hybond™ – P GE Healthcare, las cuales se eligieron por su alta capacidad de unión a proteínas, su resistencia y estabilidad química en relación con las membranas de nitrocelulosa (Kurien & Scofield 2006). Las membranas fueron cortadas con medidas de 6 x 8 cms para ajustar al gel de corrido. Para activar las membranas, se colocaron en metanol, según indicaciones del producto, posteriormente se sumergieron en agua destilada y finalmente se colocaron en buffer de transferencia por 2 minutos. Se procedió a colocar el gel dentro del cassette teniendo en cuenta que la energía corre de posterior hacia anterior en la cámara de transferencia, de modo que el gel debería estar colocado

por detrás de la membrana para que al ser eluidas las proteínas, quedasen adheridas a esta. Se realizó el montaje del cassette de transferencia colocando una lámina de fibra contra el cassette; sobre ésta se colocó un papel de filtro (GB003 Whatman®), previamente humedecido en buffer de transferencia. Sobre el papel filtro se colocó el gel, y sobre éste la membrana de PVDF, marcando la ubicación de la misma con respecto al gel. Finalmente, Sobre esta membrana se colocó otra hoja de papel de filtro y otra lámina de fibra. Se cerró el cassette y se colocó en la cámara de transferencia. Dentro de dicha cámara, se insertó una unidad enfriadora, para impedir el sobrecalentamiento del buffer y por consiguiente el daño del gel. La transferencia se realizó durante 2 horas, a 100 V.

Transcurrido este tiempo, se retiró la membrana del cassette y se colocó en bloqueo con leche descremada al 5% en TBS-T (ver adelante), para los anticuerpos policlonales (Anti NRF2) y en albúmina al 3% en TBS-T (ver adelante) para los anticuerpos monoclonales (Anti β Actina). El bloqueo de las membranas se realizó durante toda la noche (overnight).

3.6.5 Incubación con Anticuerpos Primarios

Luego del bloqueo, se realizaron 2 lavados rápidos con buffer TBS-T. Al igual que para los demás buffers, se preparó una solución stock 10X, para una concentración final en la solución de trabajo como se muestra:

Tris – HCl pH 7.4	0.5 M
NaCl	1.5 M
Monolaurato de Polietilensorbitan (Tween® 20 SIGMA-ALDRICH)	0.5%

Para NRF2, se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo, contra la región C-terminal de NRF2 de origen humano de Santa Cruz ® Biotechnology (Nrf2 C-20: sc-722). El fabricante sugiere una dilución de trabajo de 1:200 a 1:1000). Se realizaron ensayos de

estandarización con concentraciones de 1:200, 1:300, 1:500, con resultados satisfactorios para 1:500, por lo que se eligió esta dilución. El anticuerpo se preparó en leche descremada al 2.5% en TBS – T. Para β actina, se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón de SIGMA-ALDRICH® (Monoclonal Anti- β -Actin Clone AC-74) que reconoce un epítipo localizado en la región N-terminal de la isoforma β de la Actina. La dilución de uso fue de 1:1000, como se recomienda por el fabricante, preparada en albúmina al 1.5% en TBS –T.

Se incubaron las membranas con el anticuerpo primario durante una hora, posterior a lo cual se realizaron 2 lavados rápidos con el buffer de lavado, seguido de un lavado por 15 minutos y 3 lavados más de 5 minutos cada uno, siguiendo las recomendaciones del fabricante de las membranas. La incubación con el anticuerpo secundario se realizó durante una hora. Se utilizaron anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), para ser revelados por el método de electroquimoluminiscencia. El anticuerpo anti-conejo utilizado fue un anticuerpo producido en cabra contra la molécula completa de IgG de conejo (Anti-Rabbit IgG Whole Molecule Peroxidase conjugate SIGMA®), y se utilizó a una dilución de 1:2500 en TBS –T. El anticuerpo anti-ratón utilizado, fue un anticuerpo producido en cabra y al igual que el anti-conejo, es contra la molécula completa de IgG y está conjugado con peroxidasa (Anti-Mouse IgG Whole Molecule Peroxidase Conjugate SIGMA®). Se utilizó una dilución de 1:5000 también en TBS – T.

Al finalizar el tiempo de incubación, se realizaron los lavados del mismo modo que para el anticuerpo primario. Luego, las membranas se colocaron en TBS – T y se procedió al revelado.

Para el revelado, se utilizó el método de electroquimoluminiscencia, con el reactivo ECL Plus Western Blotting Detection System de GE Healthcare Amersham™. En éste método, se utiliza luminol el cual es oxidado por la HRP, quedando en estado excitado, emitiendo luz, la cual se visualiza al exponer la membrana a una película de revelado. Con éste método, se pueden detectar cantidades incluso inferiores a 1 pg de proteína (Kurien & Scofield 2006). En el cuarto oscuro, se preparó la mezcla del reactivo, según las instrucciones del producto, en una proporción de 1:40 del reactivo A y el B y se atemperaron. Las membranas fueron secadas con un papel de filtro y sumergidas en el

reactivo ECL ya preparado, durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo, nuevamente se secaron con papel filtro y fueron colocadas en el cassette de revelado (Hypercassette™ Amersham Biosciences). Allí, sobre la membrana, se colocó la película de revelado para quimioluminiscencia (Amersham Hyperfilm™ GE Healthcare), teniendo en cuenta la orientación respecto a la membrana. Las películas fueron expuestas durante 1, 3, 5, 7, 10 y 15 minutos. Posterior a ello, se sumergieron en la solución de revelado RX-M (RX-M Revelador manual para RX AJOVECO S.A), hasta que se observaron marcas en la película. Luego, se lavaron con agua y se colocaron en la solución fijadora FX-M (FX-M Fijador manual para RX AJOVECO S.A) durante 30 segundos. Se lavaron y se marcaron y luego fueron escaneadas para su análisis.

Se hizo un análisis densitométrico de las películas utilizando el programa Image J®.

3.7 Inmunocitoquímica

Se utilizó este procedimiento para evaluar la translocación nuclear de proteínas asociadas al estrés y la hipoxia - reoxigenación en las condiciones estresantes a las que se sometieron los cultivos.

Para estos ensayos, las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 24 pozos, sobre cubreobjetos (coverslips Fisher Scientific, Ref. 12-545-82) con superficie adherente para cultivo celular, previamente expuestas a luz ultravioleta durante una hora. En cada pozo, se sembraron 30000 células para los cultivos individuales. En el caso de los cocultivos, se sembraron 25000 células endoteliales y 5000 células tumorales, siguiendo el protocolo descrito para los demás procedimientos. 24 horas después a ser sembradas, las células fueron sometidas a las condiciones de normoxia o hipoxia-reoxigenación, según el ensayo a realizar y 24 horas después se sometieron a irradiación, en los casos en que correspondía. Posterior a ello, se procedió a retirar el medio de cultivo de cada pozo. Se realizó un lavado con PBS 1X frío y se colocó en cada un volumen de 0.5 mL de formaldehído al 4% en PBS, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posterior a ello, se realizaron 3 lavados con PBS 1X, de 5 minutos cada uno, en plataforma balanceante. Luego, se permeabilizaron las células con Tritón 0,1% (Triton™ X100 SIGMA®) por 5 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos

cada uno, en plataforma balanceante. Posteriormente, se colocó en cada pozo 0.5 mL de cloruro de amonio (NH_4Cl) 50 mM fresco, para disminuir la autofluorescencia de los grupos aldehído del formaldehído, durante 15 minutos, tras lo cual nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS en plataforma balanceante. Se procedió al bloqueo de las células, con albúmina al 1% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego del bloqueo, se realizó la incubación con el anticuerpo primario. Para HIF 1α , se utilizó un anticuerpo policlonal producido en conejo, de Cell Signaling TECHNOLOGY®, contra la región que rodea el residuo de la serina 653. Se utilizó una concentración de 1:50, preparado en albúmina al 1%. Para NRF2 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo, contra la región C-terminal de NRF2 de origen humano de Santa Cruz® Biotechnology (Nrf2 C-20: sc-722), a la misma concentración que para HIF1 α . En una superficie cubierta con parafilm®, se colocó una gota de 50 μL con el anticuerpo correspondiente, sobre la cual se colocaron los cubreobjetos de modo que la superficie sobre la que estaban adheridas las células, quedara en contacto con el anticuerpo. Se dejó en incubación toda la noche a 4°C. Cumplido este tiempo, los cubreobjetos fueron retornados a los pozos de cultivo y allí, se realizaron 6 lavados con PBS, de 5 minutos cada uno, en plataforma balanceante. Al finalizar los lavados, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario. Se utilizaron anticuerpos de Life technologies™ Invitrogen Alexa Fluor® producidos en cabra, Anti-conejo. Verde para HIF1 α (Alexa fluor 488) y rojo para NRF2 (Alexa fluor 568). Se hicieron diluciones de 1:1000 en albúmina al 1%, protegidos de la luz y se colocó una gota de 50 μL en la superficie cubierta de parafilm, como ya se describió. Del mismo modo que para el anticuerpo primario, se retiraron los cubreobjetos de los pozos de la caja de cultivo y se colocaron en incubación por 2 horas a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Posterior a esto, se colocaron nuevamente dentro de los pozos los cubreobjetos y se realizaron 6 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Finalmente, se tiñeron los núcleos celulares con Hoechst 33342. Se colocaron 0.5 mL de una solución 1:10000 del stock de 1.2 mg/ml (2mM) de Hoechst 33342 trihidroclorhidro trihidratado (Life Technologies™ Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente, cubierto de la luz. Luego se realizaron 6 lavados con PBS y se procedió al montaje. Para ello, los cubreobjetos fueron retirados de los pozos de cultivo y secados con papel absorbente. Luego fueron montados en un porta objetos, al cual se le aplicó una gota de Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium, un medio de montaje compatible con los fluorocromos utilizados. Sobre la gota se colocó la laminilla, con la

superficie sobre la que estaban las células adheridas en contacto con el medio de montaje. Se esperó a que seicara una hora y se almacenó a 4°C para su posterior visualización y fotodocumentación. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Zeiss AXIO Observer A1 (Zeiss) equipado con una lámpara de fluorescencia HBO100 VE y una cámara monocromática adaptada a este (AXIOcam HRm Carl Zeiss microimaging 6 GMBH), configurada con el programa Axio Vision Release 4,8,2 (06-2010). Las fotos fueron tomadas permitiendo la autoconfiguración de la cámara, con un tiempo de exposición determinado por esta. Se tomaron 3 fotos por cada pozo, con un objetivo de 40X. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas para su posterior análisis, con ayuda del programa ImageJ®. Estos instrumentos fueron facilitados por el Centro Internacional de Física (CIF) de la Universidad Nacional de Colombia.

Para el análisis de las imágenes, con ayuda del programa Image J® se realizó un conteo celular, contando los núcleos de las células tomadas con el filtro para Hoechst, con la herramienta *Cell counter* de este programa. Luego, se procedió a verificar el número de células con mayor fluorescencia en el núcleo que en el citoplasma y se estableció la relación de células con la proteína translocada (fórmula 3-8).

Fórmula 3-8: Porcentaje de translocación nuclear de NRF2 y HIF1 α

$$\% \text{ traslocación de la proteína} = \frac{\# \text{ células con fluor. Núcleo}}{\# \text{ total de células}}$$

3.8 Análisis estadístico

Todos Los ensayos fueron realizados por triplicado. Los datos son entregados como promedios con desviación estándar.

La significancia estadística de los datos fue determinada usando un análisis de T de student y los valores de p inferiores a 0.050 fueron considerados significativos. Para ello se empleó el programa IBM SPSS Statistics 21.

4. Resultados y discusión

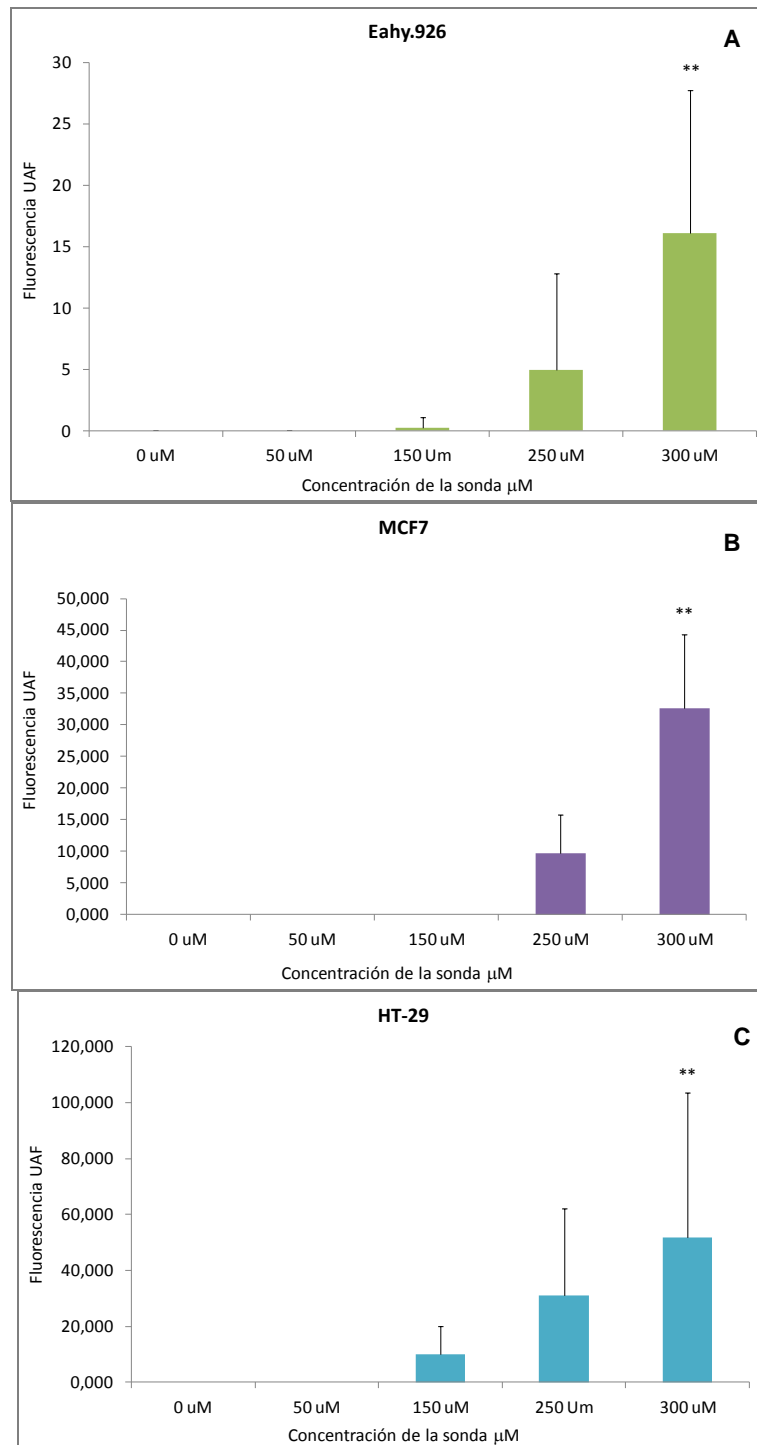
4.1 Curvas de calibración de glucosa

Para confirmar que la fluorescencia medida en las células fuese proporcional a la captación de la sonda 2-NBDG, se utilizaron concentraciones de la sonda en aumento desde 0 hasta 300 micromolar, en intervalos de 50 a 100 micromolar. Con concentraciones bajas de sonda de glucosa (0 – 150 μM), la fluorescencia de las células fue menor que con la fluorescencia de las células cultivadas con concentraciones más altas de ésta (300 μM), demostrando que la captación es directamente proporcional a la cantidad de sonda presente en el medio (Figura 4-1 A, B y C), para cada una de las líneas celulares estudiadas. Ello confirma que los cambios en la fluorescencia son debidos a variaciones en el ingreso de la 2-NBDG a la célula, como se ha demostrado en otros estudios (Hassanein et al. 2011). Se eligió la concentración de 300 micromolar para la totalidad de los experimentos a realizar, como también se ha descrito previamente (O'Neil, Wu, & Mullani, 2005)(Hassanein et al., 2011).

4.2 Confirmación de las condiciones de hipoxia

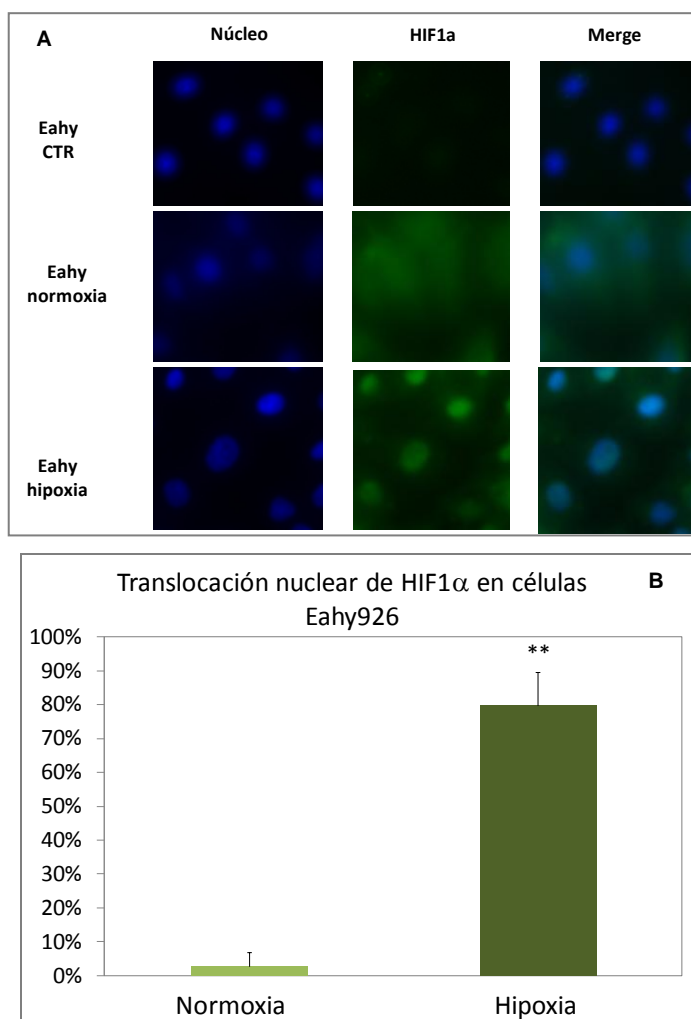
Para confirmar que las células estuviesen siendo realmente cultivadas en condiciones de hipoxia, se evaluó la translocación nuclear del factor de transcripción HIF1 α en las células endoteliales sometidas a esta condición, comparada con la translocación del mismo factor en condiciones de normoxia. Se observó una localización preferencialmente citoplasmática para HIF1 α en condiciones de normoxia (Figura 4-2a), encontrándose que sólo el 3% de las células EAhy926 en normoxia presentaban una translocación

Figura 4-1: Variación de la fluorescencia según la captación de glucosa. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia. **: $p < 0.001$. A. Células EAhy926, B. Células MCF7, D. Células HT29.



nuclear de esta proteína (Figura 4-2b). En condiciones de hipoxia, la localización del factor HIF1 α fue preferencialmente nuclear (Figura 4-2a), con un 80% de células que presentaron una translocación de la proteína al núcleo en estas condiciones (Figura 4-2 b). Esto confirmó que los cultivos celulares estaban siendo sometidos a bajas concentraciones de oxígeno.

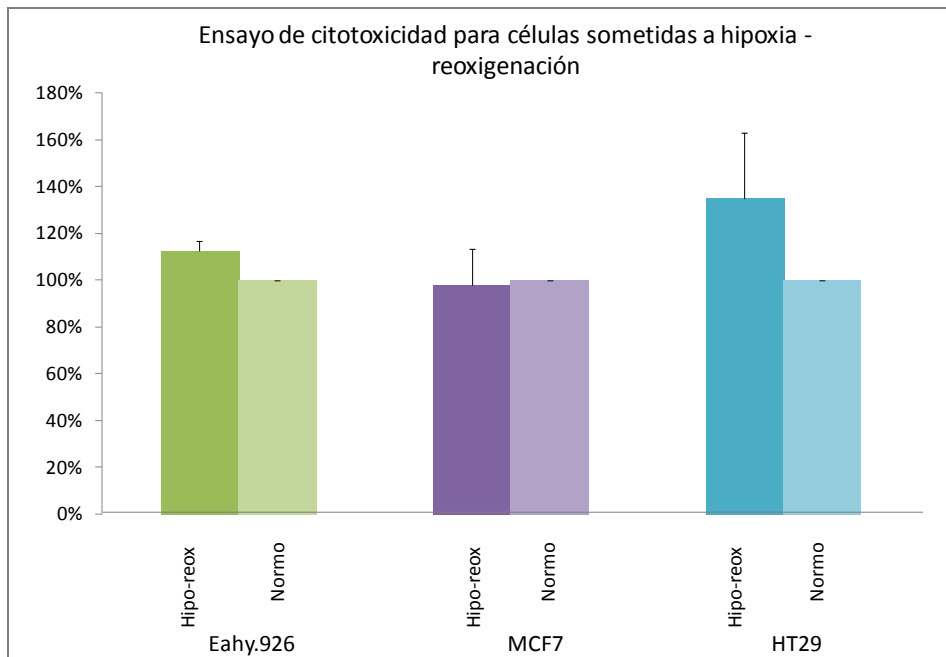
Figura 4-2: Confirmación de las condiciones de hipoxia. A. Translocación nuclear de la proteína por Inmunocitoquímica. B. Translocación nuclear de HIF1 α en normoxia e hipoxia. **: p = 0.000.



4.3 Ensayo de citotoxicidad por MTT

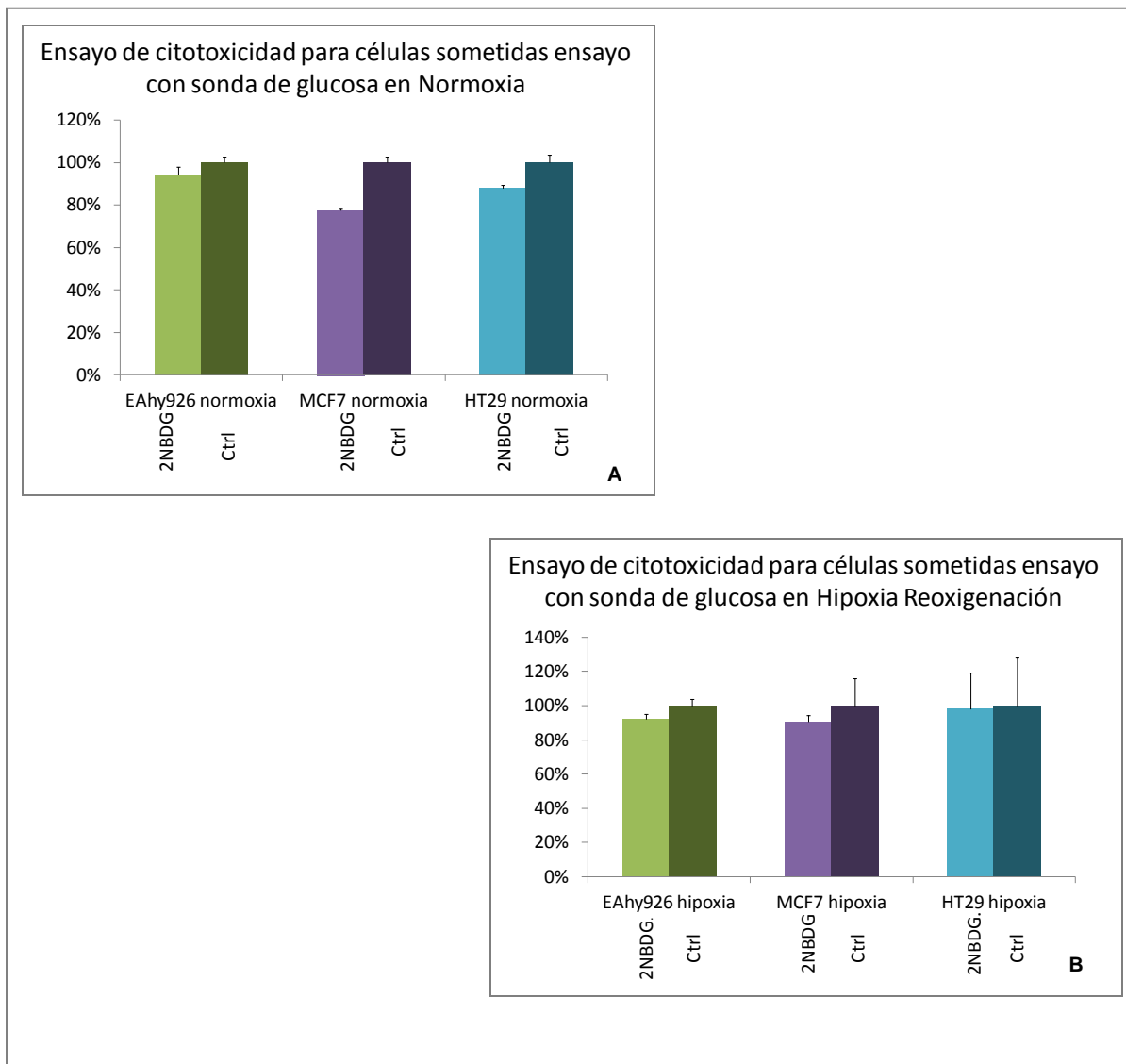
Con el fin de determinar el efecto de las bajas concentraciones de oxígeno en la viabilidad celular, se realizó el ensayo de citotoxicidad por MTT de las células sometidas a hipoxia-reoxigenación. No se encontraron diferencias significativas al someter las células a condiciones de hipoxia-reoxigenación, en comparación con normoxia ($p:0.433$ para EAhy926, 0.356 para MCF7 y 0.606 para HT29) como se muestra en la figura 4-3.

Figura 4-3: Ensayo de citotoxicidad por MTT para células EAhy 926, MCF7 y HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación.



Así mismo, se quiso evaluar el efecto en la viabilidad celular de las células sometidas al ensayo de la sonda de glucosa, tanto en condiciones de normoxia, como en condiciones de hipoxia-reoxigenación. Para estos ensayos, tampoco se encontraron diferencias significativas en la viabilidad celular, para ninguna línea (Figura 4-4).

Figura 4-4: Ensayo de citotoxicidad por MTT para células sometidas a ensayos con la sonda de glucosa. A. En normoxia. B. en hipoxia-reoxigenación.



4.4 Curvas de supervivencia celular

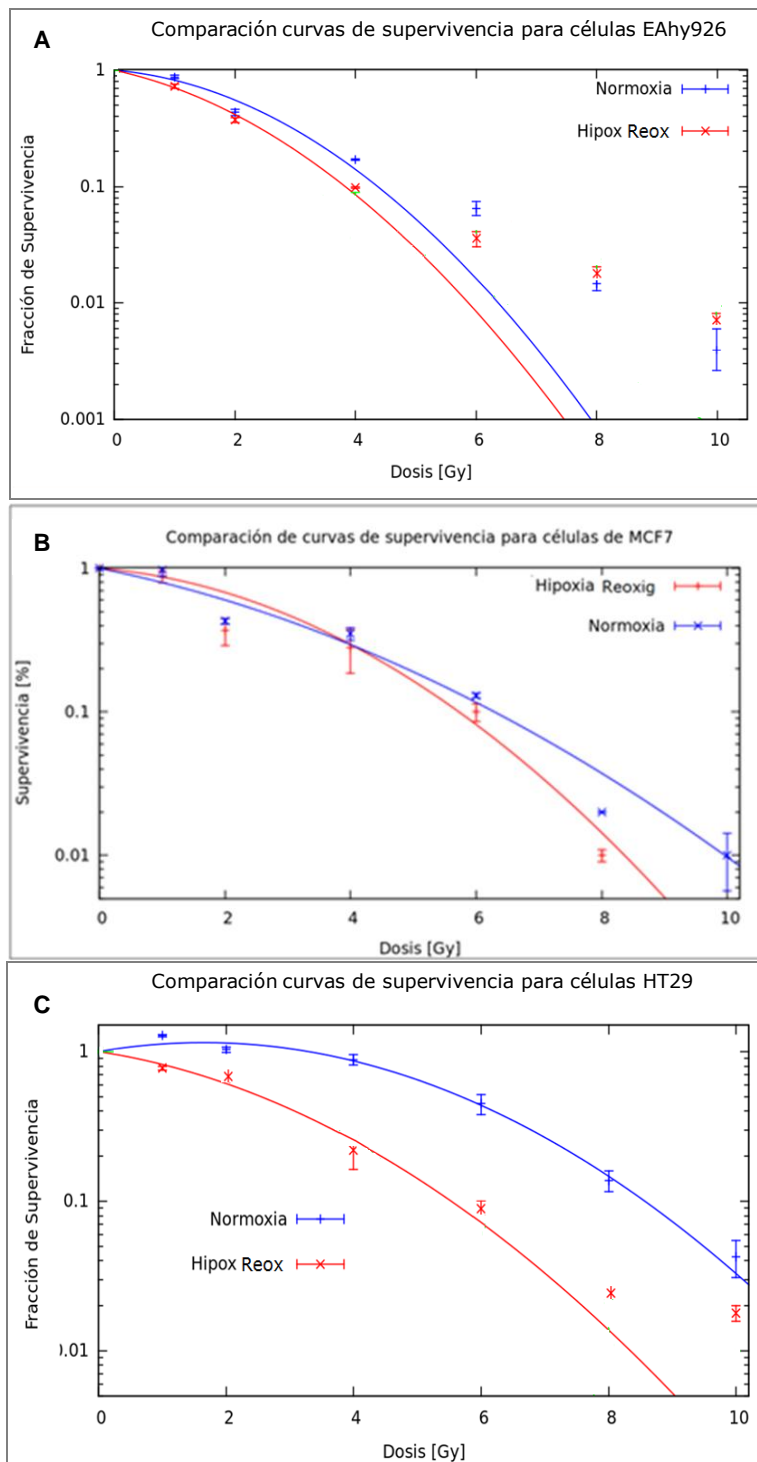
Para evaluar los efectos de las radiaciones ionizantes en la capacidad proliferativa de las células sometidas a condiciones de normoxia e hipoxia-reoxigenación, se realizaron curvas de supervivencia celular.

Para la línea celular epitelial (EA.hy926) y las dos líneas tumorales (MCF7 y HT29), se observó que las células sometidas a hipoxia y reoxigenación presentaron una menor supervivencia, es decir mayor radiosensibilidad, que aquellas células cultivadas sólo en normoxia (Figura 4-5 A, B y C). Esto difiere de lo reportado en la literatura para las condiciones de hipoxia, en las que se ha demostrado una mayor supervivencia de las células sometidas a estas condiciones debido a los efectos indirectos de la radiación con altas concentraciones de oxígeno (Vogin, 2011) (Hall D.Phil, Eric J. Giaccia, 2006) (Arvold et al., 2005) (Pawlik & Keyomarsi, 2004).

Esta diferencia en la supervivencia entre las células sometidas a hipoxia y las células sometidas a hipoxia-reoxigenación podría explicarse porque, posterior a la hipoxia-reoxigenación, la concentración de especies reactivas de oxígeno aumenta (Kim, Choi, Kim, Woo, & Chung, 2007). Adicionalmente, en algunas líneas celulares se ha demostrado que la hipoxia – reoxigenación produce un efecto tóxico en la célula no sólo por el aumento de las especies reactivas de oxígeno, sino también daños en el DNA, detención del ciclo celular por activación de p53 y apoptosis (Kim et al., 2007). Estos fenómenos asociados a las radiaciones ionizantes explicarían como hay una mayor supervivencia en las células cultivadas en normoxia y sometidas a este estresor.

Por otro lado, se ha descrito un fenómeno conocido como Hiperradiosensibilidad (HRS), el cual hace referencia a una falla en la inducción de los puntos de chequeo en G2 de manera temprana (0-2 horas post irradiación), como a término medio (12 horas post irradiación) deteniendo a la célula en esta fase e impidiendo su paso a mitosis, favoreciendo la radiosensibilidad a dosis bajas (0.5 – 1Gy)(Edin, Olsen, Sandvik, Malinen, & Pettersen, 2012). Este efecto se potenciaría con los fenómenos de toxicidad generados por la hipoxia-reoxigenación explicando lo observado en las curvas de supervivencia.

Figura 4-5: Curvas de supervivencia a la radiación. Normoxia vs Hipoxia-reoxigenación.
A. Células EAhy926. B. Células MCF7. C. Células HT29



4.5 Captación de glucosa en respuesta al estrés celular

Para evaluar el efecto de la hipoxia-reoxigenación y las radiaciones ionizantes en el metabolismo tumoral, se midió la captación de la sonda de glucosa 2-NBDG en las células endoteliales y tumorales.

Para las células endoteliales (Figura 4-6), se encontró que hay una disminución no significativa en la captación de la sonda de glucosa en condiciones de hipoxia-reoxigenación respecto a las condiciones de normoxia. Las células sometidas a irradiación, mostraron una disminución significativa en la captación de la sonda frente a las células no sometidas a este estresor, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia-reoxigenación ($p: 0,036$ y $P: 0,025$ respectivamente). En esta última condición se encontró la menor captación de sonda de glucosa. Este efecto es contrario a lo esperado para una célula sometida a bajas concentraciones de oxígeno pues, como ya se mencionó, una célula (tumoral o no), en condiciones de baja oxigenación requiere un aumento en el consumo de glucosa, para lograr un adecuado aporte de energía. Este fenómeno es conocido como el efecto Pasteur (Gatenby & Gillies, 2004) (Busk et al., 2008). Además, se ha demostrado que las bajas concentraciones de oxígeno favorecen la activación del factor de transcripción HIF1, el cual regula de forma positiva la expresión de genes glucolíticos, entre ellos los que codifican para los transportadores de glucosa GLUT (Nakajima & Van Houten, 2012)(Gatenby & Gillies, 2004).

En el caso de las células tumorales de seno (MCF7), de forma muy llamativa la captación de glucosa fue homogénea para todas las condiciones. No se evidenciaron cambios significativos al ser sometidas a los diferentes estresores (Figura 4-7). Esto también es diferente a lo esperado para células sometidas a condiciones de hipoxia como se explicó.

Para la línea tumoral de colon HT29 (Figura 4-8), al igual que para las otras dos líneas (endotelial y de seno) no hubo variaciones significativas en la captación de la sonda de glucosa al ser sometidas a hipoxia-reoxigenación, en comparación con las células cultivadas en normoxia.

Figura 4-6: Captación de sonda de glucosa en células EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes. *: $p < 0.050$.

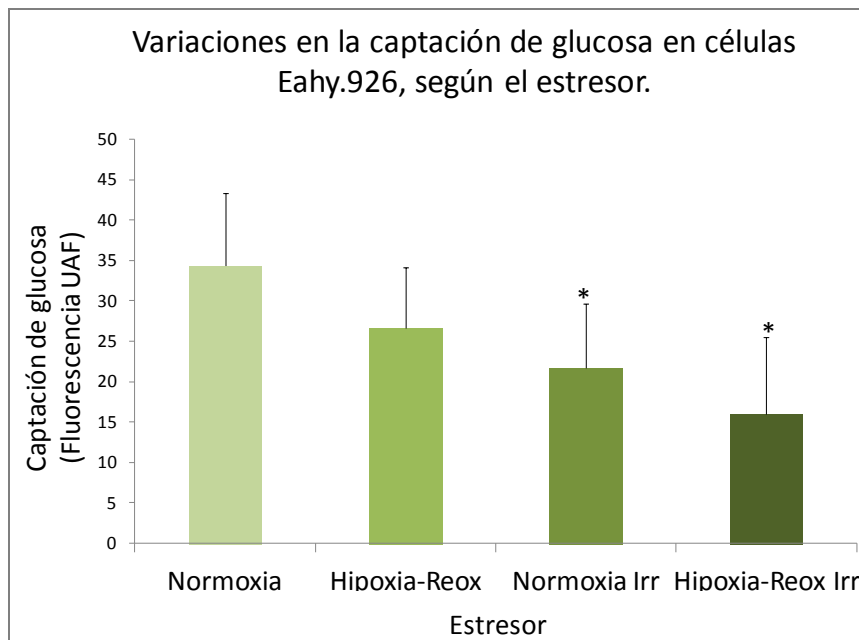
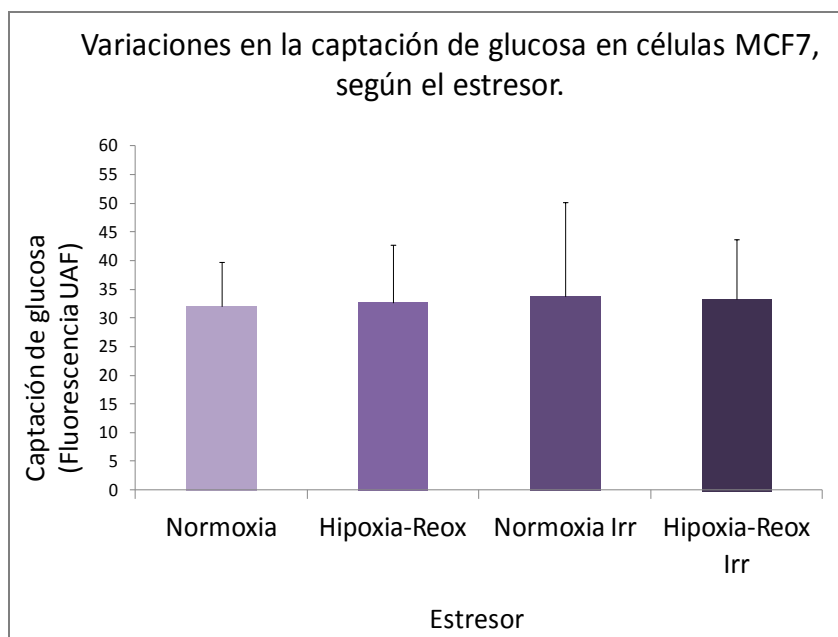
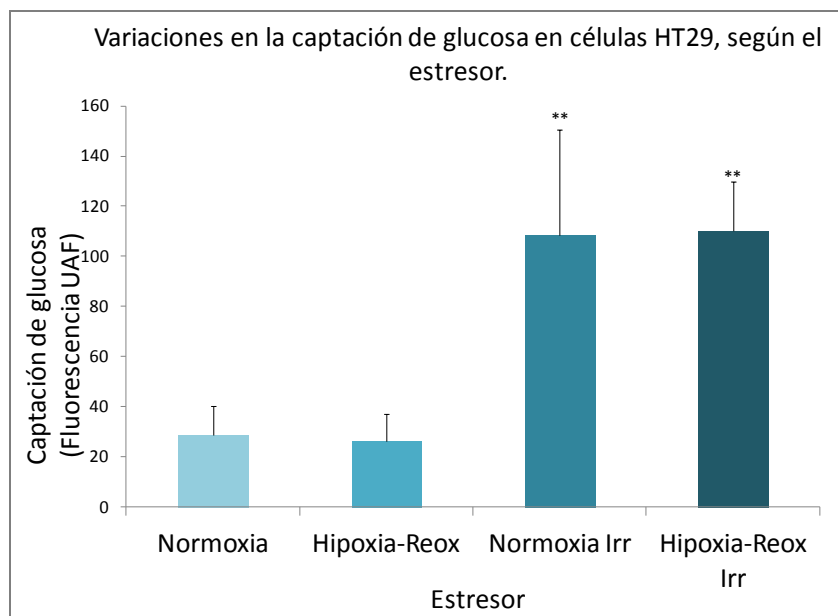


Figura 4-7: Captación de sonda de glucosa en células MCF7 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.



Sin embargo, a diferencia de lo observado para las líneas anteriormente mencionadas, bajo condiciones de radiación en normoxia y en hipoxia-reoxigenación, hay un incremento significativo (p : 0,002 y 0,000 respectivamente) en la captación de 2NBDG. Esto sugeriría que para esta línea celular, el sometimiento a las radiaciones ionizantes activa mecanismos que modifican el metabolismo tumoral manifestado como incremento el consumo de glucosa. Estudios han demostrado que las radiaciones ionizantes generan un fenómeno de reoxigenación que favorece la activación de HIF1, lo cual explicaría el incremento en la captación de glucosa para esta línea celular en condiciones de irradiación (B. J. Moeller et al. 2004)(Dewhirst et al. 2007)(Dewhirst et al. 2008).

Figura 4-8: Captación de sonda de glucosa en células HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes. **: $p < 0.010$.



Se ha demostrado que al someter las células a condiciones de hipoxia cíclica, en la que son expuestas a varios ciclos de hipoxia y reoxigenación, la expresión de HIF1a es más robusta que en comparación con aquellas sometidas solamente a hipoxia (Dewhirst 2009). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la expresión de HIF1 α es menor en las células sometidas a hipoxia-reoxigenación, que en aquellas cultivadas en

normoxia (Park et al. 2010). Esta observación explicaría el no haber encontrado diferencias significativas en la captación de 2-NBDG en las tres líneas celulares en condiciones de hipoxia-reoxigenación en comparación con normoxia.

4.6 Modificación de la captación de glucosa en respuesta al estrés celular en células en cocultivo

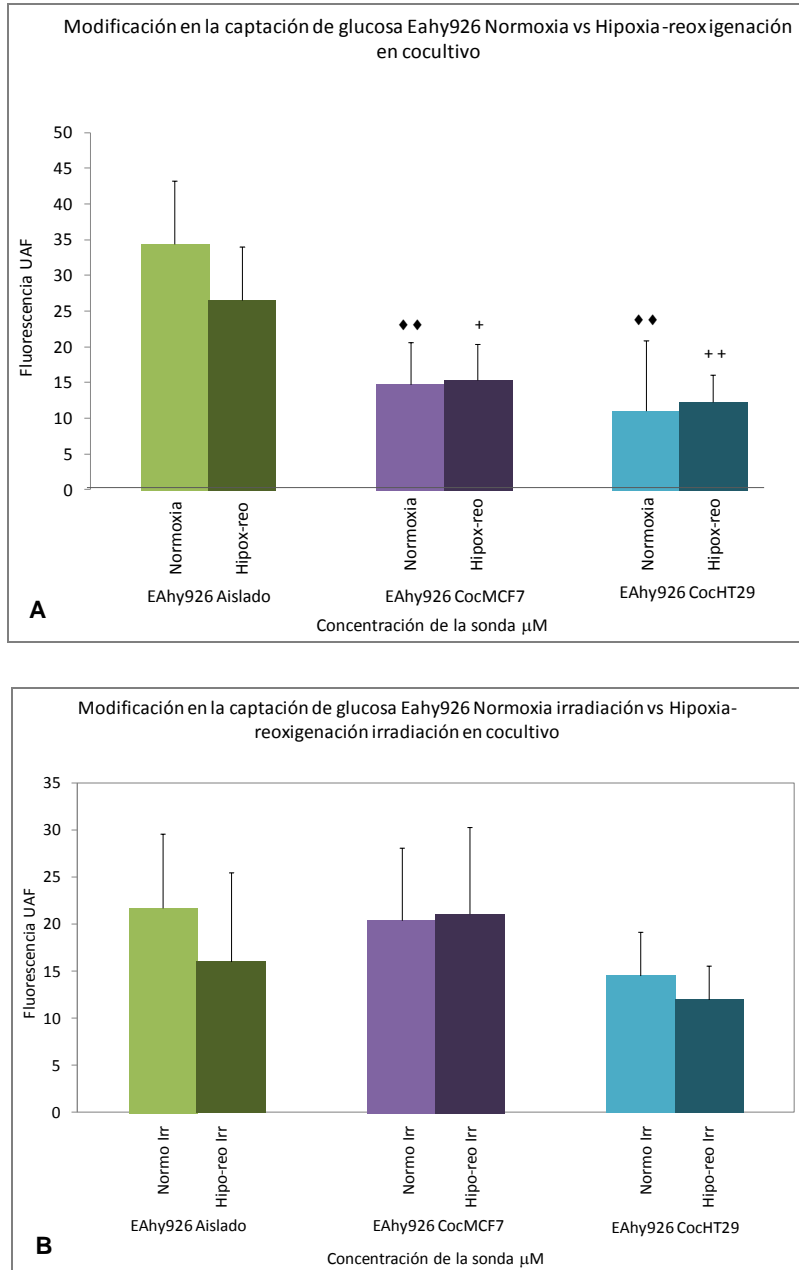
El entendimiento del metabolismo de la célula tumoral es de gran importancia, ya que no solo permite conocer el funcionamiento de la célula como tal, sino también porque favorece el diseño de estrategias para control y tratamiento del cáncer. En la actualidad el estudio de los microambientes tumorales ha cobrado gran importancia ya que los cambios en dicho compartimiento influyen directamente en el desarrollo y la progresión del cáncer.

Por la rápida proliferación celular y el requerimiento de nutrientes, el tejido endotelial juega un papel fundamental en el desarrollo y mantenimiento del tumor. El HIF1 α , regula al VEGF favoreciendo la angiogénesis en el tumor (Bertout, Patel, & Simon, 2008) (Semenza, 2003).

Para lograr un acercamiento al tejido tumoral y teniendo en cuenta la importancia de la célula endotelial, se realizaron cocultivos de las células endoteliales con las células tumorales, tanto de seno como de colon y se observaron los cambios en la captación de glucosa al someterlas a los mismos estresores.

Para las células endoteliales se observó una disminución significativa de la sonda de glucosa captada en condiciones de normoxia (p: 0,002) e hipoxia-reoxigenación (p:0,013) cuando las células endoteliales se cultivaron con células tumorales de seno MCF7, en comparación con las células en cultivo aislado (Figura 4-9 A). Así mismo, al sembrarse en cocultivo con células tumorales HT29, se presentó una disminución en la captación de sonda por las células endoteliales, tanto en normoxia (p: 0,000) como en hipoxia-reoxigenación (p: 0,003), en comparación con el cultivo aislado de la línea endotelial (Figura 4-9 A).

Figura 4-9: Captación de sonda de glucosa en células EAhy926 en cocultivo con células tumorales. A. Sometidas a hipoxia-reoxigenación. B. Sometidas a radiaciones ionizantes. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia. ♦♦: $p < 0.050$ en normoxia aislado como control. +: $p < 0.050$ en hipoxia-reoxigenación aislada como control. ++: $p < 0.010$ en hipoxia-reoxigenación aislada como control.



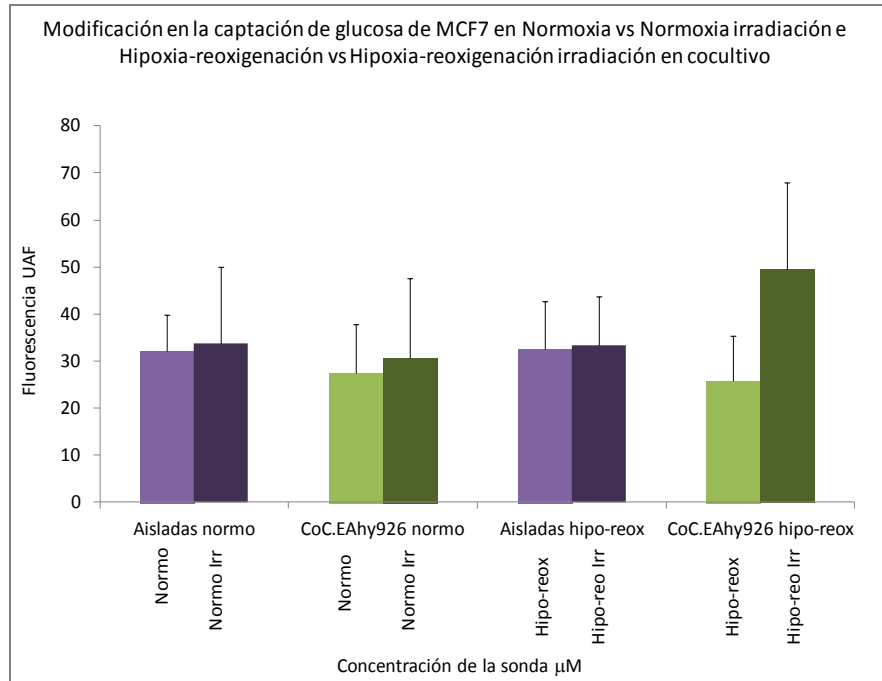
Al ser sometidas a radiaciones ionizantes, las células endoteliales en cocultivo con MCF7 y con HT29, no muestran diferencias significativas en la captación de sonda de glucosa si se comparan las células en cultivo aislado (Figura 4-9 B). Al hacer una comparación interna del cocultivo, tanto con MCF7 como con HT29, en normoxia comparado con hipoxia-reoxigenación y sometidas a radiaciones ionizantes, no se observan cambios significativos en la captación de 2NBDG. Es llamativo que, como se mencionó anteriormente, las células endoteliales en cultivo aislado, sí presentan modificaciones en la captación de glucosa al ser irradiadas, fenómeno que no se observa cuando se someten a cocultivo con las líneas tumorales.

Se puede observar como al ser cocultivadas con células tumorales, las células endoteliales modifican su metabolismo, evidenciando una disminución en la captación de glucosa en las células no irradiadas. Esto podría ser generado por señales emitidas por la célula tumoral, induciendo un cambio del metabolismo en la célula endotelial que permitiría una mayor disponibilidad de glucosa para la célula tumoral, al menos en las condiciones mencionadas.

Al observar las células tumorales de seno (MCF7) cocultivadas con células endoteliales, el comportamiento en la captación de la sonda de glucosa no mostró diferencias significativas para ninguna de las condiciones en comparación con las células en cultivo aislado (Figura 4-10). Haciendo una comparación interna del cocultivo, al igual que en el cultivo aislado, la captación de glucosa en las células MCF7 fue homogénea, a pesar del sometimiento a los diferentes estresores. Es de resaltar que en el cocultivo de células endoteliales con esta línea tumoral, las células endoteliales sí presentaron una modificación en la captación de glucosa en normoxia y en hipoxia-reoxigenación, como se mencionó anteriormente. Dicha modificación no afecta el comportamiento de la célula tumoral presente en el cocultivo.

En el caso de las células tumorales de colon HT29 cocultivadas con células endoteliales no se encontraron diferencias significativas en la captación de 2NBDG en comparación con el cultivo aislado.

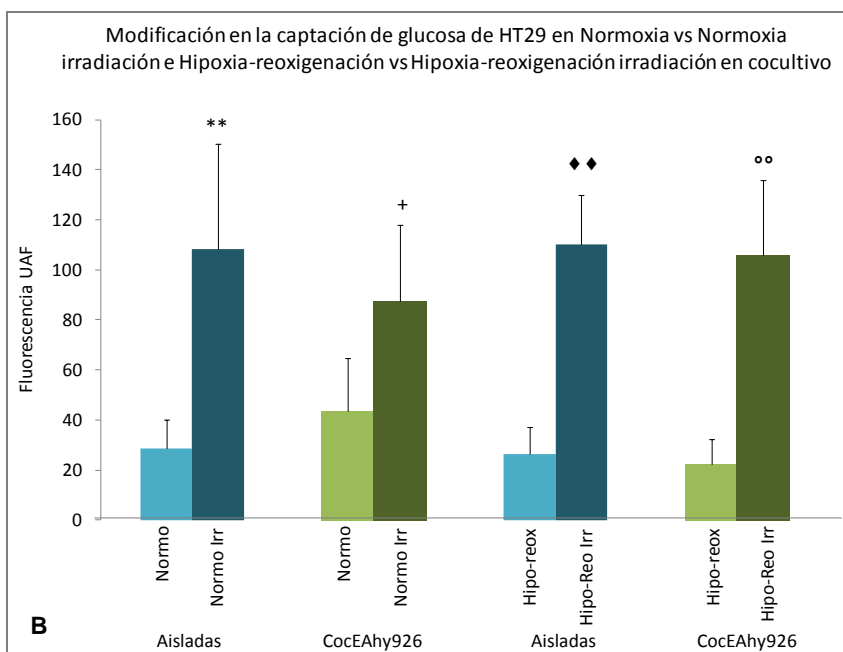
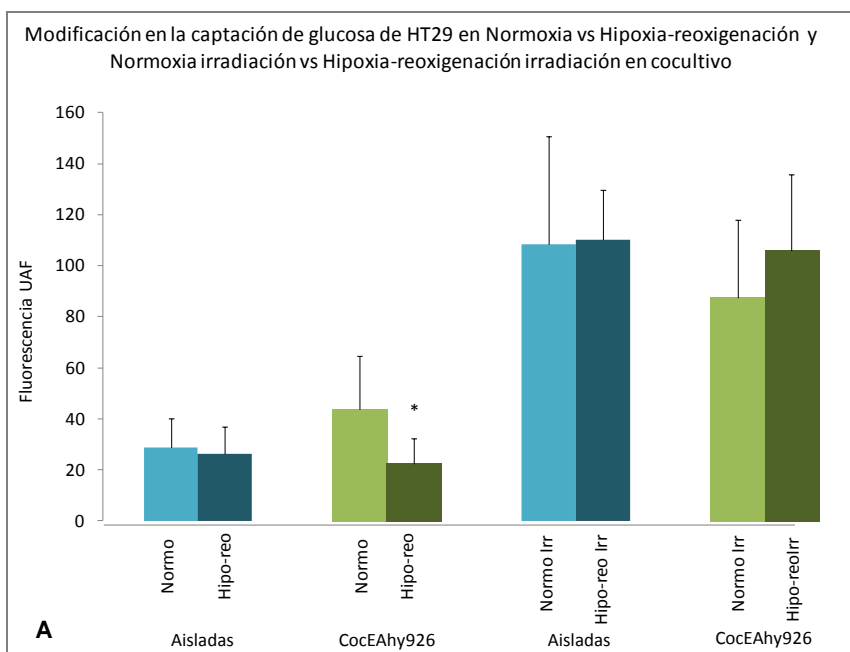
Figura 4-10: Captación de sonda de glucosa en células MCF7 en cocultivo con células EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia.



A diferencia de lo observado para el cultivo individual, hay una disminución significativa ($p: 0.041$) en la captación de glucosa de las células sometidas a hipoxia-reoxigenación en comparación con las células en normoxia dentro del cocultivo (Figura 4-11 A). Así como se observó para el cultivo aislado, dentro del cocultivo hubo un incremento significativo de la captación de la sonda de glucosa de las células sometidas a radiaciones ionizantes, (Figura 4-11B).

Si bien sí hay un incremento de la captación de la sonda en las células tumorales de colon sometidas a radiaciones ionizantes, tanto en normoxia, como en hipoxia-reoxigenación, este comportamiento no se ve modificado por la presencia de las células endoteliales en el cultivo. Es decir, que el metabolismo de la célula tumoral, al menos en este caso, no se afecta por la presencia de células endoteliales.

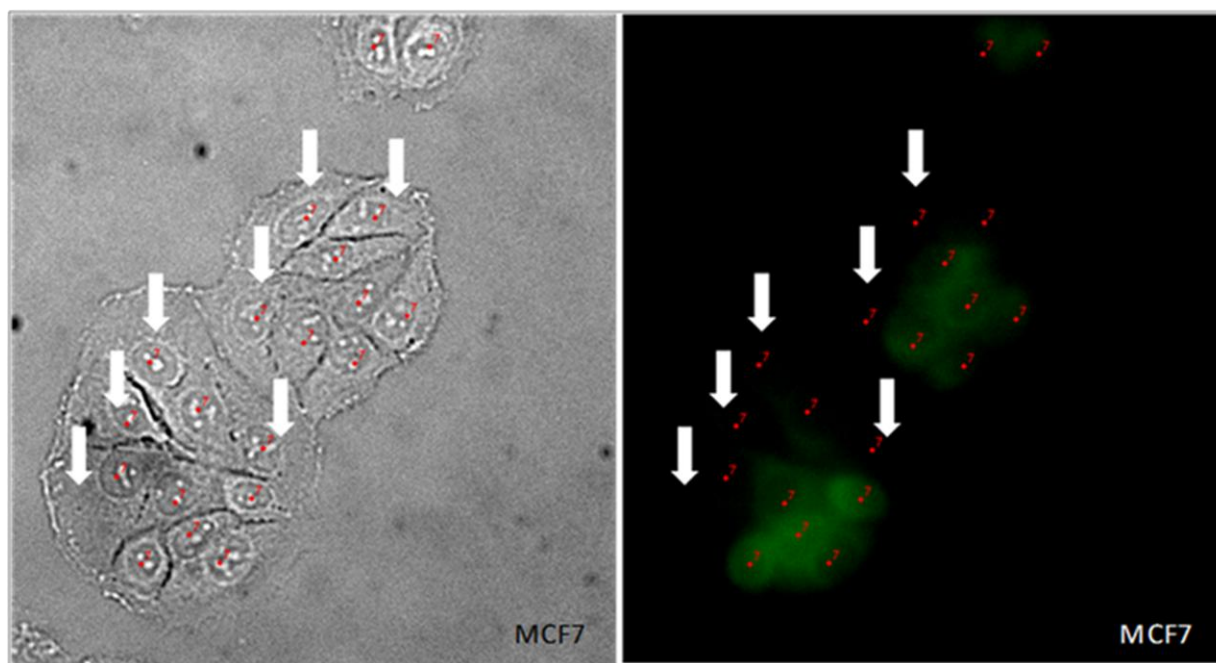
Figura 4-11: Captación de sonda de glucosa en células HT29 en cocultivo con células EAhy926. A. Comparación normoxia e hipoxia-reoxigenación. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia. *: $p < 0.050$ normoxia cocultivo como control. B. Comparación no irradiadas e irradiadas. **: $p < 0.010$ normoxia aislada como control. +: $p < 0.050$ normoxia cocultivo como control. ♦♦: $p < 0.010$ hipoxia-reoxigenación aislado como control. °°: $p < 0.010$ hipoxia-reoxigenación cocultivo como control.



4.7 Poblaciones celulares como respuesta adaptativa a condiciones de estrés

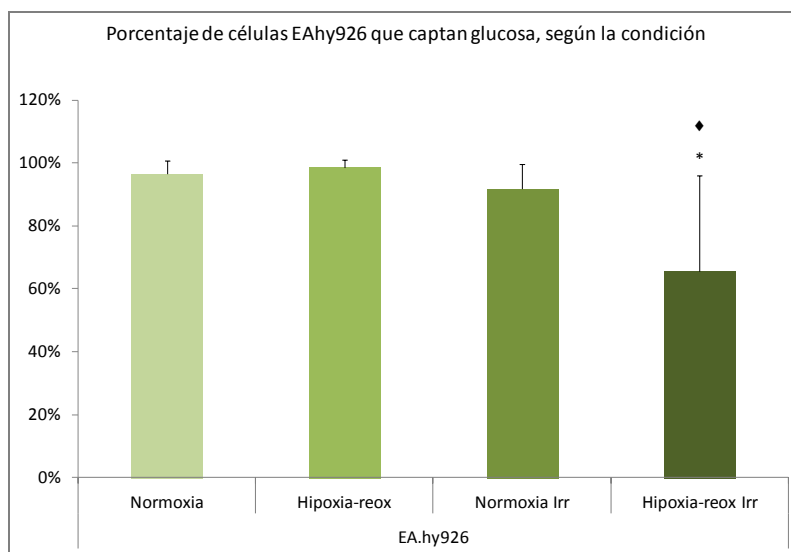
Al momento de hacer el análisis de las imágenes para evaluar la captación de glucosa, se observó que no todas las células captaban glucosa. Es decir, que el número de células que se contaban en campo claro, era diferente a las visualizadas en fluorescencia (Figura 4-12). Por ello, se decidió estimar el porcentaje de células que captaban glucosa en cada campo, por cada línea celular y analizar si existía una variación en el número de células que captaban la sonda de glucosa, al someterlas a las condiciones de estrés analizadas.

Figura 4-12: Conteo celular en cultivo de células MCF7. Izquierda: campo claro. Derecha: Fluorescencia.



En las células endoteliales, se encontró que el porcentaje de células que captaban glucosa no varió de forma significativa entre una y otra condición de estrés, excepto por las células sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes. En este caso se observó una disminución significativa en el porcentaje de células que captaban la sonda, tanto al compararlas con hipoxia-reoxigenación ($p: 0.012$), como con normoxia irradiación ($p: 0.034$).

Figura 4-13: Porcentaje de células que captan glucosa en el cultivo de EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes. *: $p < 0.050$ hipoxia-reoxigenación como control. **: $p < 0.050$ normoxia irradiación como control.



Por otro lado, en las células tumorales de seno no se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células que captaban la sonda en todas las condiciones (Figura 4-14). Este mismo comportamiento homogéneo se observó en la captación de sonda de glucosa en todas las condiciones de estrés a las que fueron sometidas las células MCF7 (Figura 4-7).

Las células HT29 mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células que captaron la sonda en condiciones de normoxia irradiación ($p: 0.016$) e hipoxia irradiación ($p: 0.012$), comportamiento que sigue el patrón observado en cuanto a la captación de sonda del cultivo, la cual incrementa en condiciones de irradiación (Figura 4-15).

Figura 4-14: Porcentaje de células que captan glucosa en el cultivo de MCF7 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.

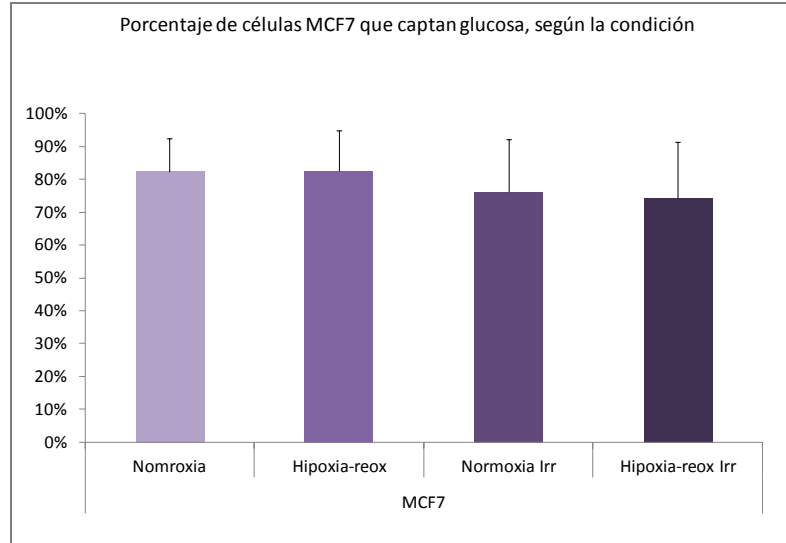
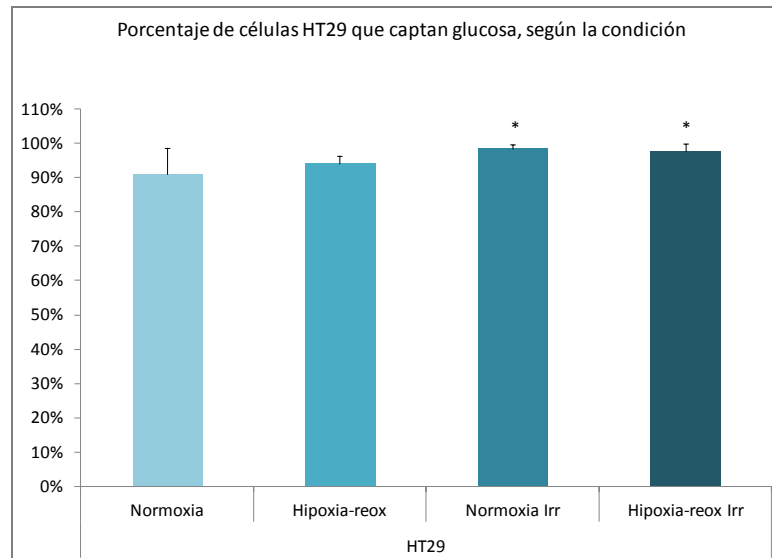


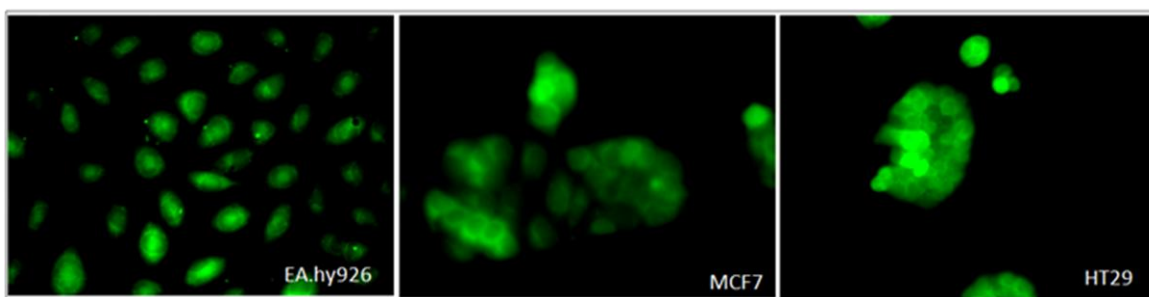
Figura 4-15: Porcentaje de células que captan glucosa en el cultivo de HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes. *: $p < 0.050$ normoxia como control.



Estas variaciones en el porcentaje de células que captan y no captan la sonda, se correlaciona con los hallazgos de la captación total de sonda en cada cultivo. Sin

embargo, además de observar que había células que no captaban la sonda de glucosa en los cultivos, se observó que la captación de sonda también era diferente entre una y otra célula de la misma línea celular, como se observa en la Figura 4-16. Por esta razón, se quiso evaluar la captación individual de cada célula.

Figura 4-16: Diferencias en la captación de la sonda de glucosa dentro de la misma línea celular.

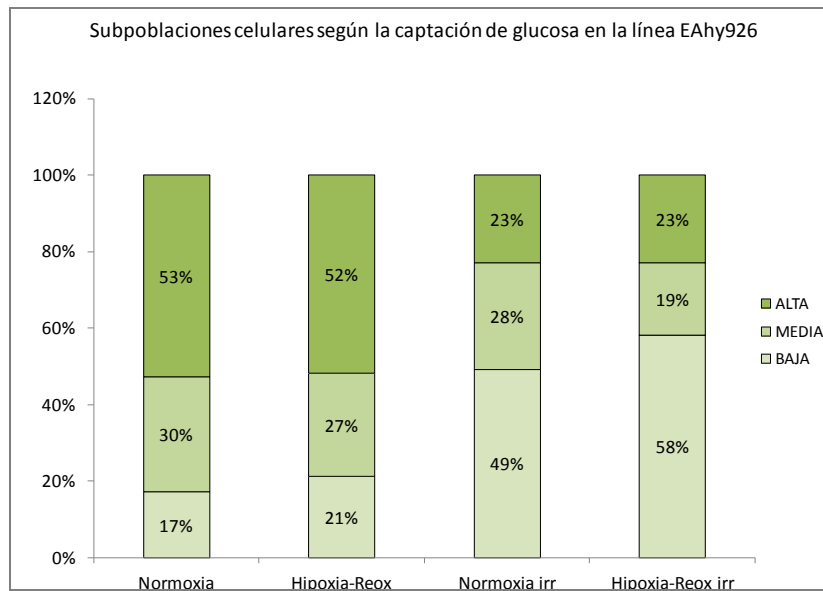


Teniendo en cuenta la célula con mayor fluorescencia dentro del campo (100% fluorescencia), se evaluó el porcentaje de captación individual de sonda y se establecieron subgrupos o poblaciones celulares, según la captación de sonda (ver metodología).

Se encontró que en las células endoteliales en condiciones de normoxia, predominan las células de alta captación de sonda de glucosa, seguida de la subpoblación de media captación (Figura 4-17). Un comportamiento similar se observó cuando las células fueron sometidas a hipoxia y reoxigenación. Sin embargo, al ser sometidas a radiaciones ionizantes, la subpoblación de células de alta captación de la sonda de glucosa disminuyó y hubo un incremento en el porcentaje de células de baja captación de sonda, tanto en normoxia, como en hipoxia-reoxigenación. Se observó entonces que no sólo hay una disminución del porcentaje total de células que captan 2NBDG; también hay una menor captación de sonda por aquellas células que lo hacen, en hipoxia-reoxigenación e irradiación. Estos resultados están acorde con las observaciones de la captación total de la sonda en las células endoteliales al ser sometidas a Hipoxia-reoxigenación e

irradiación, en la que, como ya se mencionó, se observó una disminución significativa (Figura 4-6).

Figura 4-17: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células EAhy926 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación.



Para las células MCF7, en las que se observó un comportamiento homogéneo en cuanto a la captación de sonda de glucosa y al porcentaje de células que la captan, se encontró que en condiciones de normoxia hubo un mayor porcentaje de células con baja captación de sonda de glucosa, seguido por aquellas con una captación moderada (Figura 4-18). Al ser sometidas a Hipoxia-reoxigenación, hubo un aumento del 10% de las células de alta captación y se vio un comportamiento similar (incremento en la población de consumo alto del sonda de glucosa) para las células sometidas a irradiación e Hipoxia-reoxigenación e irradiación, aunque con predominio de la subpoblación de baja captación en todas las condiciones.

En las células HT29, la subpoblación predominante en normoxia fue la de baja captación de la sonda, seguida por la de alta captación (Figura 4-19). Al ser sometidas a Hipoxia-

reoxigenación hubo una disminución de las células que tenían baja captación de la sonda de glucosa (10%) e incrementó la subpoblación de moderada captación.

Figura 4-18: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células MCF7 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación.

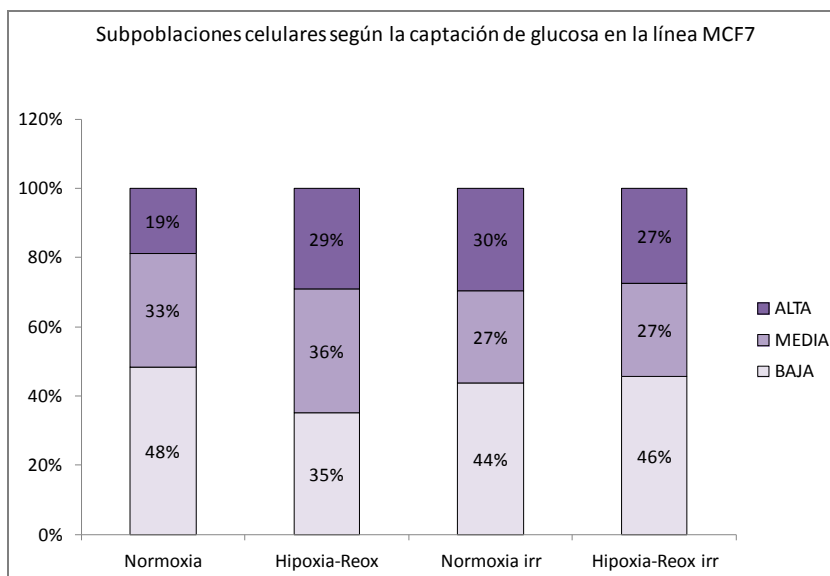
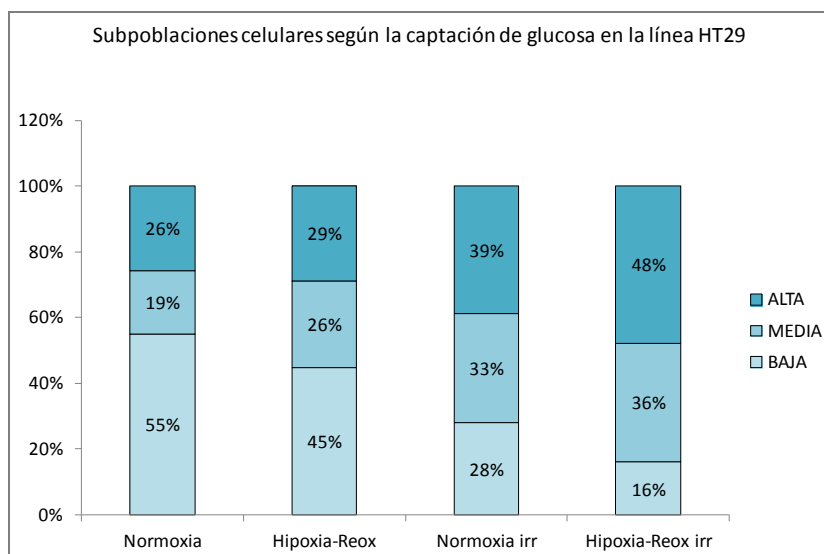


Figura 4-19: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células HT29 sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación.



Sin embargo, al ser sometidas a radiaciones ionizantes (en normoxia e hipoxia-reoxigenación) incrementó la subpoblación de alta captación de la sonda, con una disminución de las células pertenecientes a la subpoblación de baja captación. Estos hallazgos son consistentes con lo que se observó en el comportamiento de estas células en irradiación en las que aumentó la captación total de la sonda de glucosa y el porcentaje de células que la captaban (Figura 4-8).

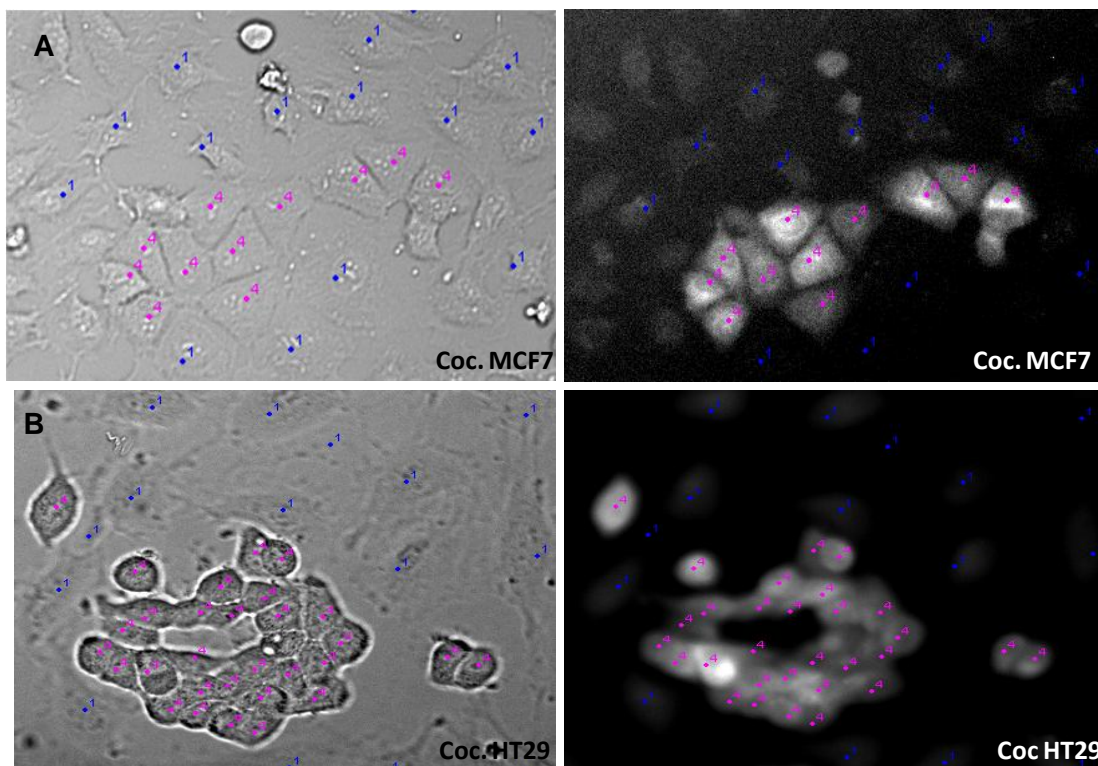
La variación en el porcentaje de células que captan glucosa, así como la evidencia de subpoblaciones celulares con mayor o menor captación de la sonda, y la forma en que estas subpoblaciones se modificaron al ser sometidas a Hipoxia-reoxigenación y/o radiaciones ionizantes, sugiere una adaptación metabólica de cada línea celular a los cambios en el microambiente tumoral.

4.8 Interacción metabólica de células en cocultivo como respuesta adaptativa al estrés

Así como se hizo para la captación de la sonda de glucosa, se quiso identificar si había variaciones en el comportamiento de las subpoblaciones celulares identificadas en los cultivos individuales, al cocultivarlas con células endoteliales. Por tal motivo, se evaluó el porcentaje de células que captaban la sonda de glucosa por campo, en el cocultivo, discriminando cada línea y el comportamiento de las subpoblaciones (Figura 4-20).

A pesar de encontrar una disminución significativa en la captación de sonda de glucosa de células EAhy926 cocultivadas con células tumorales (ambas líneas) en normoxia e hipoxia-reoxigenación (Figura 4-6), el porcentaje de células captantes de la sonda no fue modificado en esta línea celular en los cocultivos (Figura 4-21 A). Tampoco se observaron cambios en el porcentaje de células que captaban glucosa en normoxia e hipoxia-reoxigenación al ser sometidas a radiaciones ionizantes (Figura 4-21 B).

Figura 4-20: Cocultivos de células endoteliales (marcas azules) con células tumorales (marcas rosadas) en campo claro (izquierda) y fluorescencia (derecha) A. Cocultivo de EAhy926 con MCF7. B. Cocultivo de EAhy926 con HT29.



Las células tumorales de seno en cocultivo mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células que captaban la sonda de glucosa, en condiciones de hipoxia reoxigenación, comparadas con la misma condición en el cultivo aislado ($p: 0.047$). No se encontraron otras diferencias significativas para esta línea en cocultivo (Figura 4-22).

En las células HT29 no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células que captaban 2NBDG en comparación con el cultivo aislado. Dentro del mismo cocultivo, hubo una disminución en el porcentaje de células que captaban glucosa en hipoxia-reoxigenación, en comparación con normoxia ($p: 0.014$) (Figura 4-23). Esta observación tiene correlación con la captación de la sonda que para esta condición, también presentó una disminución significativa (Figura 4-10). La comparación del porcentaje de células HT29 captantes de la sonda en hipoxia-reoxigenación con hipoxia

Figura 4-21: Porcentaje de células EAhy926 que captan glucosa en cocultivo con MCF7 y HT29. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. B. En normoxia e hipoxia-reoxigenación sometidas a irradiación. *: $p < 0.050$ normoxia aislada como control.

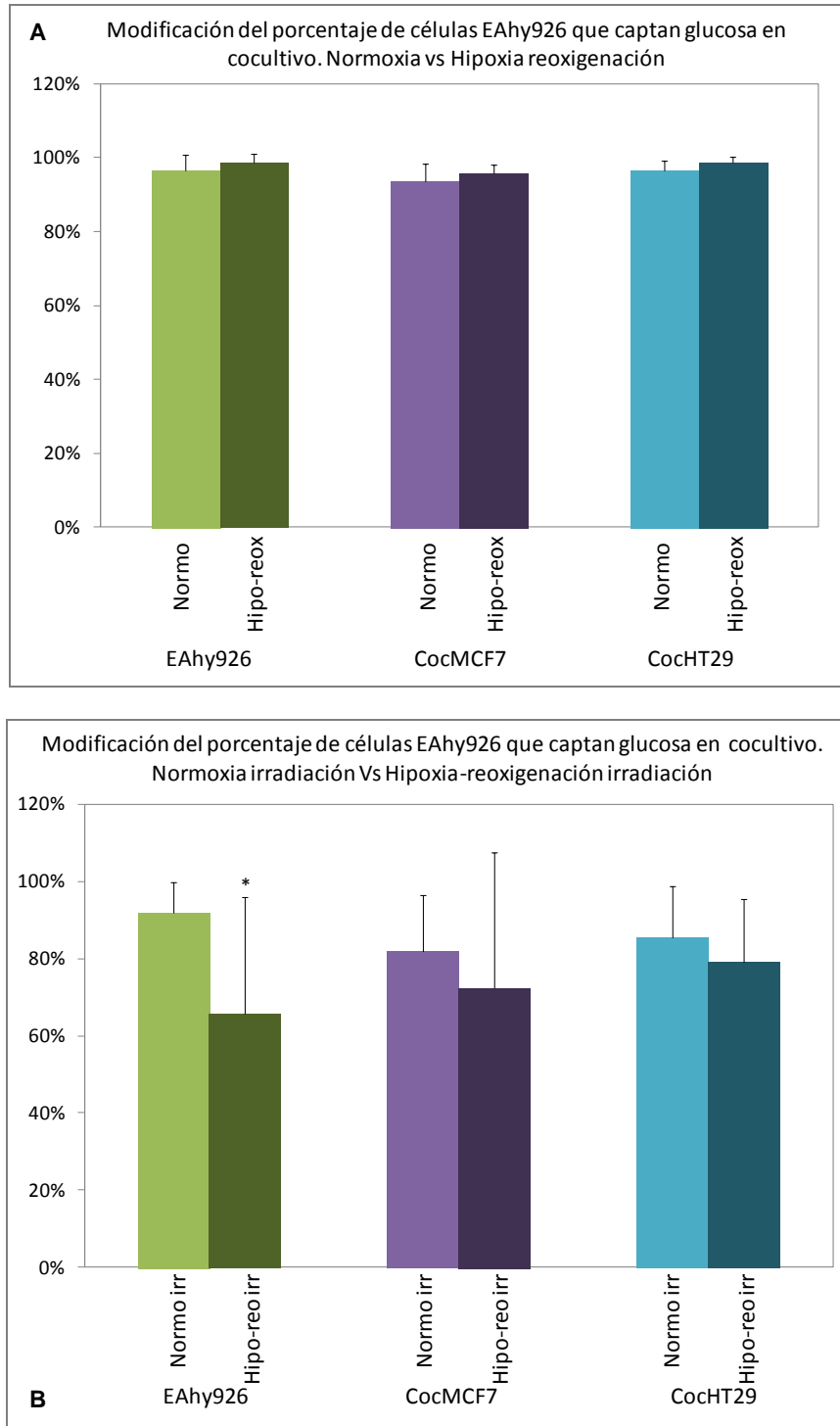
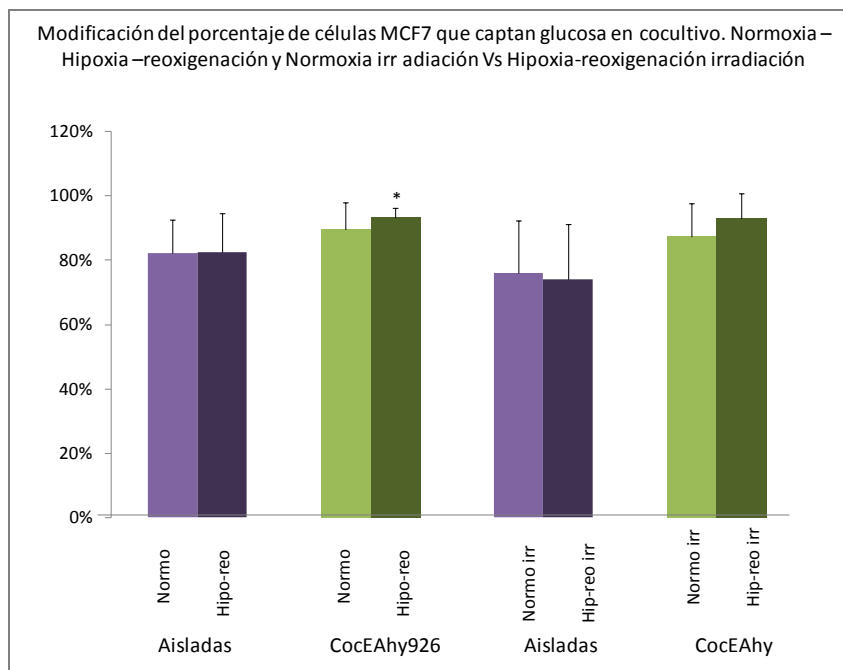


Figura 4-22: Porcentaje de células MCF7 que captan glucosa en cocultivo con células en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.*: $p < 0.050$ normoxia aislada como control.

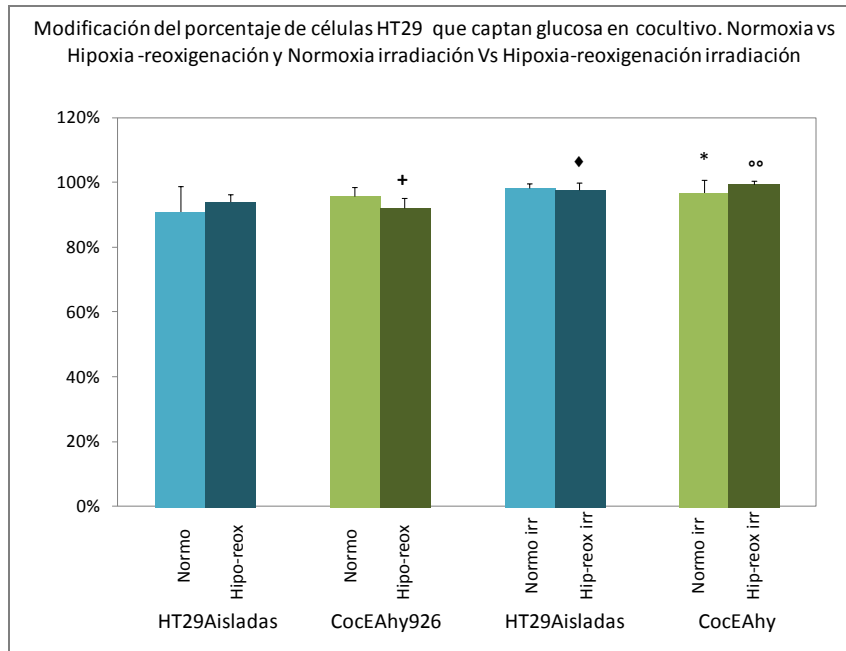


reoxigenación irradiación dentro del cocultivo, mostró un incremento significativo en el número de células que captaban la sonda de glucosa (Figura 4-23). Esta condición también muestra una variación significativa en la captación de sonda de glucosa para esta línea en cocultivo.

Al igual que para las líneas celulares aisladas, se realizó un análisis de las poblaciones celulares y las variaciones observadas en dichas poblaciones, al ser sembradas en cocultivo.

Para las células endoteliales cocultivadas con células tumorales de seno, se evidenció una disminución del 8% en la subpoblación celular de alta captación en normoxia en el cocultivo, respecto al cultivo aislado. Al ser sometidas a hipoxia-reoxigenación, hubo un aumento de la población de baja captación en comparación con el cultivo aislado (Figura 4-24A).

Figura 4-23: Porcentaje de células HT29 que captan glucosa. En cocultivo con células en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación.*: $p < 0.050$ normoxia aislada como control. \blacklozenge : $p < 0.050$ hipoxia aislada como control. +: $p < 0.050$ normoxia cocultivo como control. $\circ\circ$: hipoxia-reoxigenación cocultivo como control.



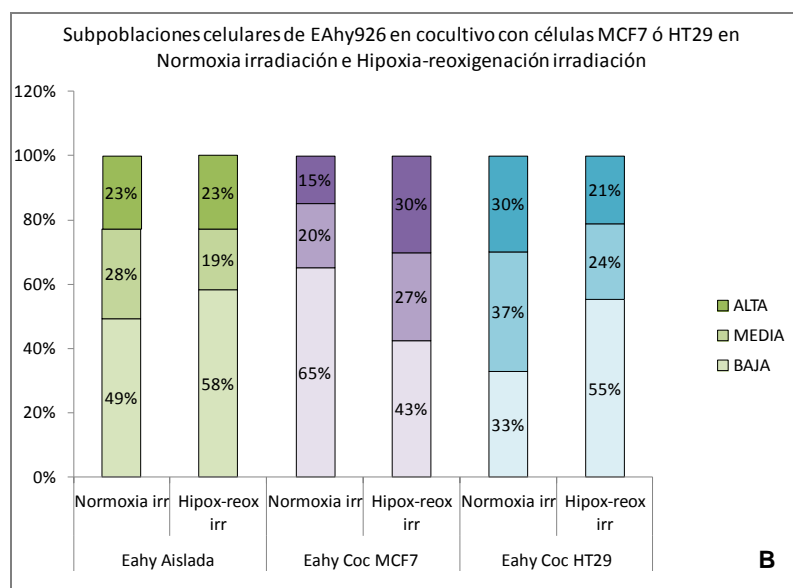
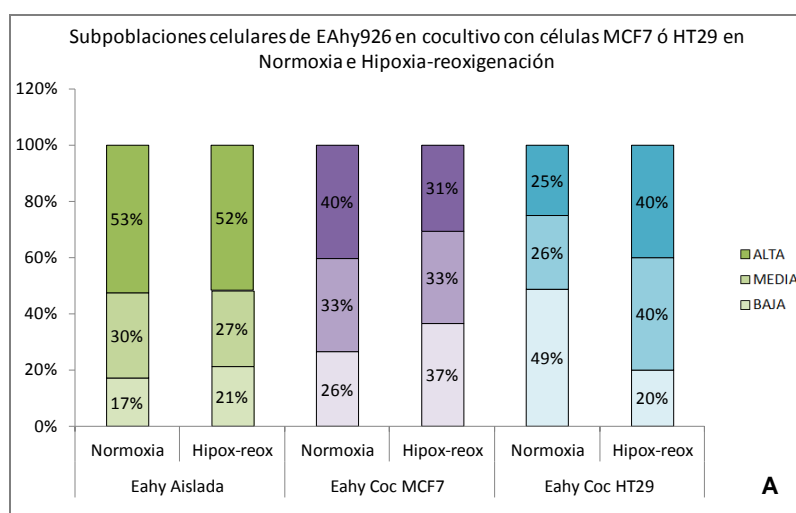
Para el cocultivo con células tumorales de colon, se evidenció en normoxia un incremento de un 32% en el número de células de la subpoblación de baja captación, al comparlas con el cultivo aislado (Figura 4-24 A).

Así mismo, se encontró que en hipoxia-reoxigenación, en comparación con el cultivo aislado, hay una disminución de la subpoblación de alta captación de la sonda, aumentando la subpoblación de captación media, sin cambios en la subpoblación de baja captación (Figura 4-24 A).

Al ser sometidas a radiaciones ionizantes, tanto en normoxia como en hipoxia-reoxigenación, la subpoblación más grande es la de baja captación para las células EAhy926. Cuando se cultivaron con MCF7 en normoxia y se irradiaron, la subpoblación de células endoteliales de baja captación aumentó hasta un 65%. Pero en hipoxia-reoxigenación e irradiación, dicha población disminuyó, al comparlas con el cultivo aislado (Figura 4-24 B).

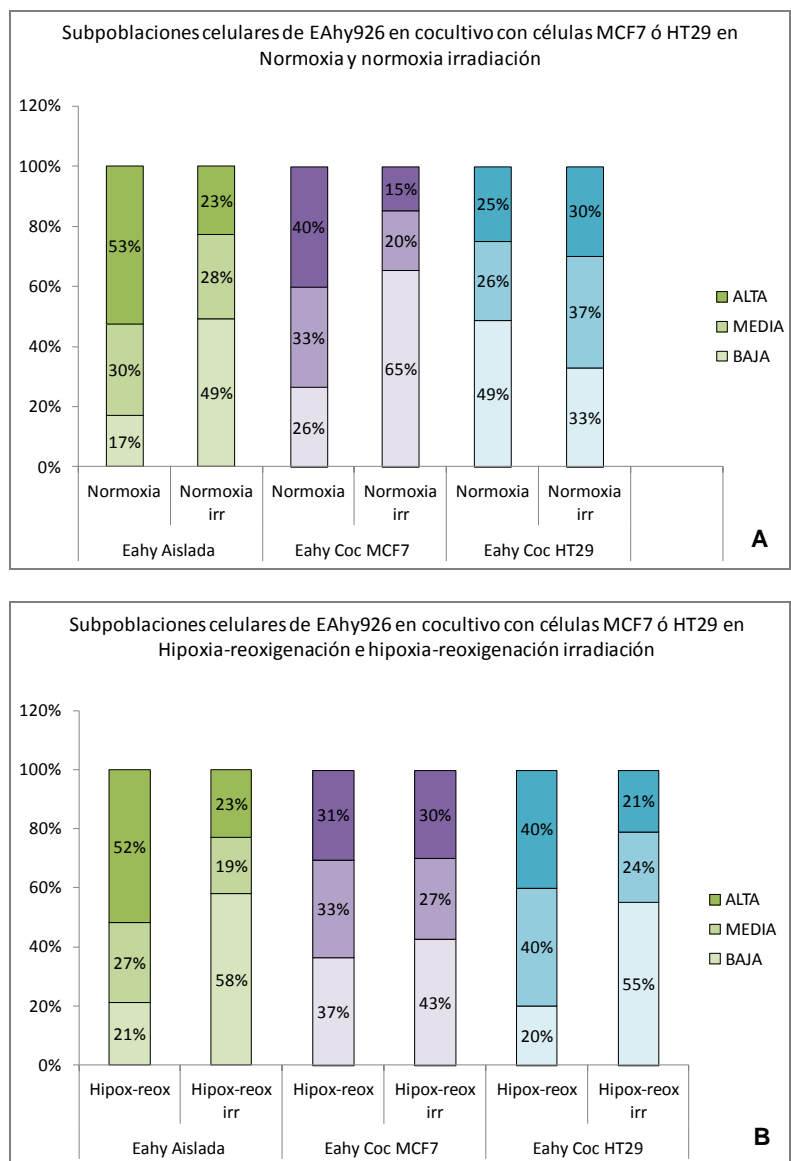
En comparación con el cultivo aislado, las células endoteliales en cocultivo con HT29 en normoxia irradiadas, mostraron una redistribución de las subpoblaciones, dada por una disminución de la subpoblación de baja captación y repartiéndose en forma similar entre las tres subpoblaciones. (Figura 4-24 B).

Figura 4-24: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células EAhy926 cocultivadas con células MCF7 y HT29. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. B. En normoxia e hipoxia-reoxigenación e irradiación.



Al comparar las células EAhy926 sometidas a irradiación, con aquellas que no lo fueron en el cocultivo con MCF7, se encontró que en normoxia irradiación, hay un incremento en la subpoblación de baja captación. En hipoxia reoxigenación irradiada, en comparación con hipoxia-reoxigenación (sin irradiar), no hubo cambios en la distribución de las subpoblaciones dentro del cocultivo (Figura 4-25 A).

Figura 4-25: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células EAhy926 cocultivadas con células MCF7 y HT29. A. En normoxia y normoxia irradiación. B. En hipoxia e hipoxia-reoxigenación irradiación.



Finalmente, se compararon las células EAhy 926 en cocultivo con células HT29 irradiadas y no irradiadas. En normoxia irradiada, en comparación con normoxia, aumentaron las subpoblaciones de alta y media captación dentro del cocultivo. Para las células sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación, se evidenció un aumento de un 35% en la subpoblación de baja captación de la sonda (Figura 4-25 B).

Las células tumorales de seno en cocultivo, mostraron un incremento en la subpoblación de baja captación en condiciones de normoxia e hipoxia reoxigenación en comparación con el cultivo aislado. Al ser irradiadas en normoxia, no se observaron modificaciones en la distribución de la población, mientras que en hipoxia-reoxigenación irradiadas, aumentó la población celular de alta captación de glucosa, cuando se compararon con el cultivo aislado (Figura 4-26).

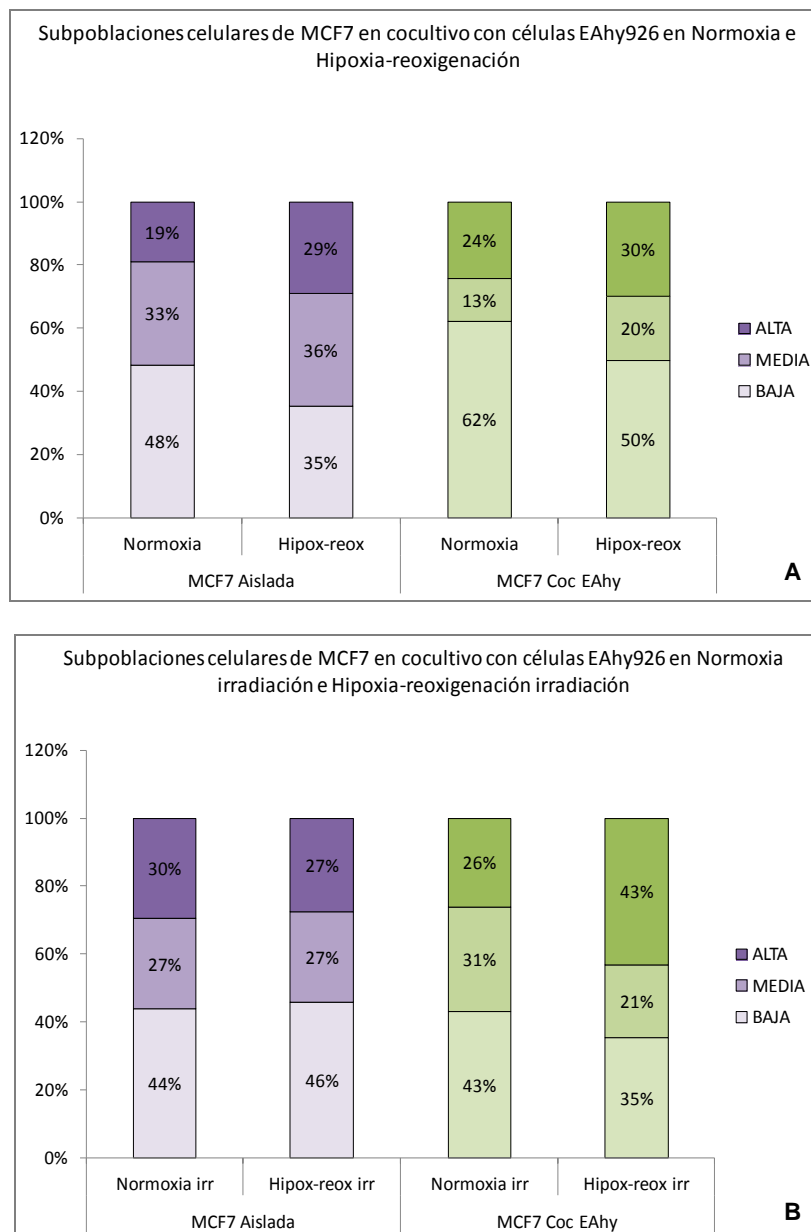
Al comparar las células MCF7 cocultivadas con línea endotelial en normoxia y en normoxia irradiadas, la subpoblación celular de baja captación disminuyó en irradiación (en un 19%) y la subpoblación de alta captación aumentó en un 2% dentro del cocultivo. En las células tumorales de seno en hipoxia-reoxigenación en cocultivo, predominaba la subpoblación de baja captación de la sonda, distribución que fue modificada al someter el cultivo a radiaciones ionizantes, observando un incremento en la subpoblación de captación alta de la sonda en un 13% (Figura 4-27).

La observación de las subpoblaciones celulares de células tumorales de colon HT29 en cocultivo con células endoteliales, mostraron una disminución de la subpoblación de células de baja captación de glucosa en un 11%, en comparación con las células HT29 cultivadas de forma aislada en normoxia (figura 4-28). En hipoxia-reoxigenación, por el contrario, hubo un aumento de un 12% en la subpoblación celular de baja captación de 2NBDG, en comparación con el cultivo aislado. Al ser sometidas a radiaciones ionizantes, tanto en normoxia como en hipoxia-reoxigenación, no se modificó la distribución de las subpoblaciones celulares, en comparación con lo observado en el cultivo aislado.

También se compararon las subpoblaciones celulares de las células HT29 cocultivadas con células endoteliales en normoxia y normoxia irradiación. La subpoblación celular de

baja captación de sonda, disminuyó en un 16%, con un aumento de la subpoblación de alta captación de un 11% dentro del cocultivo (Figura 4-29).

Figura 4-26: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células MCF7 cocultivadas con células EAhy926. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. B. En normoxia irradiación e hipoxia-reoxigenación irradiación.



En condiciones de hipoxia reoxigenación irradiadas, se presentó el mismo comportamiento, con una disminución del 31% de la subpoblación de baja captación de glucosa y un incremento del 26% de la subpoblación de alta captación en las células HT29 (Figura 4-29).

Figura 4-27: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células MCF7 cocultivadas con células EAhy926. A. En normoxia y normoxia irradiación. B. En hipoxia-reoxigenación e hipoxia-reoxigenación irradiación.

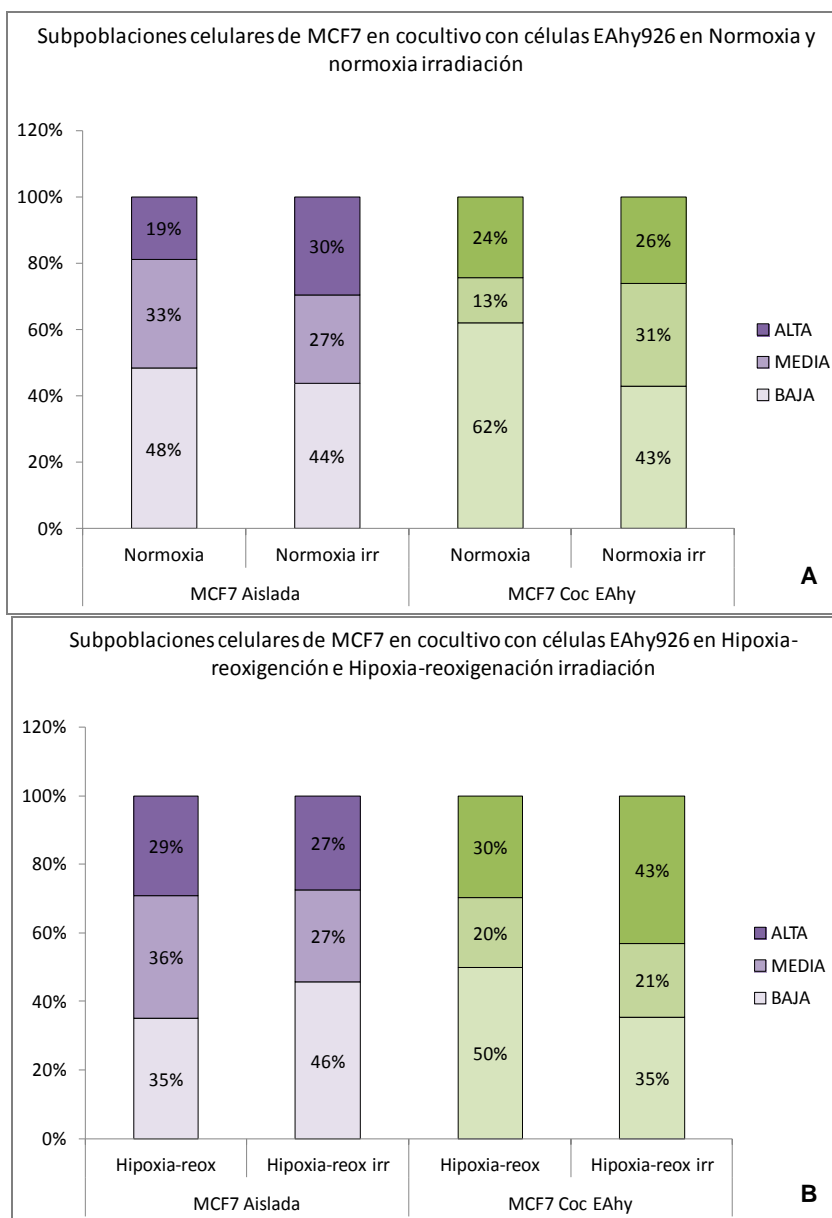


Figura 4-28: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células HT29 cocultivadas con células EAhy926. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. B. En normoxia irradiación e hipoxia-reoxigenación irradiación.

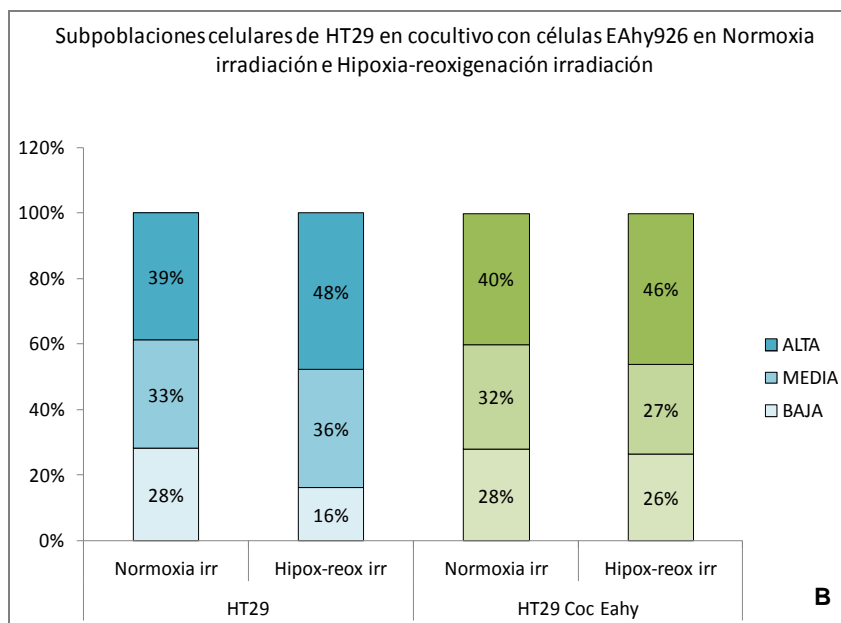
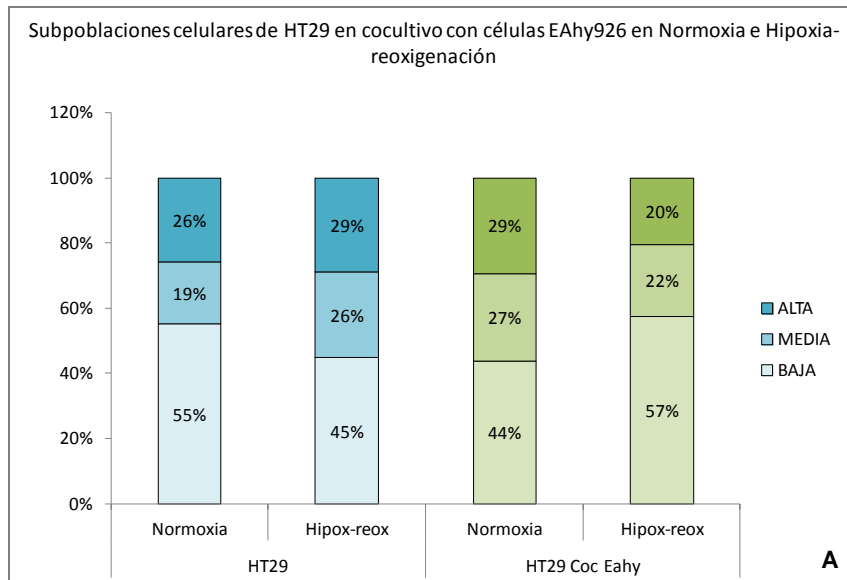
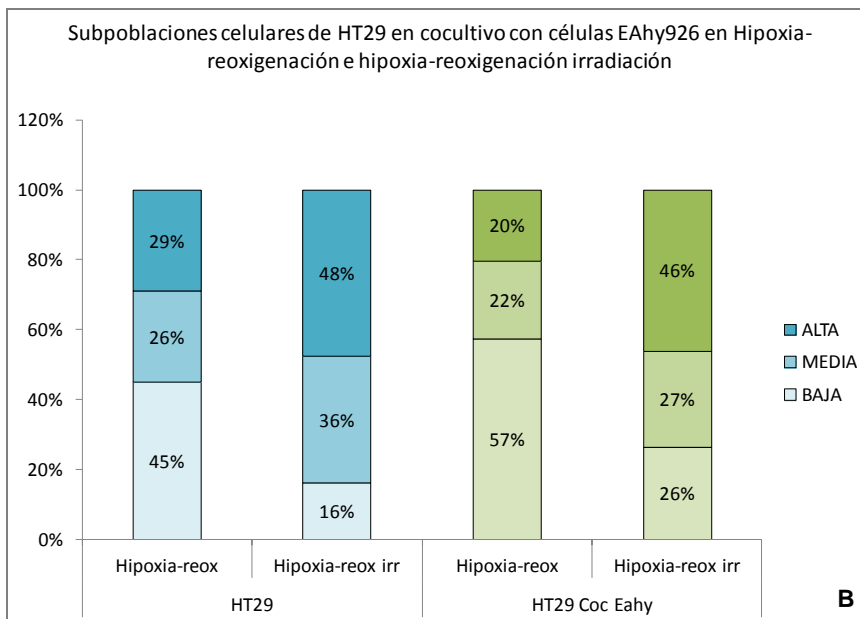
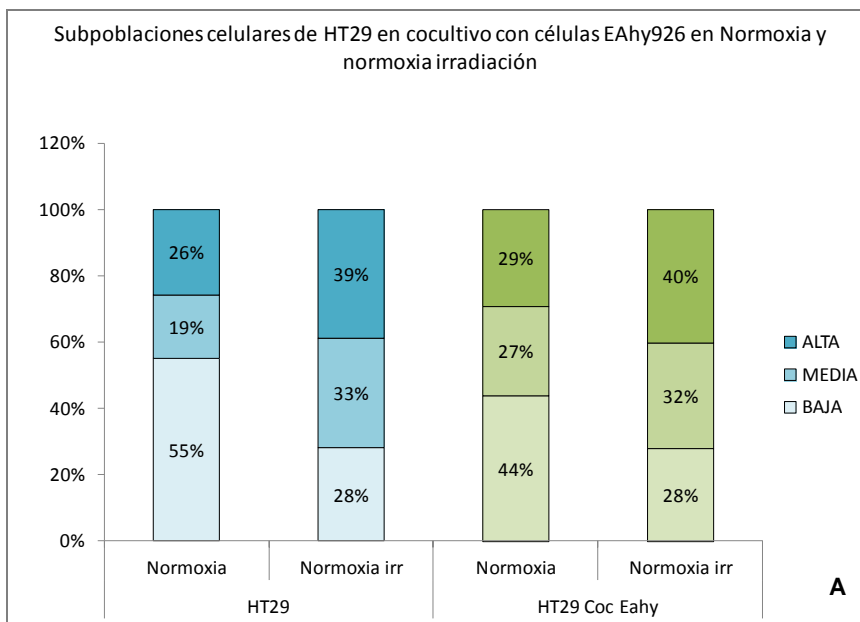


Figura 4-29: Subpoblaciones celulares según la captación de glucosa en células HT29 cocultivadas con células EAhy926. A. En normoxia y normoxia irradiación. B. En hipoxia-reoxigenación e hipoxia-reoxigenación irradiación.



Teniendo en cuenta estos resultados, se pudo determinar que, así como se vieron modificaciones en la captación de glucosa en las células en cocultivos, el porcentaje de células captantes y las subpoblaciones celulares también fueron modificados en los cocultivos. Existen entonces subpoblaciones celulares dinámicas, que son modificadas no sólo por las condiciones de estrés (variaciones en la concentración de oxígeno e irradiación), sino también por la presencia de otras células en el cultivo.

La célula tumoral está expuesta a variaciones constantes en el microambiente, no sólo en relación con las concentraciones de oxígeno y la disponibilidad de glucosa y otras moléculas, sino también debido a la presencia de otras células y la señalización que existe entre ellas. Esto hace que aquellas células que se adaptan a todas las variaciones a las que son expuestas, sobrevivan y puedan proliferar, como se postula en la teoría del juego evolutivo (Gatenby & Gillies 2004). Una de estas adaptaciones es el efecto Warburg. Sin embargo y gracias a técnicas de diagnóstico como el PET, se ha visto que no todo el metabolismo tumoral depende del consumo de glucosa, lo que sugiere que deben existir otras fuentes de energía para la célula tumoral (Nakajima & Van Houten 2012). En el 2008, Sonveaux y colaboradores describieron un hallazgo que podría explicar lo observado en estos cultivos. Al observar los medios de cultivo de dos líneas tumorales (SiHa, de cáncer de cérvix y WiDr de cáncer de colon), evaluadas al mismo tiempo de siembra y en la misma confluencia, encontraron que en las células SiHa no había acidificación del medio de cultivo, mientras que en las WiDr sí existía dicha acidificación. Se confirmó que en las células tumorales de cérvix, había poco lactato en el medio de cultivo, producto de la glucólisis anaerobia, e identificaron que las células SiHa tenían una mayor expresión de *MCT1* que *MCT4*.

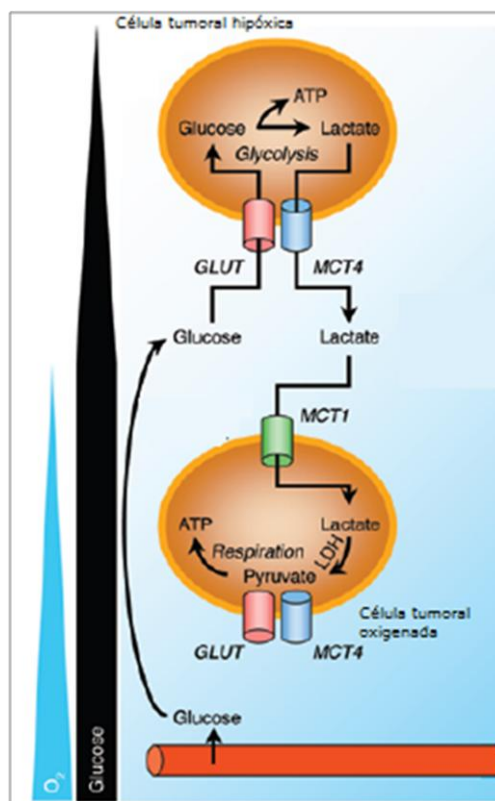
Los MCT son una familia de transportadores de monocarboxilato (como el lactato y el piruvato), presentes en tejidos como el músculo esquelético, corazón, cerebro y retina, tejidos en los que el transporte del lactato es fundamental. Se sabe además que el MCT1, cataliza la entrada de lactato al citoplasma de la célula, mientras que el MCT4 cataliza su salida (Halestrap & Price 1999).

Sonveaux y colaboradores propusieron un modelo de simbiosis en el que las células con adaptación metabólica a la hipoxia, que tienen un metabolismo glucolítico anaerobio,

exportan lactato. Este lactato es utilizado por las células que no adquirieron ese fenotipo, y lo oxidan para conseguir energía (Figura 4-30).

En ese mismo estudio, los autores encontraron que las células MCF7 expresan el MCT1 y una línea tumoral de colon (WiDr), tiene una menor expresión de este transportador, en comparación con la línea tumoral de seno (Sonveaux et al. n.d.). Este hallazgo es consecuente con lo encontrado en nuestras células respecto a la captación de glucosa, pues se evidenció que las células MCF7 tienen un predominio de células de la subpoblación de baja captación en todas las condiciones. Las células HT29, de cáncer de colon, tienen predominio de la población de baja captación en normoxia e hipoxia - reoxigenación.

Figura 4-30: Simbiosis metabólica. Hay células tumorales que hacen glicólisis anaerobia y expresan MCT4 exportando lactato. Otras células tumorales, sin adaptación metabólica a la hipoxia, expresan MCT1 y usan el lactato como fuente de energía. Adaptado de (Sonveaux et al. 2008)



Al ser sometidas a radiaciones ionizantes, hay un aumento en la población de alta captación, lo cual indicaría que bajo condiciones de irradiación se favorece la supervivencia de células de fenotipo glucolítico.

4.9 Expresión de NRF2 en cultivos de células tumorales y endoteliales en respuesta a condiciones de estrés celular

La proteína NRF2 es un factor de transcripción que se activa en respuesta al estrés celular para garantizar el mantenimiento del estado redox de la célula. El estudio de NRF2 en cáncer ha cobrado gran interés, pues se le ha otorgado un papel de molécula protectora frente a esta patología, pero también pareciese facilitar la supervivencia de las células tumorales del microambiente en que están inmersas (Lau et al. 2008).

El papel de NRF2 en relación con el metabolismo glucolítico de la célula aún no es bien conocido. Recientemente, se ha descrito un papel importante de esta proteína en la regulación de la vía de las pentosas fosfato, de gran importancia en cáncer por la proliferación celular. Se encontró que este factor de transcripción actúa sobre el gen *G6PD*, que codifica para la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, el gen *PGD*, que codifica para la enzima fosfogluconato deshidrogenasa, y el gen *TKT*, que codifica para la transcetolasa, todas enzimas involucradas en la ruta de pentosas fosfato.

En este trabajo se quiso buscar una relación de esta proteína con la captación de glucosa de las células estudiadas. Como aproximación inicial, se evaluó la expresión total de la proteína en las células estudiadas, sometidas a los diferentes estresores.

Para las células endoteliales, se encontró que en normoxia y normoxia - irradiación, hay mayor expresión de la proteína, que en los casos de hipoxia-reoxigenación e hipoxia-reoxigenación irradiadas (Figura 4-31A). De forma llamativa, la mayor captación de

glucosa, se encontró en las células cultivadas en hipoxia-reoxigenación e irradiadas, condición en la cual se encontró la menor expresión de NRF2 en el western blot.

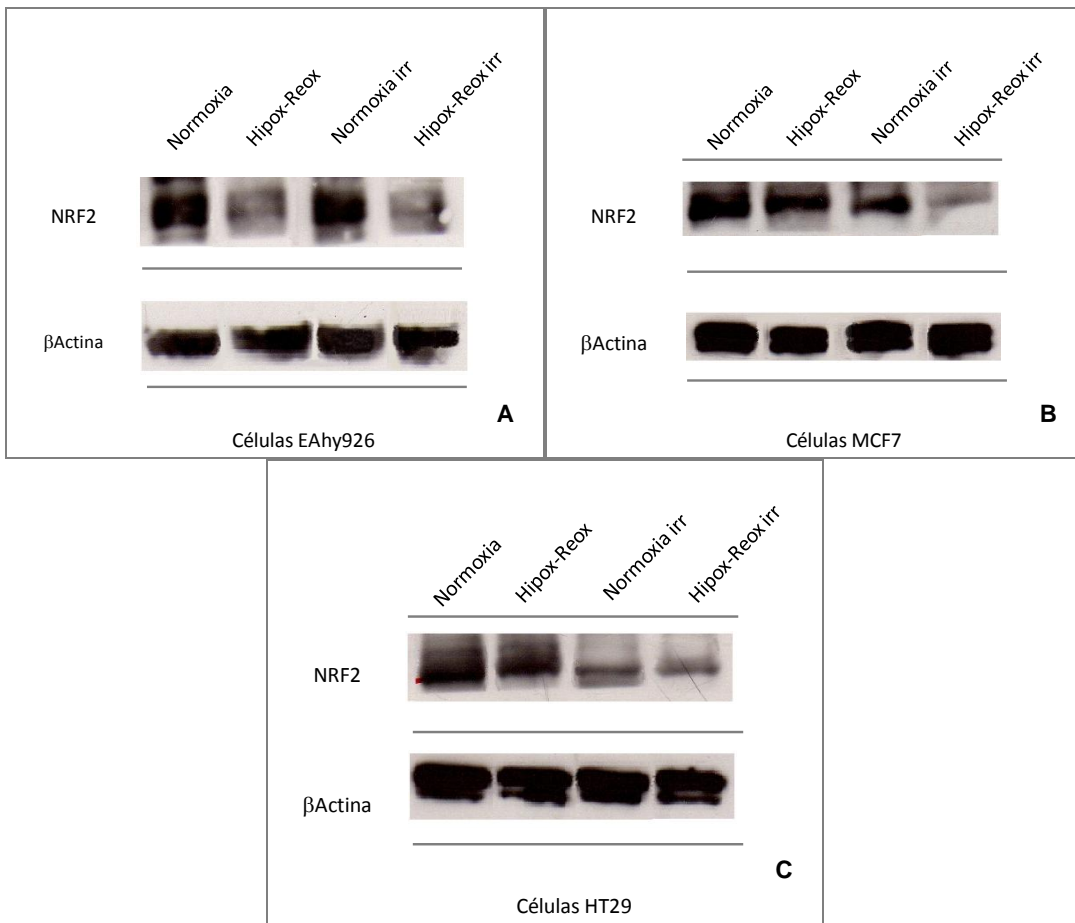
En las células tumorales de seno, se encontró una mayor expresión de la proteína en condiciones de normoxia, seguida por la expresión en hipoxia-reoxigenación y en normoxia irradiación. La expresión más baja se observó en el cultivo de las células sometidas a hipoxia-reoxigenación e irradiación, situación de mayor estrés oxidativo para las células (Figura 4-31B). Aunque para las células MCF7 no hubo variaciones significativas en la captación de la sonda de glucosa, la mayor captación de 2NBDG fue para las células sometidas a radiaciones ionizantes, condiciones en las cuales se evidenció menos expresión de la proteína.

Para las células HT29, se encontró una expresión mayor en las condiciones de normoxia e hipoxia-reoxigenación que en los cultivos de células irradiadas. De forma llamativa, fue bajo estas dos últimas condiciones, donde se observó una mayor captación de glucosa en esta línea tumoral (Figura 4-31C).

El ensayo de Western blot permitió ver que la proteína NRF2 se expresa en todas las células utilizadas en este estudio. Sin embargo, esta aproximación no permite ver la actividad de la proteína, ya que se hizo en extracto total de proteínas, lo cual no muestra si la proteína está activada o no. De forma llamativa, las condiciones en las cuales hubo una mayor captación de glucosa, fue donde se encontró una menor expresión de NRF2.

Se decidió entonces evaluar la translocación nuclear de la proteína con Inmunocitoquímica, pues con esta técnica se puede ver la localización subcelular de la proteína y permite igualmente evaluar la expresión y localización subcelular de la proteína en las células en cocultivo.

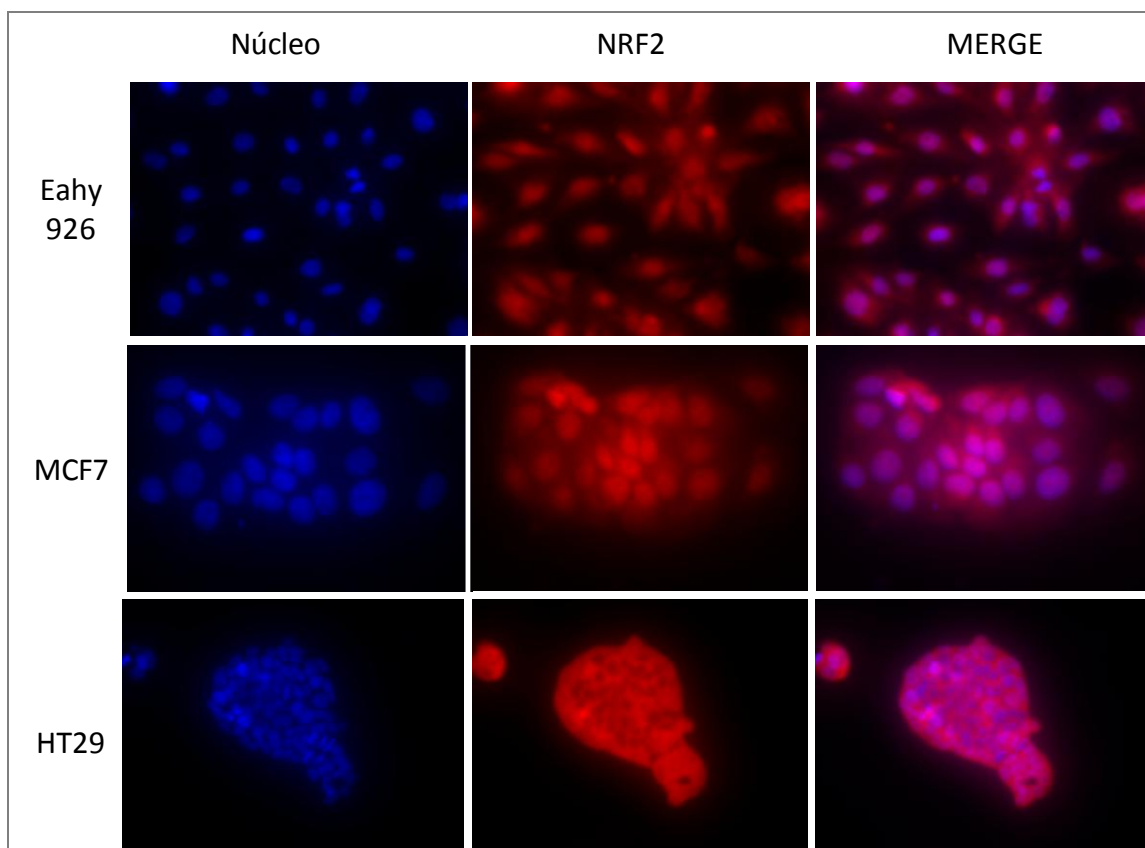
Figura 4-31: Expresión de NRF2 por western blot en cultivos celulares sometidos en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación. A. Células EAhy926. B. Células MCF7. C. Células HT29.



4.10 Translocación nuclear de NRF2 en cultivos individuales y en cocultivos de células EAhy926, MCF7 y HT29

Al igual que se hizo para los otros ensayos, se evaluó primero la translocación nuclear de este factor de transcripción en cultivos individuales y luego se observó el efecto que tienen los cocultivos en la translocación nuclear de esta proteína en cada línea celular (Figura 4-32).

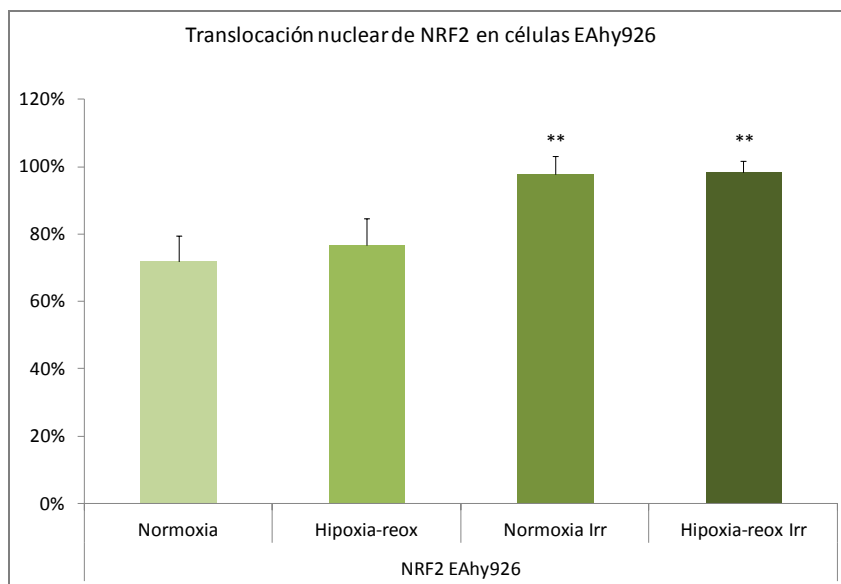
Figura 4-32: Inmunocitoquímica para NRF2 en células EAhy926, MCF7 y HT29 cultivadas en hipoxia-reoxigenación.



En las células endoteliales, se encontró una translocación nuclear de la proteína NRF2 mayor del 50% en todas las condiciones (Figura 4-33). Esta observación se explica

debido a que la línea endotelial EAhy926 es un híbrido con células A549 de adenocarcinoma de pulmón (ver metodología). Se ha demostrado que en estas células tienen una sobreexpresión constitutiva de la proteína (Kweon, Adhami, Lee, & Mukhtar, 2006) Sin embargo, se encontró un incremento significativo en la translocación de este factor de transcripción en las células sometidas a radiaciones ionizantes, tanto en normoxia como en hipoxia-reoxigenación, con una translocación cercana al 100% de las células (p : 0.002 y 0.010). Las condiciones en las que se observó una mayor translocación de la proteína al núcleo, coinciden con las condiciones en que la captación de glucosa es menor (Figura 4-6). Vale la pena resaltar que el ensayo de western blot mostró una mayor expresión de la proteína en normoxia y normoxia irradiación. Sin embargo, el mayor porcentaje de translocación nuclear fue para las células irradiadas. Esto indica que la translocación nuclear de la proteína es independiente de la expresión de la misma. Es decir, así haya una expresión aumentada, la proteína no será necesariamente translocada al núcleo celular.

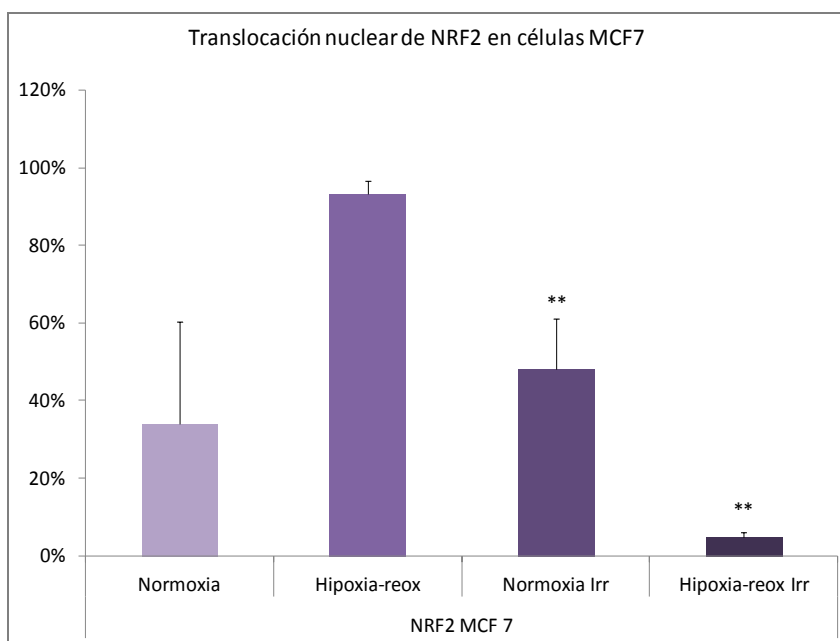
Figura 4-33: Translocación nuclear de NRF2 en células EAhy926 en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación. **: $p < 0.010$ normoxia como control.



Aunque en normoxia en las células MCF7 hay una translocación nuclear de NRF2 del 34%, que es incrementada hasta el 93% en hipoxia reoxigenación, esta diferencia no fue

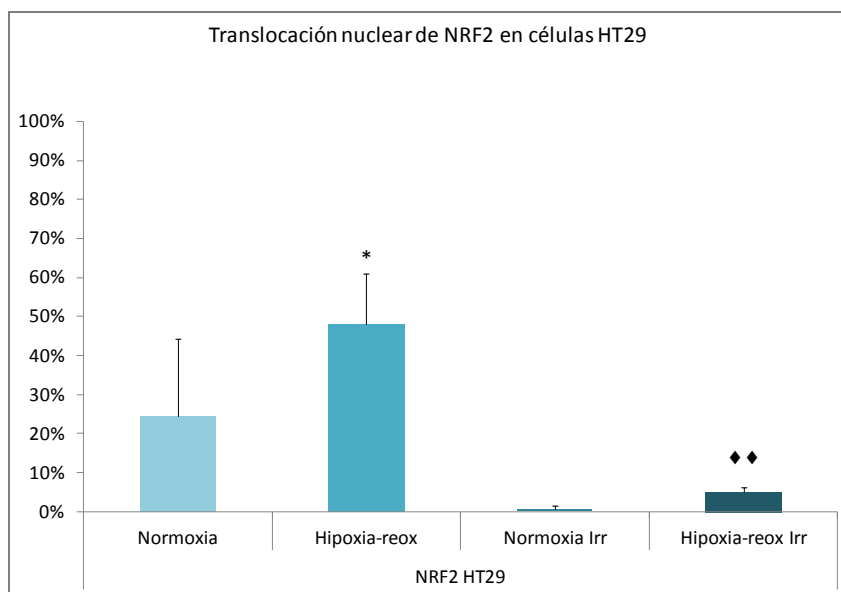
significativa ($p: 0.060$). La variación en la translocación nuclear del factor de transcripción para las células sometidas a radiaciones ionizantes sí fue significativo, tanto para las células cultivadas en normoxia (aumentó) ($p: 0.003$), como para las cultivadas en hipoxia-reoxigenación (disminuyó) ($p: 0.003$) (Figura 4-34). De forma llamativa, estas son las condiciones de mayor estrés celular y fueron las condiciones en las que se observó una mayor captación de glucosa para esta línea (aunque la diferencia no fue significativa). La expresión de NRF2 en las células MCF7 fue menor cuando el cultivo fue sometido a radiaciones ionizantes. Estos hallazgos también demuestran que la cantidad de proteína translocada al núcleo es independiente de la expresión de proteína.

Figura 4-34: Translocación nuclear de NRF2 en células MCF7 en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación. **: $p < 0.010$ normoxia como control.



En las células HT29 (Figura 4-35) se observó un incremento significativo en la translocación nuclear de la proteína NRF2 en condiciones de hipoxia-reoxigenación (p : 0.041), en comparación con normoxia. Las células cultivadas en hipoxia-reoxigenación y sometidas a radiaciones ionizantes mostraron una disminución significativa en la translocación nuclear de NRF2 en comparación con hipoxia-reoxigenación sin irradiar. No se observaron diferencias significativas al comparar las células cultivadas en normoxia y sometidas a radiaciones ionizantes incluso a pesar de observar que sólo el 1% de la proteína es translocada en las células sometidas a normoxia e irradiación (p : 0.061). Al igual que lo observado en las células tumorales de seno, las condiciones en que hubo una mayor captación de glucosa, fueron aquellas en que el porcentaje de proteína hallado en el núcleo fue menor. Para esta línea celular, la expresión de la proteína NRF2 fue menor en estas dos últimas condiciones, coincidiendo con las condiciones de menor cantidad de proteína en el núcleo celular. Es importante resaltar que al ser sometidas a radiaciones ionizantes, las células HT29 presentaron una mayor captación de glucosa en comparación con las otras dos condiciones (Figura 4-8).

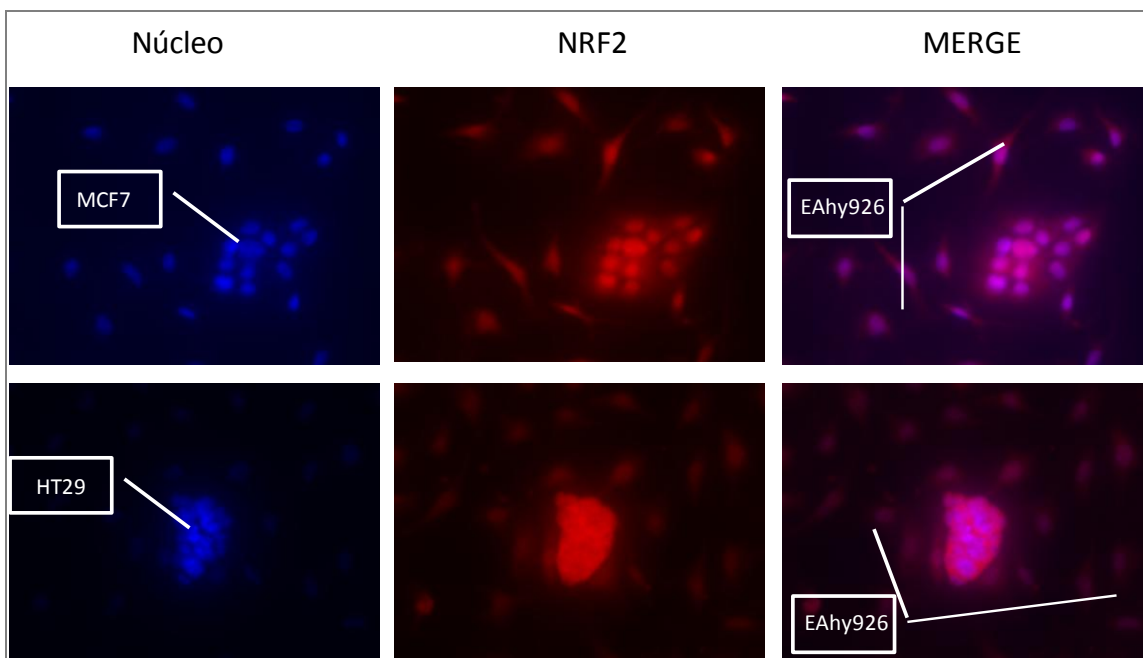
Figura 4-35: Translocación nuclear de NRF2 en células HT29 en normoxia, hipoxia-reoxigenación e irradiación. *: $p < 0.050$ normoxia como control. ♦♦: $p < 0.010$ hipoxia-reoxigenación como control.



Se debe tener en cuenta que el encontrar una cantidad disminuida de proteína nuclear, podría indicar una translocación y activación prematura (en relación con las otras líneas y otras condiciones de estrés). Sin embargo, es de resaltar que la localización de la proteína NRF2 en el núcleo celular, no implica que se esté uniendo a los elementos de respuesta antioxidantes (ARE) en el DNA de los genes blanco.

La evaluación de los cocultivos arrojó datos interesantes respecto a esta proteína (Figura 4-36).

Figura 4-36: Inmunocitoquímica para NRF2 en cocultivos de EAhy926 con MCF7 (Arriba) y EAhy926 con HT29 (Abajo).



Se pudo evidenciar que para las células EAhy926 de endotelio, cocultivadas con células tumorales de seno, hubo una disminución significativa en la translocación nuclear de la proteína NRF2 en las condiciones de normoxia e hipoxia-reoxigenación, al compararlas con el cultivo de células aisladas ($p: 0.042$). De forma llamativa, las células EAhy926

cocultivadas con células tumorales de colon, mostraron un comportamiento contrario, evidenciando un aumento significativo ($p: 0.012$) en la translocación nuclear de la proteína en hipoxia-reoxigenación en comparación con el cultivo aislado (Figura 4-37A). Se encontró una disminución significativa de la translocación nuclear de NRF2, al comparar normoxia irradiación del cultivo individual con la misma condición del cocultivo con MCF7 ($p: 0.013$) y con HT29 ($p: 0.000$). El mismo comportamiento fue observado para las células en hipoxia-reoxigenación irradiadas del cultivo aislado en comparación con los cocultivos tumorales ($p: 0.001$ en ambos) (Figura 4-37B).

Comparando el cultivo aislado de MCF7 en normoxia, con el comportamiento de la línea endotelial en cocultivo, se encontró un incremento significativo en la translocación de NRF2 ($p: 0.002$). En hipoxia - irradiación en cultivo individual comparado con el cocultivo, también hubo incremento en la translocación nuclear de la proteína ($p: 0.019$) (Figura 4-38A). Bajo la misma condición de oxigenación, comparando el sometimiento o no a radiaciones ionizantes, sólo se observaron cambios significativos para las células en cocultivo, en normoxia y normoxia irradiación, habiendo una disminución de la translocación en esta última condición ($p: 0.042$) (Figura 4-38B).

Por último, la translocación nuclear de NRF2 en las células HT29, de cáncer de colon mostró diferencias significativas al comparar normoxia irradiación en el cultivo aislado, con la misma condición en el cocultivo ($p: 0.005$). Así mismo, se encontró que en hipoxia-reoxigenación en el cocultivo en comparación con el cultivo individual, hubo un incremento de la proteína translocada ($p: 0,010$) (Figura 4-40A). Al comparar las células bajo las mismas condiciones de oxigenación, irradiadas y no irradiadas, no hubo diferencias significativas en los cultivos aislados, ni en los cocultivos (figura 4-40B).

Figura 4-37: Translocación nuclear de NRF2 en células EAhy926 en cocultivo con MCF7 y HT29. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. *: $p < 0.050$ normoxia aislada como control. **: $p < 0.010$ normoxia aislada como control. ♦: $p < 0.050$ hipoxia-reoxigenación aislada como control. +: $p < 0.050$ normoxia en cocultivo con HT29 como control. B. En normoxia irradiación e hipoxia-reoxigenación irradiación. *: $p < 0.050$

normoxia irradiación aislado como control. **: $p < 0.010$ normoxia irradiada aislado como control. ♦♦: hipoxia-reoxigenación aislada como control.

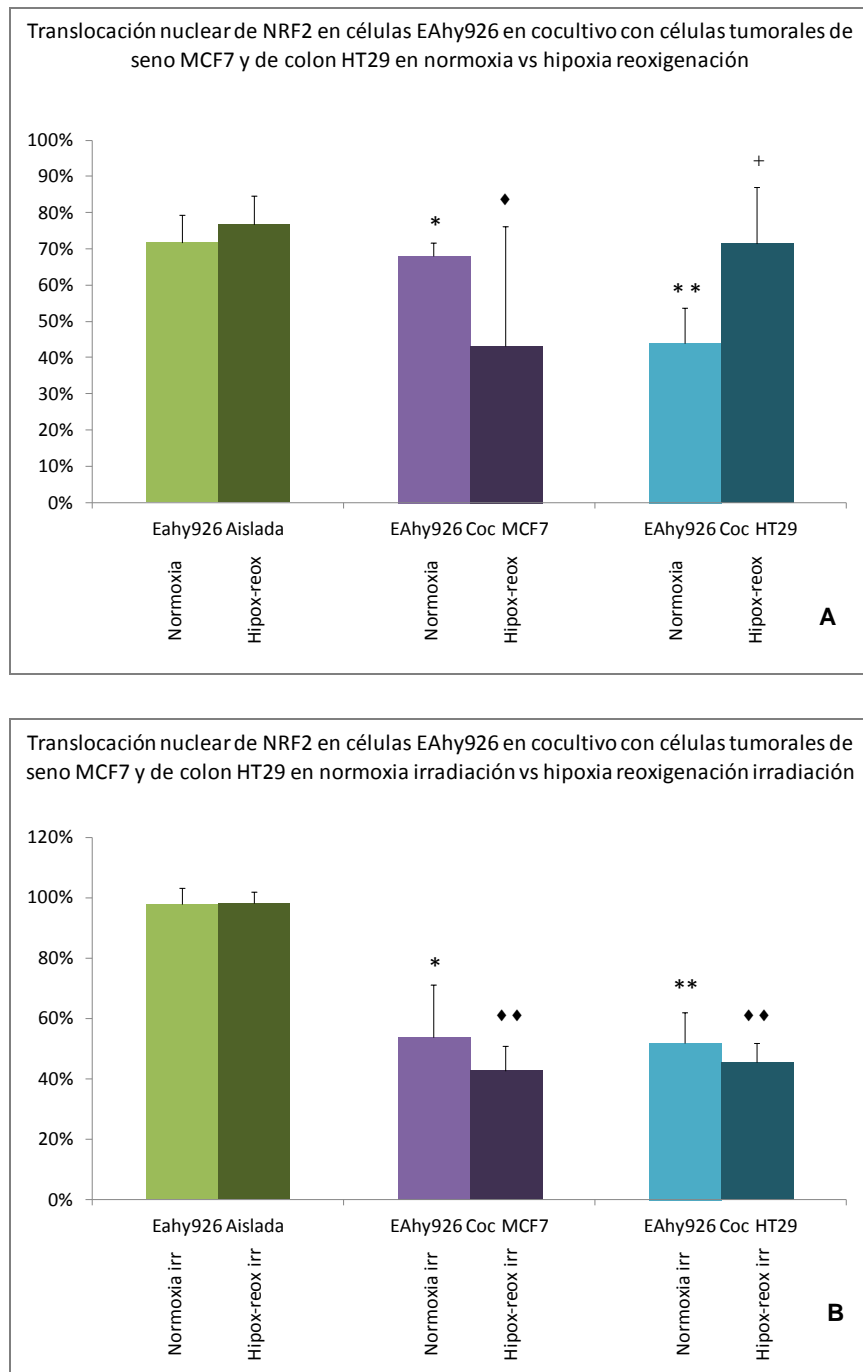


Figura 4-38: Translocación nuclear de NRF2 en células MCF7 en cocultivo con EAhy926. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. **: $p < 0.010$ normoxia aislada como

control. ♦♦: hipoxia-reoxigenación irradiada aislada como control. B. En normoxia e hipoxia-reoxigenación en comparación con cocultivos en irradiación. **: $p < 0.010$ normoxia aislada como control. ♦: $p < 0.050$ normoxia en cocultivo como control. +: $p < 0.050$ hipoxia-reoxigenación aislada como control.

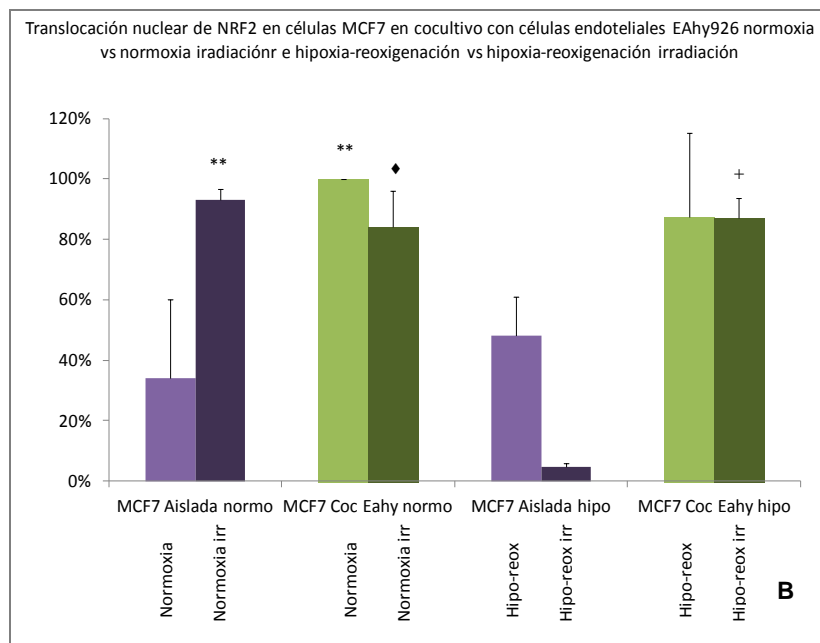
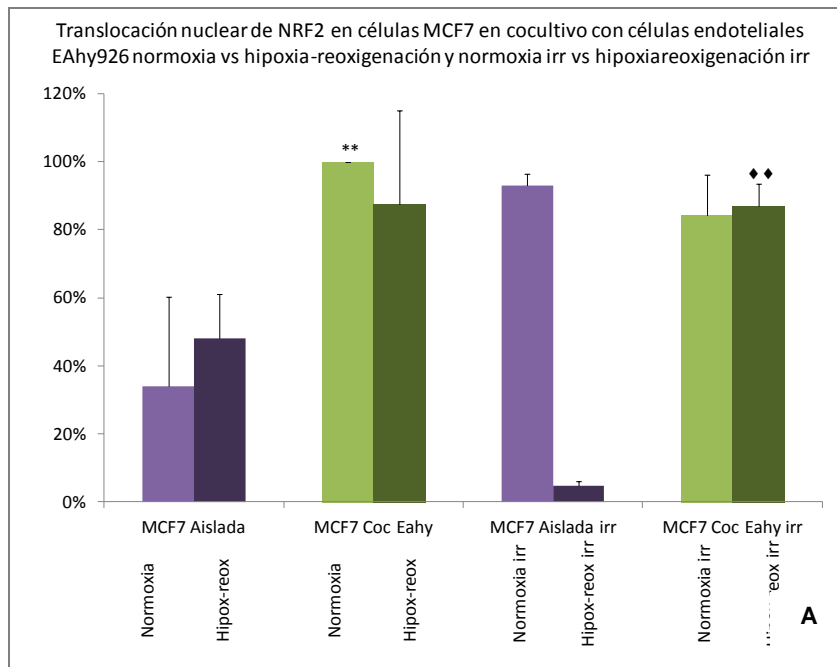
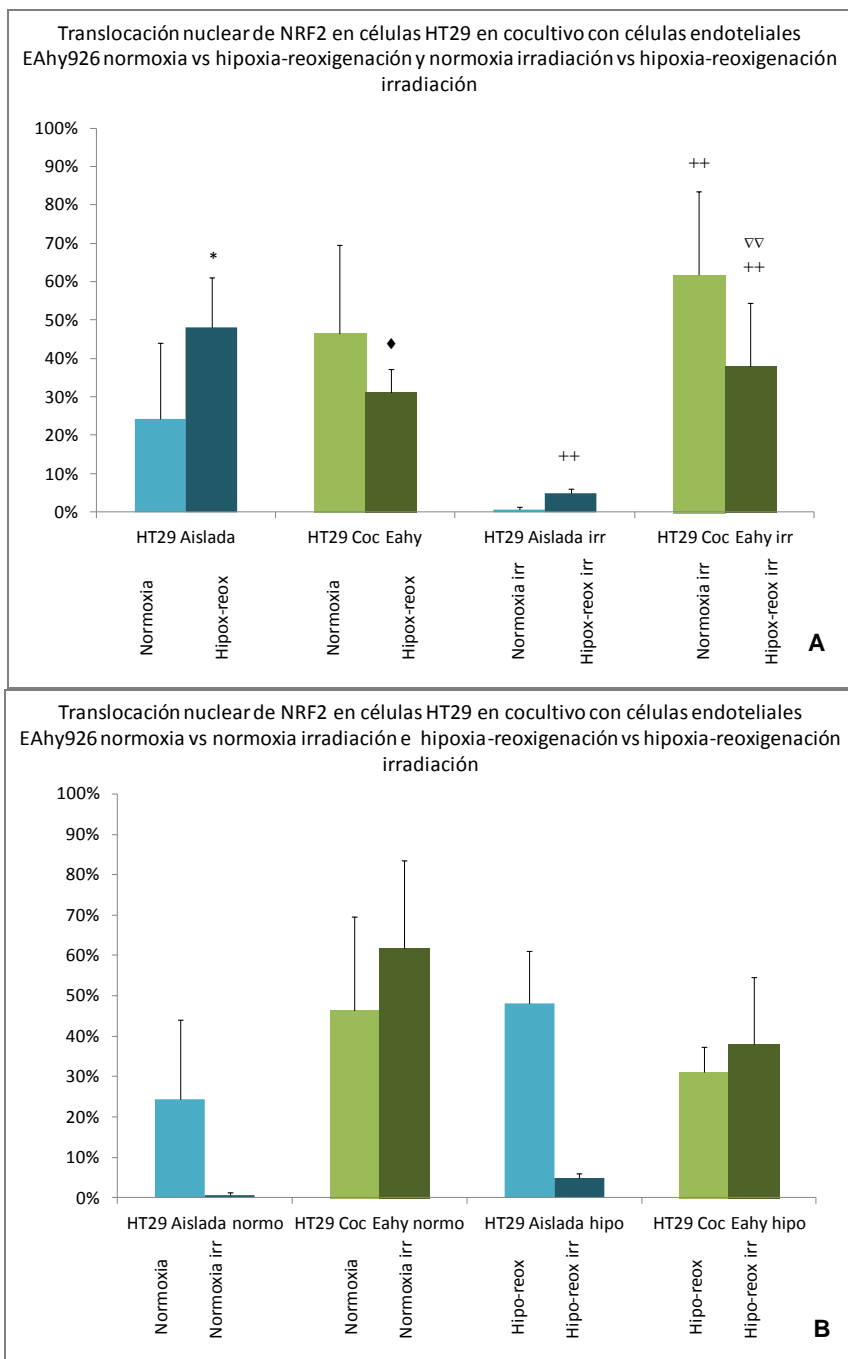


Figura 4-39: Translocación nuclear de NRF2 en células HT29 en cocultivo con EAhy926. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. *: $p < 0.050$ normoxia aislada como control. ♦: hipoxia-reoxigenación aislada como control. ++: $p < 0.010$ normoxia irradiada aislada como control. ∇∇: $p < 0.010$ hipoxia-reoxigenación como control B. En normoxia e hipoxia-reoxigenación en comparación con cocultivos en irradiación.



Con este ensayo se pudo observar una variación en la translocación nuclear de la proteína cuando las células se encuentran en cocultivo, en comparación a la translocación observada en los cultivos individuales. Ello implica que existe una interacción y una señalización dentro del cocultivo que modifica el comportamiento de las células, favoreciendo o impidiendo la activación de vías de señalización celular. Esta aproximación es más cercana a lo que se espera observar en el microambiente tumoral.

En las condiciones de mayor estrés oxidativo (normoxia irradiación e hipoxia-reoxigenación irradiación), se encontró un menor porcentaje de células tumorales con proteína translocada en cultivo individual, situación que no se observó para el cultivo de las células endoteliales, ni en cocultivos.

Con anterioridad se ha demostrado que NRF2 es activada por radiaciones ionizantes (McDonald et al. 2010) (Tsukimoto et al. 2010) La exposición celular a la radiación genera un fenómeno reoxigenación que favorecería la activación de la proteína. El encontrar un menor número de células con proteína translocada en las condiciones de más estrés en nuestro estudio, podría ser explicado por una activación prematura de la proteína en las células tumorales sometidas a radiaciones ionizantes en cultivos individuales, posterior a lo cual, la proteína saldría del núcleo para ser degradada. Este hallazgo se correlaciona con la mayor captación de glucosa en las células irradiadas de HT29 en el cultivo individual.

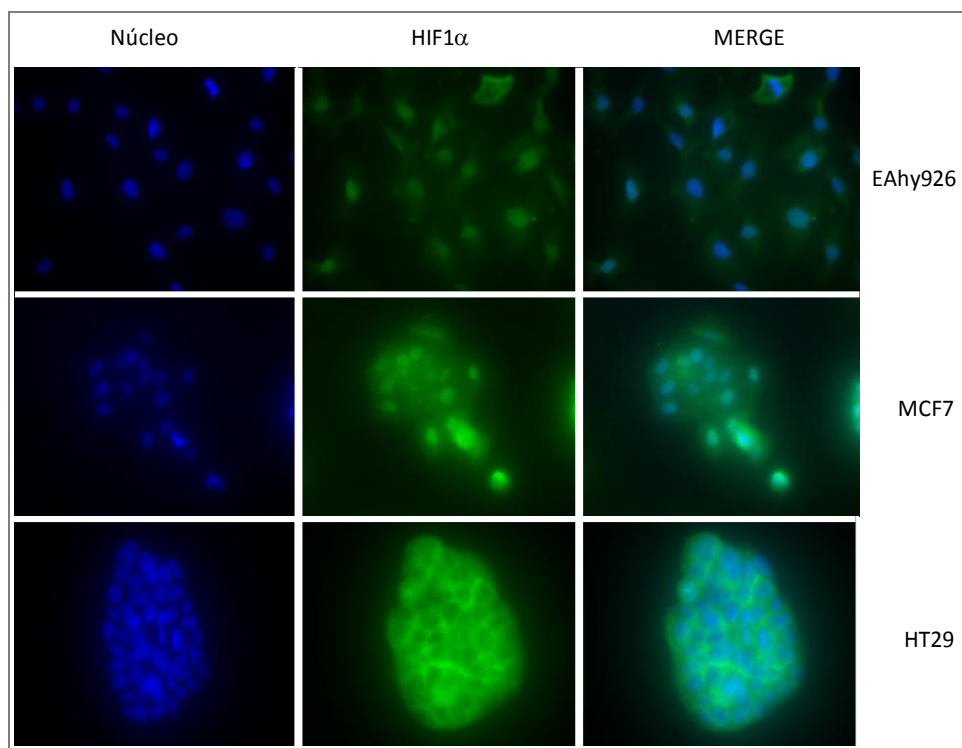
Sin embargo, no se puede establecer una relación directa entre la translocación nuclear de la proteína y la captación de glucosa de las células estudiadas, tanto en cultivos individuales, como en cocultivos. Como observación general se encontró que en la mayoría de las condiciones (tanto en cocultivo como cultivo aislado), cuando había un mayor consumo de glucosa, hubo una menor cantidad de proteína nuclear.

4.11 Translocación nuclear de HIF1 α en cultivos individuales y en cocultivos de EAhy926, MCF7 y HT29

El papel de HIF1 en la regulación de la glucólisis en células expuestas a hipoxia es fundamental y bien conocido. Como se ha venido mencionando, HIF1 favorece la expresión de transportadores de glucosa y enzimas glucolíticas en respuesta a la hipoxia (W. Liu et al. 2012) (J. Kim et al. 2007). Esta proteína tiene una relación directa con el metabolismo glucolítico y el efecto Warburg descrito para las células tumorales. Además se ha encontrado relacionada con NRF2 ya que dicha proteína regula la expresión del gen *ho-1* que codifica para la proteína hemoxigenasa, principal enzima catalizadora del grupo hemo. De esta degradación, se obtienen 3 productos, la biliverdina, hierro y monóxido de carbono (CO). Se ha encontrado que a través de la regulación de esta enzima, NRF2 regula la activación de HIF1, permitiendo la estabilización de HIF1 α (T. Kim et al. 2011).

Por estas razones, se decidió evaluar la translocación nuclear de la proteína HIF1 α en cultivos (Figura 4-39) y cocultivos celulares (Figura 4-44).

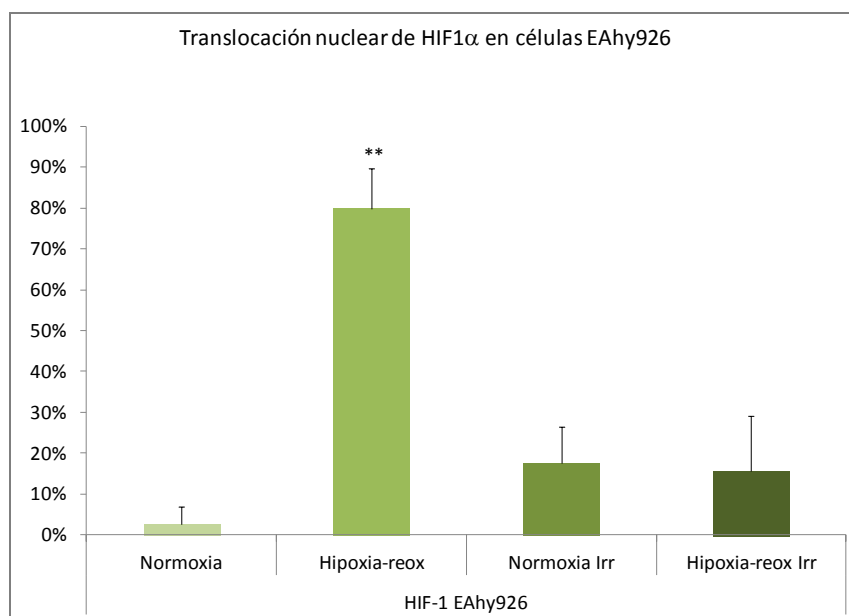
Figura 4-40: Translocación nuclear de HIF1 α en células EAhy926, MCF7 y HT29 cultivadas en hipoxia-reoxigenación.



La evaluación de la localización nuclear de la proteína se hizo en cultivos individuales y posteriormente se evaluó la modificación de estos hallazgos en cocultivos, como se hizo para los demás ensayos.

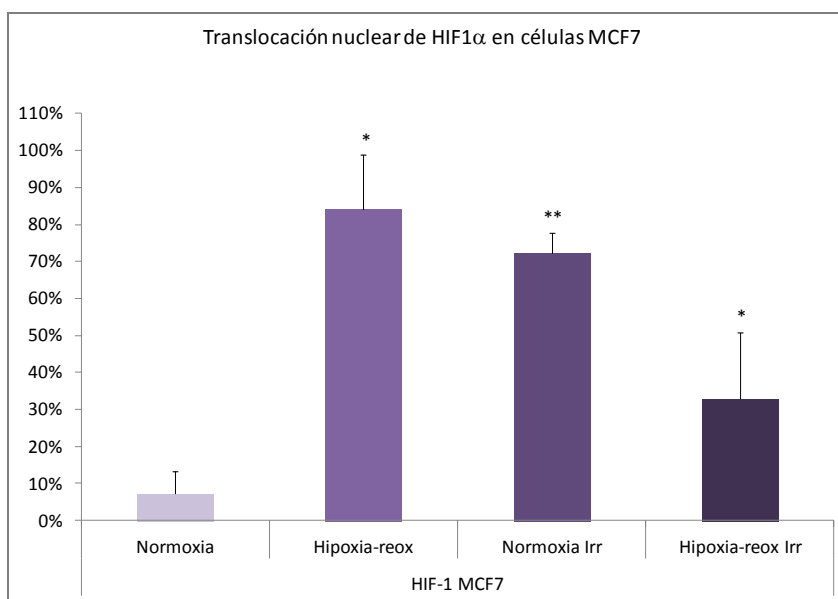
En las células endoteliales, se presentó un incremento significativo ($p: 0.000$) de la translocación nuclear de HIF1 α en hipoxia-reoxigenación. Al someter las células cultivadas en normoxia a radiaciones ionizantes, también hubo un incremento significativo de la translocación nuclear de la proteína ($p: 0,033$). A pesar de que en hipoxia-reoxigenación también hay un aumento en la translocación nuclear, este no fue significativo (Figura 4-41). La mayor captación de sonda de glucosa para esta línea en cultivo individual se encontró en las células cultivadas en normoxia. En esta condición la translocación nuclear de la proteína fue muy baja.

Figura 4-41: Translocación nuclear de HIF1 α en células EAhy926 sometidas a normoxia, hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes. *: $p < 0.050$ normoxia como control. **: $p < 0.010$ normoxia como control.



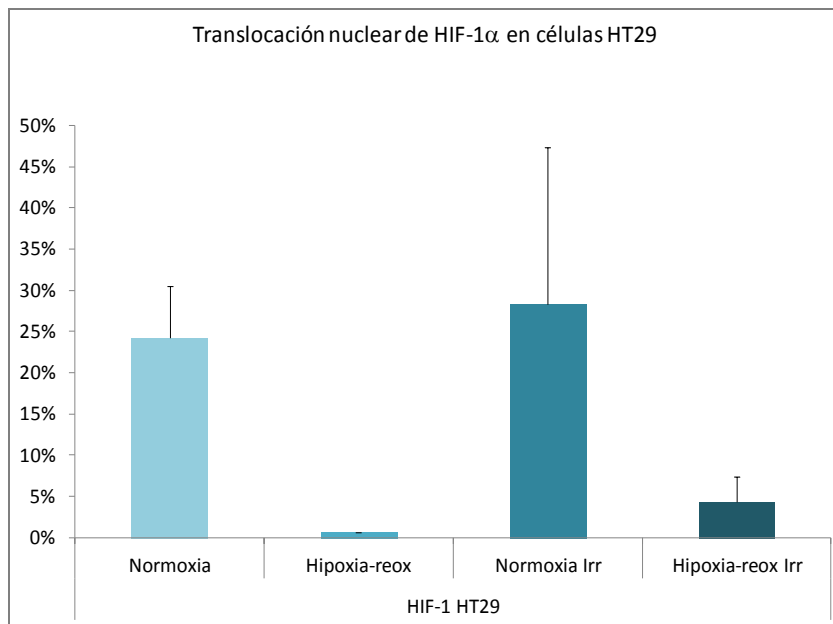
Las células MCF7 en cultivo aislado, también evidenciaron un incremento significativo en la translocación nuclear de esta proteína ($p: 0.020$) al ser sometidas a hipoxia reoxigenación. Igualmente, en normoxia e irradiación e hipoxia-reoxigenación e irradiación aumentó de forma significativa la translocación nuclear de HIF1 α ($p: 0.000$ y $p: 0.025$ respectivamente) (Figura 4-42). En esta línea celular la captación de 2-NBDG no mostró cambios significativos entre una y otra condición, sin embargo, las condiciones en que hubo una mayor captación fueron al exponer las células a radiaciones ionizantes. La translocación nuclear de la proteína fue mayor en relación con la translocación encontrada en normoxia. Sin embargo fue mayor para aquellas irradiadas en normoxia.

Figura 4-42: Translocación nuclear de HIF1 α en células MCF7 sometidas a normoxia, hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes. *: $p < 0.050$ normoxia como control. **: $p < 0.010$ normoxia como control.



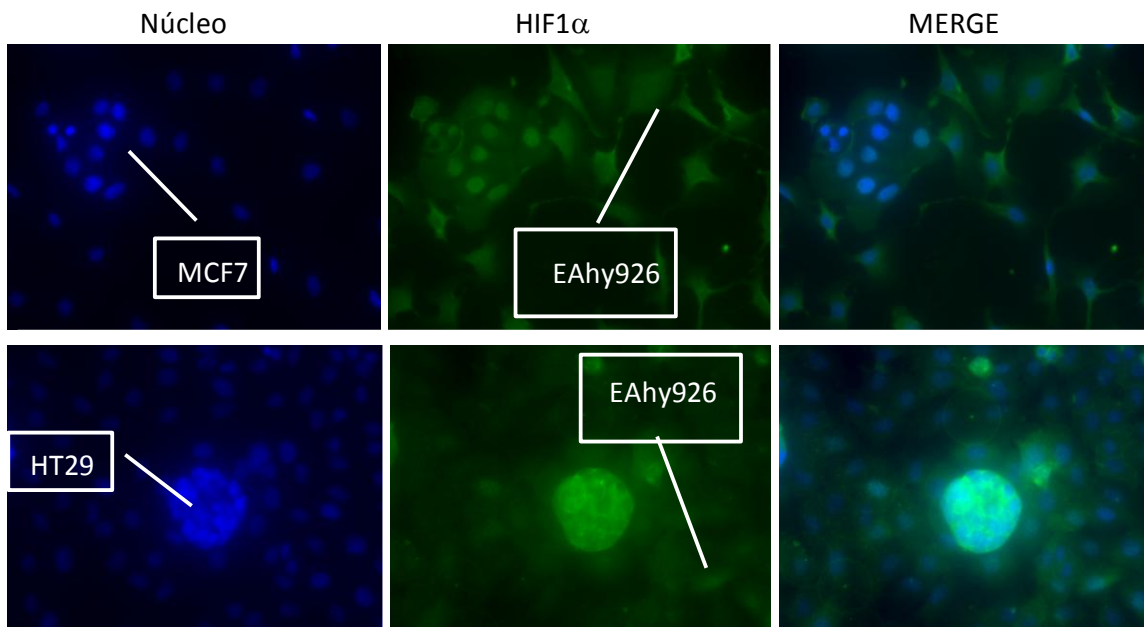
En el cultivo de línea tumoral de colon, se encontró que en normoxia y en normoxia e irradiación, hay un porcentaje de proteína que es translocada al núcleo celular (25 y 28%) el cual disminuye en hipoxia-reoxigenación a un 1% y en hipoxia-reoxigenación e irradiación a un 4%. Sin embargo, estas variaciones, no fueron significativas (p : 0.072 y 0.946) (Figura 4-43). En este cultivo celular, la mayor captación de sonda se dio al someter las células a radiaciones ionizantes. Sin embargo, en normoxia irradiación, la translocación nuclear de la proteína fue mayor que para normoxia y en hipoxia-reoxigenación e irradiación, dicha translocación fue muy inferior.

Figura 4-43: Translocación nuclear de HIF1 α en células HT29 sometidas a normoxia, hipoxia-reoxigenación y radiaciones ionizantes.



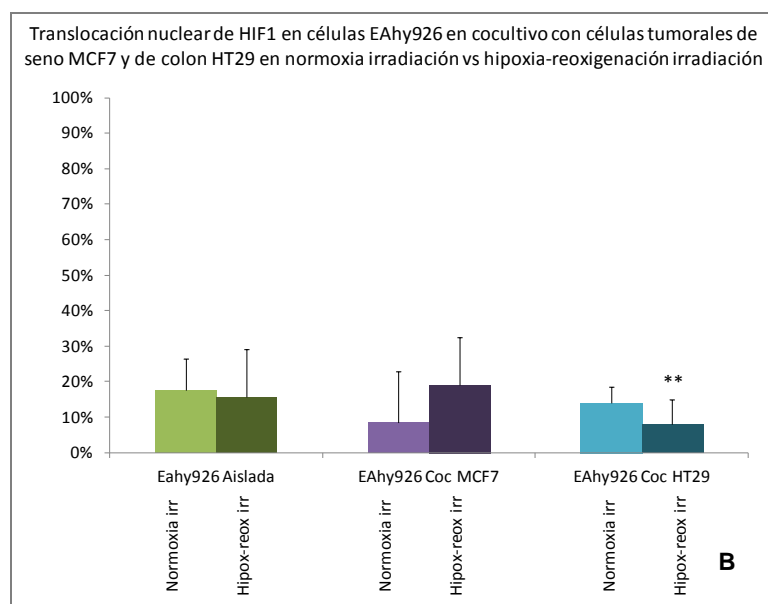
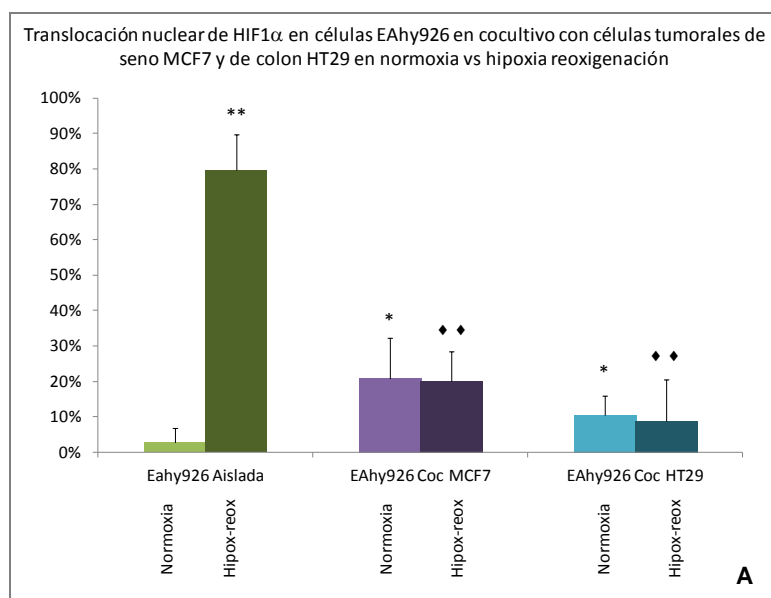
Los hallazgos en la translocación nuclear de este factor de transcripción fueron diferentes cuando las células fueron evaluadas en cocultivo (figura 4-44).

Figura 4-44: Inmunocitoquímica para HIF1 α en cocultivos de EAhy926 con MCF7 (Arriba) y EAhy926 con HT29 (Abajo).



En el caso de las células endoteliales, se encontró que al ser cocultivadas con células tumorales en normoxia, se presenta un incremento significativo en la translocación nuclear de la proteína, pasando de un 1% en el cultivo aislado a un 21% (p : 0.032) en el cocultivo con MCF7 y a un 16% (p : 0.050), en el cocultivo con HT29 (Figura 4-45A). Sin embargo, al ser sometidas a condiciones de hipoxia-reoxigenación en ambos cocultivos, las células endoteliales mostraron una disminución significativa en la translocación nuclear de HIF1 α (p : 0.000, en ambos casos) (Figura 4-45B). Dentro de cada cocultivo, no se encontraron diferencias significativas en la translocación de la proteína comparando normoxia e hipoxia-reoxigenación.

Figura 4-45: Translocación nuclear de HIF1 α en células EAhy926 en cocultivo con MCF7 y HT29. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación *: p < 0.050 normoxia aislada como control. **: p < 0.010 normoxia aislada como control. ♦♦: p < 0.010 hipoxia-reoxigenación aislada como control. B. En normoxia irradiación e hipoxia-reoxigenación irradiación. **: p < 0.010 EAhy 926 en cocultivo con HT29 en hipoxia-reoxigenación como control.



A pesar de lo observado en estas condiciones, al ser sometidas a radiaciones ionizantes, no hubo cambios significativos en el porcentaje de proteína translocada, ni en normoxia, ni en hipoxia-reoxigenación en comparación con el cultivo aislado. Se encontró que en el cocultivo con HT29, hay un incremento significativo en la translocación de este factor en hipoxia-reoxigenación irradiado, al ser comparado con normoxia e irradiación.

También se evaluaron los cambios al someter las células a las mismas condiciones de oxigenación (normoxia o hipoxia-reoxigenación) sin irradiar e irradiadas.

En ninguno de los cocultivos con células tumorales se observaron cambios significativos ni en normoxia, ni en hipoxia-reoxigenación, irradiadas.

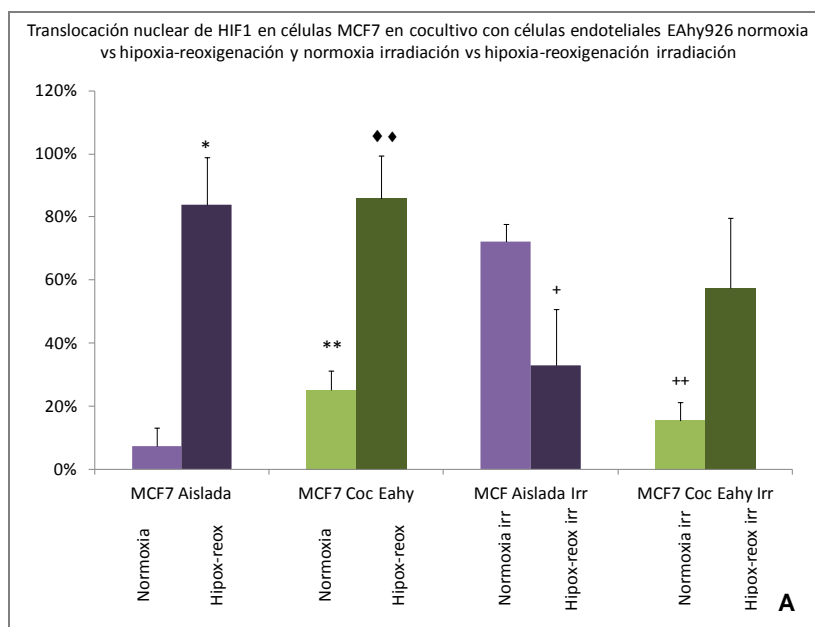
Al evaluar las células MCF7 en cocultivo con la línea endotelial, se evidenció un incremento significativo en la translocación nuclear de HIF1 α en normoxia, en comparación con el cultivo aislado (p: 0.001). También se observó que las células MCF7 en cocultivo con EAhy926, tenían un incremento significativo en la translocación nuclear de la proteína (p: 0.000), al comparar normoxia e hipoxia-reoxigenación dentro del cocultivo. Al someter las células tumorales de seno a radiaciones ionizantes en cultivo aislado, se observa una disminución de la translocación de la proteína en hipoxia-reoxigenación en el cultivo aislado en comparación con normoxia irradiación. Este comportamiento fue modificado al ser cocultivadas con EAhy926. Se observó un efecto contrario, presentándose una mayor translocación nuclear de la proteína en hipoxia-reoxigenación e irradiación (57%), respecto a la observada en normoxia irradiación (15%). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa (Figura 4-46 A).

Comparando las células irradiadas y no irradiadas, cultivadas en las mismas condiciones de oxigenación, se encontró una disminución significativa de la translocación del HIF1 α en normoxia irradiación en las células MCF7 en cocultivo con endotelio (p: 0.041) respecto a las cultivadas de forma aislada. Finalmente, al comparar las células tumorales de seno cocultivadas con EAhy926 en hipoxia-reoxigenación con aquellas irradiadas, bajo la misma condición de oxigenación, hubo una disminución significativa de la translocación en esta última condición (p: 0.001) dentro del cocultivo (Figura 4-46B).

Para las células tumorales de colon se encontró una disminución significativa de la translocación nuclear de HIF1 α en hipoxia-reoxigenación en cocultivo con células

endoteliales, en comparación con las células en cultivo aislado ($p: 0.039$) (Figura 4-47). No se encontraron otras diferencias significativas en las demás condiciones estudiadas, ni en cultivo aislado, como ya se describió, ni en cocultivo con células EAhy926. Se observó en general una translocación de HIF1 α inferior al 30% en todas las condiciones de estrés, tanto en cocultivo, como en cultivo aislado.

Figura 4-46: Translocación nuclear de HIF1 α en células MCF7 en cocultivo con EAhy926. A. En normoxia e hipoxia-reoxigenación. *: $p < 0.050$ normoxia aislada como control. **: $p < 0.010$ normoxia aislada como control. ♦♦: Normoxia en cocultivo como control. +: $p < 0.050$ normoxia irradiación aislada como control. ++: $p < 0.010$ normoxia irradiación aislada como control. B. En normoxia e hipoxia-reoxigenación en comparación con cocultivos en irradiación. *: $p < 0.050$. Normoxia aislada como control. **: $p < 0.010$ normoxia aislada como control. ♦: $p < 0.050$ normoxia en cocultivo como control. ++: $p < 0.010$ normoxia irradiación aislada como control. ▽▽: $p < 0.010$ hipoxia-reoxigenación en cocultivo como control.



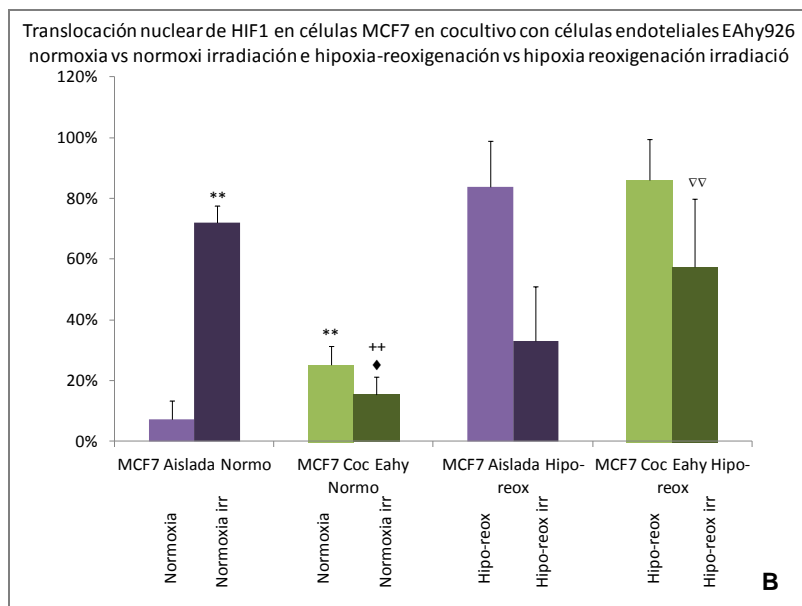
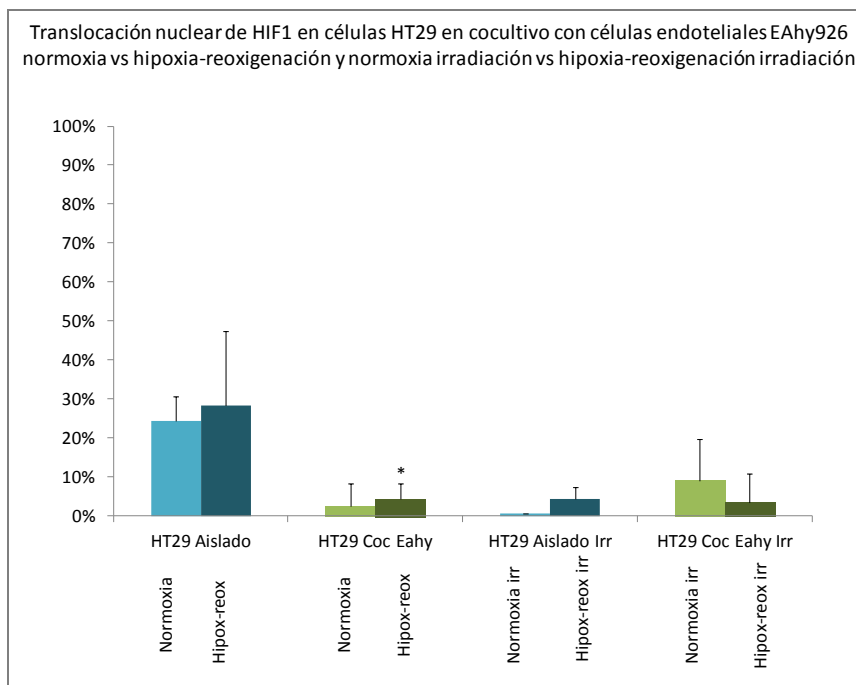


Figura 4-47: Translocación nuclear de HIF1 α en células HT29 en cocultivo con EAhy926 en normoxia e hipoxia-reoxigenación. *: $p < 0.050$ hipoxia-reoxigenación aislado como control.



Como se mencionó, la estabilización de HIF1 α , su activación y translocación al núcleo permiten la regulación de genes relacionados con proliferación celular, angiogénesis, regulación del metabolismo de la glucosa, regulación del pH celular, entre otros (Ke & Costa 2006) (J. Kim et al. 2007) (Bertout et al. 2008).

En nuestro estudio, se observó una translocación nuclear de la proteína en mención en las células endoteliales al ser sometidas a condiciones de hipoxia-reoxigenación, condición en la que se estabiliza la proteína. Sin embargo, al ser sometidas a cocultivo, la translocación de la proteína disminuye de forma significativa en condiciones de hipoxia-reoxigenación en las células endoteliales cuando se cocultivan con ambas líneas tumorales.

En las células tumorales de seno en cultivo aislado, hubo un aumento significativo de la presencia de la proteína en el núcleo celular en todas las condiciones de estrés, hipoxia-reoxigenación, normoxia irradiación e hipoxia-reoxigenación e irradiación (en comparación con normoxia). Al ser sometidas a cocultivo, el comportamiento en la translocación de la proteína es igual en condiciones de normoxia e hipoxia-reoxigenación, pero al ser sometidas a radiaciones ionizantes, se evidenció un comportamiento inverso al observado para el cultivo individual (en irradiación, hubo una disminución de la proteína nuclear en hipoxia reoxigenación). Para esta línea celular, la captación de glucosa, está relacionada con la translocación nuclear de HIF1 α , pues en los cultivos aislados, en que hay translocación de la proteína, la captación de glucosa es homogénea. En los cocultivos, el incremento en la captación de sonda de glucosa, se asocia con un incremento de la cantidad de proteína nuclear.

Para el caso de la línea tumoral de colon, se observó una disminución no significativa de la presencia de la proteína en el núcleo celular en condiciones de hipoxia-reoxigenación e hipoxia reoxigenación irradiación. El comportamiento en la translocación de esta proteína en las células HT29 no fue modificado al ser cocultivadas con células endoteliales.

Esto podría ser explicado teniendo en cuenta que la exposición a la radiación genera en las células un fenómeno de reoxigenación. Estudios previos han demostrado que la proteína HIF1 α es activada por la exposición a la radiación, pero dicha activación no es inmediata. Se ha establecido que la activación de dicha proteína se da horas, e incluso

días posterior a la irradiación, lo cual explicaría por qué para la línea tumoral HT29 no se evidencia proteína en el núcleo celular (Dewhirst et al. 2007) (B. J. Moeller et al. 2004). Existen otros mecanismos relacionados con la actividad glucolítico tumoral como la vía PI3k/AktmTOR, que podrían explicar el comportamiento glucolítico de esta línea celular. Esta vía de señalización favorece la expresión de transportadores membranales de nutrientes como la glucosa y los aminoácidos. Así mismo, se ha demostrado que a través de efectos en la expresión génica y actividad enzimática, Akt aumenta la glicólisis y la producción de lactato al punto de inducir un efecto Warburg en células tumorales que no tienen este fenotipo metabólico (Cairns et al. 2011).

Finalmente, se debe tener en cuenta que la translocación nuclear de la proteína por el método de Inmunocitoquímica, no demuestra que este uniéndose a su blanco en el DNA. Sin embargo, si brinda información sobre la presencia de la proteína en la célula y su estabilidad bajo ciertas condiciones.

5. Conclusiones y perspectivas

5.1 Conclusiones

Los resultados de este trabajo demuestran que el comportamiento celular *in vitro* de las células sometidas a hipoxia-reoxigenación es diferente al reportado para las células expuestas únicamente a hipoxia.

Las células endoteliales y tumorales sometidas a radiaciones ionizantes en hipoxia-reoxigenación, tuvieron una menor supervivencia que las células cultivadas en normoxia.

La captación de glucosa en células tumorales de seno y de colon es diferente cuando estas células son cocultivadas con una línea endotelial. Se encontraron diferencias en la captación de la sonda de glucosa en células en cultivo aislado, tanto EAhy926 como MCF7 y HT29. En condiciones de normoxia e hipoxia-reoxigenación, la captación de la sonda de glucosa fue más o menos homogénea para las tres líneas estudiadas. Sin embargo, al ser sometidas a radiaciones ionizantes sí hubo diferencias entre cada línea evaluada.

La interacción en cultivo con otras células modificó el comportamiento metabólico de la célula, evidenciado por cambios en la captación de glucosa. Así mismo, se pudieron identificar subpoblaciones celulares que sugieren un metabolismo simbiótico de las células tumorales.

En cuanto a los ensayos con proteínas, se pudo observar que una menor expresión de NRF2 coincide con las condiciones en que las células mostraron una mayor captación de la glucosa. En las células tumorales MCF7 y HT29, la expresión de la proteína fue menor para las condiciones de mayor estrés celular.

El comportamiento observado para la translocación nuclear de las proteínas NRF2 y HIF1 α sugiere que existe una translocación prematura y posterior degradación de las proteínas bajo ciertas condiciones. Sin embargo, no se puede descartar la activación de otras vías metabólicas que regulen la glucólisis, como en el caso de las células HT29.

Finalmente, los cambios observados en el comportamiento metabólico, dado por las variaciones en la captación de la sonda de glucosa y la localización subcelular de las proteínas, demuestra que el cocultivo es un buen método para lograr un mayor acercamiento al estudio del microambiente tumoral *in vitro*.

5.2 Perspectivas

El presente trabajo fue un acercamiento inicial al estudio del comportamiento metabólico de la célula tumoral en cocultivo.

Se pretende ampliar el estudio a otras líneas tumorales, así como comparar los resultados obtenidos en este ensayo, con condiciones de hipoxia únicamente. Además, se esperan hacer observaciones modificando los tiempos de hipoxia-reoxigenación y utilizar un modelo de hipoxia cíclica.

La captación de glucosa evaluada con una sonda fluorescente ofreció resultados satisfactorios. Sin embargo, una de las herramientas de diagnóstico y planeación de radioterapia más utilizada es el PET, por lo cual se espera lograr hacer estudios de cocultivos con ¹⁸F¹⁸FDG y PET y comparar los resultados con lo obtenido en este estudio.

La presencia de subpoblaciones celulares que sugieren simbiosis metabólica debe ser evaluada buscando la presencia de MCTs en la membrana celular.

Finalmente, para obtener datos más robustos en cuanto a la expresión y activación de las proteínas NRF2 y HIF1 α , se realizarán ensayos de expresión génica con vectores acoplados a luciferasa que permitan identificar la interacción de cada una de las proteínas con sus blancos en el DNA.

Bibliografía

- Allen, M. & Louise Jones, J., 2011. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *The Journal of pathology*, 223(2), pp.162–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21125673> [Accessed July 26, 2012].
- Aristophanous, M. et al., 2012. Clinical utility of 4D FDG-PET/CT scans in radiation treatment planning. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 82(1), pp.e99–105. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377285> [Accessed October 13, 2012].
- Arvold, N.D. et al., 2005. Hypoxia-induced radioresistance is independent of hypoxia-inducible factor-1A in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 62(1), pp.207–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15850923> [Accessed August 15, 2012].
- Barton, M.B., Frommer, M. & Shafiq, J., 2006. Role of radiotherapy in cancer control in low-income and middle-income countries. *The lancet oncology*, 7(7), pp.584–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814210>.
- Bertout, J. a, Patel, S. a & Simon, M.C., 2008. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature reviews. Cancer*, 8(12), pp.967–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3140692&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J. & Pouyssegur, J., 2007a. Hypoxia and cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 85(12), pp.1301–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18026916> [Accessed July 19, 2012].
- Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J. & Pouyssegur, J., 2007b. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current opinion in cell biology*, 19(2), pp.223–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303407> [Accessed July 19, 2012].
- Busk, M. et al., 2008. Cellular uptake of PET tracers of glucose metabolism and hypoxia and their linkage. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 35(12), pp.2294–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682937> [Accessed October 13, 2012].
- Cairns, R. a, Harris, I.S. & Mak, T.W., 2011. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer*, 11(2), pp.85–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21258394> [Accessed July 13, 2012].
- Christian, N. et al., 2010. Is (18)F-FDG a surrogate tracer to measure tumor hypoxia? Comparison with the hypoxic tracer (14)C-EF3 in animal tumor models. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 97(2), pp.183–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304513> [Accessed October 13, 2012].

- Dewhirst, M.W. et al., 2007. Exploring the role of HIF-1 in early angiogenesis and response to radiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 83(3), pp.249–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 15, 2012].
- Dewhirst, M.W., 2009. Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress. *Radiation research*, 172(6), pp.653–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2790140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 21, 2012].
- Dewhirst, M.W., Cao, Y. & Moeller, B., 2008. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature reviews. Cancer*, 8(6), pp.425–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18500244> [Accessed July 19, 2012].
- Edited By Celis, J.E., 2006. *CELL BIOLOGY A LABORATORY HANDBOOK* 3rd ed. J. E. Celis, ed., ELSEVIER.
- Farmer, P. et al., 2010. Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action. *Lancet*, 376(9747), pp.1186–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709386> [Accessed October 8, 2012].
- Gatenby, R. a & Gillies, R.J., 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews. Cancer*, 4(11), pp.891–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516961> [Accessed July 13, 2012].
- Goldberg, M.A., Dunning, S.P. & Bunn, H.F., 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science (New York, N. Y.)*, 242(4884), pp.1412–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2849206> [Accessed October 14, 2012].
- Gregoire, V. & Chiti, A., 2010. PET in radiotherapy planning: particularly exquisite test or pending and experimental tool? *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 96(3), pp.275–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708810> [Accessed October 13, 2012].
- Halestrap, A.P. & Price, N.T., 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *The Biochemical journal*, 343 Pt 2, pp.281–99. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067497800683> [Accessed October 25, 2012].
- Hall D.Phil, Eric J. Giaccia, A.J., 2006. *Radiobiology for the Radiologist* 6th ed., Lippincott Williams & Wilkins.

- Hanahan, D & Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), pp.353–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756718>.
- Hanahan, Douglas & Weinberg, R. a, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> [Accessed July 12, 2012].
- Hanahan, Douglas & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> [Accessed October 4, 2012].
- Hassanein, M. et al., 2011. Development of high-throughput quantitative assays for glucose uptake in cancer cell lines. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 13(5), pp.840–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20809209> [Accessed September 17, 2012].
- Instituto Nacional de Cancerología, I., 2010. Mortalidad Nacional por tipo de Cáncer. Available at: <http://www.cancer.gov.co/documentos/Mortalidad/Mor>.
- Ke, Q. & Costa, M., 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology*, 70(5), pp.1469–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887934> [Accessed October 29, 2012].
- Kim, J., Gao, P. & Dang, C.V., 2007. Effects of hypoxia on tumor metabolism. *Cancer metastasis reviews*, 26(2), pp.291–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17415528> [Accessed October 15, 2012].
- Kim, T., Hur, E. & Kang, S., 2011. NRF2 Blockade Suppresses Colon Tumor Angiogenesis by Inhibiting Hypoxia-Induced Activation of HIF-1 α . , pp.2260–2275.
- Kizaka-Kondoh, S. et al., 2009. The HIF-1-active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 61(7-8), pp.623–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19409433> [Accessed October 15, 2012].
- Korreman, S. et al., 2010. The European Society of Therapeutic Radiology and Oncology-European Institute of Radiotherapy (ESTRO-EIR) report on 3D CT-based in-room image guidance systems: a practical and technical review and guide. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 94(2), pp.129–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153908> [Accessed October 9, 2012].
- Kurien, B.T. & Scofield, R.H., 2006. Western blotting. *Methods (San Diego, Calif.)*, 38(4), pp.283–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16483794> [Accessed July 19, 2012].

- Lau, A. et al., 2008. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 58(5-6), pp.262–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2652397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 10, 2012].
- Lee, S. et al., 2012. An effective strategy for increasing the radiosensitivity of Human lung Cancer cells by blocking Nrf2-dependent antioxidant responses. *Free radical biology & medicine*, 53(4), pp.807–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22684019> [Accessed October 15, 2012].
- Liu, W. et al., 2012. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 3(2), pp.165–78. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3388736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Magesh, S., Chen, Y. & Hu, L., 2012. Small Molecule Modulators of Keap1-Nrf2-ARE Pathway as Potential Preventive and Therapeutic Agents *. , (4), pp.687–726.
- Marín-Hernández, A. et al., 2011. Modeling cancer glycolysis. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(6), pp.755–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21110941> [Accessed August 15, 2012].
- McDonald, J.T. et al., 2010. Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer research*, 70(21), pp.8886–95. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2970706&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2012].
- Ministerio de la Protección Social, M.P.S. & Instituto Nacional de Cancerología, I., 2010. Plan nacional para el control del cáncer en Colombia 2010 - 2019. Available at: <http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?conID=1061&catID=1> [Accessed July 15, 2012].
- Moeller, B.J. et al., 2004. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer cell*, 5(5), pp.429–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144951>.
- Moi, P. et al., 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21), pp.9926–30. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=44930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Morgan, W.F. & Sowa, M.B., 2007. Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutation research*, 616(1-2), pp.159–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17134726> [Accessed August 15, 2012].

- Munshi, A., Hobbs, M. & Meyn, R.E., 2005. Clonogenic cell survival assay. *Methods in molecular medicine*, 110, pp.21–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15901923> [Accessed July 24, 2012].
- Nakajima, E.C. & Van Houten, B., 2012. Metabolic symbiosis in cancer: Refocusing the Warburg lens. *Molecular carcinogenesis*, (November), pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228080> [Accessed July 30, 2012].
- Organización Mundial de la Salud, O., 2009. CENTRO DE PRENSA. CÁNCER, DATOS Y CIFRAS. , p.<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es>. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es> [Accessed July 15, 2012].
- Osburn, W.O. & Kensler, T.W., 2008. Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults. *Mutation research*, 659(1-2), pp.31–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2585047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 15, 2012].
- O’Neil, R.G., Wu, L. & Mullani, N., 2005. Uptake of a fluorescent deoxyglucose analog (2-NBDG) in tumor cells. *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 7(6), pp.388–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284704> [Accessed September 17, 2012].
- Park, J.E. et al., 2010. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 9(6), pp.1085–99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2877972&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 24, 2012].
- Quintero, P., 2012. *Estudio in vitro de la supervivencia en células tumorales irradiadas con un acelerador lineal de uso clínico*. Universidad Nacional de Colombia.
- Rzeszowska-Wolny, J., Przybyszewski, W.M. & Widel, M., 2009. Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy. *European journal of pharmacology*, 625(1-3), pp.156–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835860> [Accessed August 15, 2012].
- Rødningen, O.K. et al., 2005. Microarray analysis of the transcriptional response to single or multiple doses of ionizing radiation in human subcutaneous fibroblasts. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 77(3), pp.231–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16297999> [Accessed August 15, 2012].
- Salud, O.M. de la, GLOBOCAN Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008. , p.<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>.

- Sattler, B. et al., 2010. PET/CT (and CT) instrumentation, image reconstruction and data transfer for radiotherapy planning. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 96(3), pp.288–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709416> [Accessed October 13, 2012].
- Semenza, G.L. et al., 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), pp.5680–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=51941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 14, 2012].
- Semenza, G.L., 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(10), pp.721–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13130303> [Accessed October 5, 2012].
- Sonveaux, P. et al., Targeting lactate-fueled respiration as a new antitumor strategy. , (12), pp.13–16.
- Sonveaux, P. et al., 2008. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(12), pp.3930–42. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2582933&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 11, 2012].
- Tsukimoto, M. et al., 2010. Low-Dose Gamma-Ray Irradiation Induces Translocation of Nrf2 Into Nuclear in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells. *Journal of Radiation Research*, 51(3), pp.349–353. Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jrr/10002?from=CrossRef> [Accessed August 23, 2012].
- Vaupel, P. & Mayer, A., 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews*, 26(2), pp.225–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17440684> [Accessed July 14, 2012].
- Vogin, G., 2011. [Radiosensitivity, radiocurability and DNA repair]. *Cancer radiothérapie : journal de la Société française de radiothérapie oncologique*, 15(4), pp.294–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334945> [Accessed October 8, 2012].
- Weizmann Institute of Science, W., 2012. Gene Cards. The Human Gene Compendium. Available at: <http://www.genecards.org> [Accessed June 24, 2012].
- Wu, Q. et al., 2011. Bystander effect in human hepatoma HepG2 cells caused by medium transfers at different times after high-LET carbon ion irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 269(2), pp.153–158. Available at:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168583X10007950> [Accessed August 15, 2012].

Xu, X. et al., 2008. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer. *Cancer letters*, 261(2), pp.147–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171602> [Accessed August 15, 2012].

Zaider, M. & Hanin, L., 2011. Tumor control probability in radiation treatment. *Medical Physics*, 38(2), p.574. Available at: <http://link.aip.org/link/MPHYA6/v38/i2/p574/s1&Agg=doi> [Accessed October 9, 2012].