



# **Universidad del Rosario**

**Escuela de Medicina y Ciencias de Salud  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biológicas**

## **Tratamiento antitumoral basado en la expresión de la proteína NIS: Análisis del microambiente tumoral en un modelo *in vitro*.**

**Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias  
Biomédicas y Biológicas**

**Fabio Castillo Rivera**

**Director**

**Thierry Pourcher**

**Universidad de Niza Sophia Antipolis-Francia**

**Codirector**

**Alejandro Oyono Ondo Méndez**

**Universidad del Rosario-Colombia**

**Bogotá-Colombia**

**Agosto, 2020**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Quiero dar mis más sinceros agradecimientos a:**

La universidad del Rosario por la beca otorgada para adelantar los estudios de doctorado y a todos los docentes del Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas y Biológicas de esta Universidad por contribuir en mi formación.

A ECOS-Nord/Colciencias/Icetex por el apoyo económico para las pasantías que se realizaron a la Universidad de Niza-Francia.

A todos los integrantes del Grupo de investigación TIRO de la Universidad de Niza-Francia y en especial al su director el Doctor Thierry Pourcher por haberme acogido en su laboratorio y por brindarme su apoyo y guía en el desarrollo de este doctorado.

A todos los integrantes de la Unidad de Bioquímica de la Universidad del Rosario y en especial al doctor Alejandro Oyono Ondo Méndez, por todo el apoyo recibido durante el desarrollo de este doctorado.

A mi familia, especialmente a mi esposa e hija por el apoyo emocional brindado en todo momento y que me permitió finalizar el doctorado.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>GLOSARIO</b> .....	7
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	11
<b>Resumen</b> .....	13
<b>Summary</b> .....	15
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
<b>2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO</b> .....	21
2.1. EL CO-TRANSPORTADOR SODIO/YODURO (NIS) .....	21
2.2. NIS Y RADIOTERAPIA METABÓLICA .....	22
2.3. MICROAMBIENTE TUMORAL .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	35
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	36
<b>5. CAPÍTULO I: EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA HETEROGENEIDAD CELULAR (CÉLULAS EN ESTADO PROLIFERATIVO O QUIESCENTE) SOBRE LA EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA NIS.</b> .....	37
5.1. OBJETIVO .....	37
5.2. METODOLOGÍA .....	37
5.2.1. Cultivo celular .....	38
5.2.2. Células proliferativas y quiescentes .....	38
5.2.3. Inducción de hipoxia .....	39

5.2.4. Ensayos de viabilidad celular .....	39
5.2.5. Análisis de la expresión de la proteína NIS .....	39
5.2.6. Captación de yoduro por la proteína NIS.....	40
5.2.7. Localización subcelular de la proteína NIS .....	41
5.3. RESULTADOS .....	42
5.3.1. Establecimiento de las condiciones <i>in vitro</i> que imitan el microambiente tumoral.....	42
5.3.2. Determinación de la viabilidad celular en las condiciones establecidas .....	42
5.3.3. Efecto de la heterogeneidad celular y la hipoxia en la expresión de la proteína NIS.....	43
5.3.4. Efecto de la heterogeneidad celular y la hipoxia en la actividad captadora de yoduro de la proteína NIS.....	44
5.3.5. Efecto de la heterogeneidad celular y la hipoxia en la localización subcelular de la proteína NIS .....	46
5.4. DISCUSIÓN RESULTADOS.....	47
<b>6. CAPÍTULO II: CAMBIOS EN EL METABOLISMO GLUCOLÍTICO EN EL MODELO IN VITRO INDUCIDOS POR LA HETEROGENEIDAD CELULAR Y LA HIPOXIA.....</b>	<b>50</b>
6.1. OBJETIVO.....	50
6.2. METODOLOGÍA.....	50
6.2.1. Captación de glucosa y potencial redox citosólico.....	50
6.2.1.1. Preparación de las células quiescentes .....	52
6.2.1.2. Preparación de las células proliferantes .....	52
6.2.1.3. Captación de glucosa y potencial redox citosólico en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia ....	53
6.2.2. Expresión de proteínas asociadas al metabolismo glucolítico .....	54
6.2.3. Expresión de los mRNAs de genes asociadas al metabolismo glucolítico .....	55

6.3. RESULTADOS .....	56
6.3.1. Cambios en la expresión de GLUT1 .....	56
6.3.2. Cambios en la expresión de PKM2 .....	58
6.3.3. Cambios en la expresión de LDHA.....	60
6.3.4. Captación de glucosa.....	61
6.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	63
<b>7. CAPITULO III: CAMBIOS EN EL POTENCIAL REDOX ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DE NIS Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN CON EL METABOLISMO GLUCOLÍTICO..</b> .....	<b>67</b>
7.1. OBJETIVO.....	67
7.2. METODOLOGÍA.....	67
7.2.1 Ensayo de detección del potencial redox citosólico .....	68
7.2.2. El nivel de expresión Nrf2.....	68
7.2.3. Determinación de la activación de HIF-1 $\alpha$ .....	68
7.3. RESULTADOS .....	69
7.3.1. Potencial redox citosólico y su asociación con cambios en el metabolismo glucolítico y la expresión de NIS .....	69
7.3.2. Efecto de N-acetilcisteína (NAC) y yoduro de sodio (NaI) en la Captación de glucosa y en el potencial redox citosólico.....	71
7.3.3. Expresión de Nrf2.....	73
7.3.4. Activación de HIF-1 $\alpha$ en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en condiciones de normoxia e hipoxia.....	74
7.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	76
<b>8. CAPITULO IV: CAMBIOS METABÓLICOS PRODUCIDOS EN LAS CÉLULAS HT29WT DESPUÉS DE LA TRANSFECCIÓN CON EL GEN DE LA PROTEÍNA NIS.....</b>	<b>80</b>
8.1. OBJETIVOS .....	80
8.2. METODOLOGÍA.....	80

8.2.1. Análisis metabólico y proteómico mediante espectrometría de masas	81
8.2.1.1. Análisis metabólico	81
8.2.1.2. Análisis proteómico	83
8.3. RESULTADOS	88
8.3.1. Análisis proteómico del metabolismo glucolítico	88
8.3.2. Análisis proteómico del metabolismo oxidativo (ciclo de los ácidos tricarboxílicos-TCA)	89
8.3.3. Captación de glucosa y potencial redox citosólico	89
8.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	94
<b>9. CAPITULO V: EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA QUIESCENCIA SOBRE EL PROTEOMA Y METABOLOMA DE LAS CÉLULAS HT29NIS</b>	<b>99</b>
9.1. METODOLOGÍA	99
9.2 RESULTADOS	99
9.2.1. Análisis de las variaciones encontradas en el proteoma y metaboloma de células HT29NIS que expliquen la retención intracelular de la proteína NIS inducida por hipoxia y quiescencia	99
9.2.1.1. Análisis proteómico	99
9.2.1.2. Análisis metabólico	102
9.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	106
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>114</b>
<b>11. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES</b>	<b>115</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>116</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>132</b>
A. Cambio de pH extracelular en células HT29NIS y HT29WT en condiciones de normoxia e hipoxia	132

**B. Estructura del gen y la proteína NIS.....134**

## GLOSARIO

**AP:** Complejos de proteína adaptadoras a los cuales pertenecen AP-2 y AP-1 proteínas que median la endocytosis en la membrana plasmática y el tráfico mediado por clatrina desde la TGN a endosomas, respectivamente.

**Células proliferativas:** Células con una tasa normal de división celular.

**Células quiescentes:** Células en estado de reposo reversible no proliferativo.

**COPI:** Complejo de proteínas de cubierta vesicular (coatómero) responsable del transporte vesicular desde el AG y ERGIC y las devuelve al ER. Las vesículas COPI pueden transitar el camino de ida y vuelta al ER o pueden transportar proteínas a los compartimientos más proximales ( desde trans a Golgi medio, desde medio a cis-Golgi, desde cis-Golgi a ERGIC, y desde ERGIC a ER).

**COPII:** Complejo de proteínas de cubierta vesicular (coatómero) responsable del transporte vesicular desde el retículo endoplasmático rugoso (RER) hasta el AG.

**Gen reportero:** El gen de NIS puede funcionar como gen reportero, ya que, se puede hacer el seguimiento de células a través de radiotrazadores que emiten radiación gamma ( $^{99m}\text{Tc}$ ) que son captados por el transportador NIS.

**Gen terapéutico:** El gen de NIS puede también funcionar como gen terapéutico, cuando se usa para la eliminación de células tumorales mediante radiación beta emitida por algunos radioisotopos ( $^{131}\text{I}$ ) que son captados por el transportador NIS.

**Oncoproteína:** Proteína expresada por un gen mutado o por un virus, que interviene en el desarrollo del cáncer.

**Heterogeneidad celular:** este término hace referencia a la presencia de células en estado proliferativo o quiescente.

**MAIT:** Paquete R llamado Metabolite Automatic Identification Toolkit (MAIT). Usado para análisis de datos obtenidos por espectrometría de masas, puede generar gráficos estadísticos tales como mapas de calor, diagramas de cajas y gráficos de análisis de componentes principales.

**p115:** Proteína periférica de membrana presente en el compartimiento intermediario y vesículas del cis-Golgi que funcionan en el tráfico del ER a AG.

**p27:** Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) implicadas en la progresión del ciclo celular, que se sobreexpresa en células quiescentes.

**ReO<sub>4</sub><sup>-</sup>**: Ion perrenato

**Sar1, Sec23/24, y Sec13/31**: Son los minimos componentes proteicos requeridos para generar vesículas COPII *in vitro*.

**SLC**: Portadores de soluto (Solute Carrier) grupo de proteínas transportadoras de membrana, incluyen más de 400 miembros organizados en 6 familias.

**SPECT**: Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Simple (Single Photon Emission Computed Tomography) es una técnica no invasiva, confiable, segura, suministra datos cuantitativos e imágenes 3D de la biodistribución del radionúclidos, tiene alta sensibilidad y alta resolución con profunda penetración en el tejido.

**<sup>99m</sup>Tc**: Isómero nuclear metaestable del tecnecio-99.

**<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>**: Ion pertecnetato

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AG</b>	Aparato de Golgi
<b>BSA</b>	Albúmina Serica Bovina (Bovine Serum Albumin)
<b>CDKs</b>	Quinasas dependientes de ciclinas
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CSCs</b>	Células madre de cáncer (Cancer Stem Cells)
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's medium
<b>DPM</b>	Desintegraciones Por Minuto
<b>DTC</b>	Carcinoma diferenciado de tiroides (Differentiated Thyroid Cancer)
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>ECM</b>	Matriz extracelular (Extracellular Matrix)
<b>EE</b>	Endosomas tempranos (Early Endosomes)
<b>ER</b>	Retículo endoplasmático (Endoplasmic Reticulum)
<b>ERES</b>	Sitio de salida del retículo endoplásmico (ER Exit Sites)
<b>ERGIC</b>	Compartimiento intermediario de retículo endoplásmico al aparato de Golgi (ER-Golgi Intermediate Compartment)
<b>FBS</b>	Suero fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor inducido por hipoxia 1-alfa (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha)
<b>HT29NIS</b>	Línea celular de carcinoma de colon (HT29) que expresa de forma estable el gen de NIS
<b>HT29NISHP</b>	Células HT29NIS proliferativas en hipoxia
<b>HT29NISHQ</b>	Células HT29NIS quiescentes en hipoxia
<b>HT29NISNP</b>	Células HT29NIS proliferativas en normoxia
<b>HT29NISNQ</b>	Células HT29NIS quiescentes en normoxia
<b>HT29WT</b>	Línea celular de carcinoma de colon silvestre (wild type)
<b>HT29WTHP</b>	Células HT29WT proliferativas en hipoxia
<b>HT29WTHQ</b>	Células HT29WT quiescentes en hipoxia
<b>HT29WTNP</b>	Células HT29WT proliferativas en normoxia
<b>HT29WTNQ</b>	Células HT29WT quiescentes en normoxia

<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica (immunohistochemistry)
<b>LE</b>	Endosoma tardíos
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
<b>2-NBDG</b>	2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino-2-deoxyglucose, sonda fluorescente y no metabolizable de la glucosa
<b>NIS</b>	El co-transportador simporte sodio/yoduro (Sodium Iodide Symporter)
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (quantitative Polymerase Chain Reaction) o PCR en tiempo real (real time PCR)
<b>PBS</b>	Buffer Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)
<b>PBST</b>	Buffer Fosfato Salino con Tween-20 al 0,05% (Phosphate Buffered Saline with Tween-20)
<b>PET</b>	Tomografía de Emisión de Positrones (Positron Emission Tomography)
<b>PM</b>	Membrana plasmática (Plasmatic Membrane)
<b>RER</b>	Retículo endoplasmático rugoso
<b>RIPA</b>	Buffer para extracción e inmunoprecipitación de proteínas (Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer)
<b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
<b>SLC</b>	Portadores de soluto (Solute Carrier).
<b>SPECT</b>	Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Simple (Single Photon Emission Computed Tomography)
<b>TGN</b>	Red del trans Golgi. (Trans-Golgi Network)
<b>TSH</b>	Hormona estimulante de la tiroides (Thyroid-Stimulating Hormone)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagen SPECT/CT <sup>99m</sup> Tc pertechnetato (TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup> ) representativa del análisis de la expresión de NIS en tumores subcutáneos generados con células HT29NIS en modelos murinos. ....	<b>25</b>
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de viabilidad de células HT29WT silvestres y HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia. ....	<b>43</b>
<b>Figura 3.</b> Análisis de la expresión de NIS en células HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia mediante western blot. ....	<b>44</b>
<b>Figura 4.</b> Análisis de la captación de <sup>125</sup> I por 1000 células (en desintegraciones por minuto, DPM) de HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia. ....	<b>45</b>
<b>Figura 5.</b> Localización subcelular de la proteína NIS en células HT29NIS mediante inmunofluorescencia. ....	<b>47</b>
<b>Figura 6.</b> Distribución de las células en los platos de cultivo para el ensayo con sondas fluorescentes (2NBDG, RedoxSensor Red CC-1 y Hoechts). ....	<b>54</b>
<b>Figura 7.</b> Análisis de la expresión de GLUT1 en células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia. ....	<b>57</b>
<b>Figura 8.</b> Análisis de la expresión de PKM2 en células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia. ....	<b>59</b>
<b>Figura 9.</b> Análisis de la expresión de LDHA en células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia. ....	<b>60</b>
<b>Figura 10.</b> Diagrama de cajas para la captación de glucosa de las células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia. ....	<b>62</b>
<b>Figura 11.</b> Resumen de los cambios más sobresalientes de los ensayos realizados en el capítulo II. ....	<b>62</b>

<b>Figura 12.</b> Captación de glucosa y potencial redox citosólico de las células HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia.....	<b>70</b>
<b>Figura 13.</b> Captación de glucosa y potencial redox citosólico de las células HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia en presencia de NAC, NaI y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	<b>72</b>
<b>Figura 14.</b> Análisis de la expresión de Nrf2 en células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes sometidas a hipoxia y normoxia mediante western blot.....	<b>74</b>
<b>Figura 15.</b> Análisis de la Activación de HIF-1 $\alpha$ en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia.....	<b>75</b>
<b>Figura 16.</b> Resumen de los resultados más sobresalientes del capítulo III relacionados con la expresión de NIS.....	<b>76</b>
<b>Figura 17.</b> Variación en los niveles de proteínas involucradas en el metabolismo glicolítico y oxidativo (TCA) entre las células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia.....	<b>91</b>
<b>Figura 18.</b> Captación de glucosa y potencial redox citosólico de las células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia.....	<b>93</b>
<b>Figure 19.</b> Cambios significativos en los niveles de expresión de proteínas. Este análisis se realizó en células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP) e hipoxia (HP), y en células HT29NIS quiescentes en normoxia (NQ) e hipoxia (HQ).....	<b>101</b>
<b>Figura 20.</b> Cambios significativos en los niveles de metabolitos. Este análisis se realizó en células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP) e hipoxia (HP), y en células HT29NIS quiescentes en normoxia (NQ) e hipoxia (HQ).....	<b>104</b>
<b>Figura 21.</b> Regulación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) en células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP) y en hipoxia (HP), en células HT29NIS quiescentes en normoxia (NQ) y en hipoxia (HQ).....	<b>105</b>
<b>ANEXOS: Figura A.</b> pH del medio de cultivo de células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia.....	<b>132</b>
<b>Figura B.</b> Estructura del gen y la proteína NIS.....	<b>134</b>

## **Tratamiento antitumoral basado en la expresión de la proteína NIS: Análisis del microambiente tumoral en un modelo *in vitro***

### **Resumen**

El co-transportador de sodio/yoduro (NIS) media la captación de yoduro en la tiroides. Desde hace décadas, la captación de yoduro mediada por NIS es una herramienta muy útil para la ablación radiactiva de las células de cáncer de tiroides. La terapia génica basada en NIS es una herramienta prometedora para el tratamiento de células tumorales de origen extratiroideo. Algunos estudios preclínicos sobre este enfoque produjeron resultados muy prometedores, pero otros estudios concluyeron que las administraciones de yodo radioactivo requeridas eran demasiado altas, o se presentaba resistencia al tratamiento. La razón de esta variabilidad no está bien definida.

Este trabajo parte de las observaciones realizadas por el grupo TIRO de la Universidad de Niza en Francia quienes inocularon subcutáneamente células HT29NIS, células de adenocarcinoma de colon (línea HT29) que expresaban mNIS exógena de forma estable en ratones desnudos para inducir tumores. Usando imágenes SPECT e inmunohistoquímica, encontraron una distribución heterogénea inesperada de la capacidad captadora de yoduro y de la expresión de NIS localizada en el borde de los xenoinjertos. En este estudio, el objetivo fue analizar factores del microambiente tumoral como la hipoxia y la heterogeneidad celular (este término hace referencia a la presencia de células en estado proliferativo o quiescente) sobre la actividad de la proteína NIS. Se estudiaron las células HT29NIS *in vitro* en condiciones que inducen estados proliferativo o quiescente en normoxia o hipoxia. En este modelo *in vitro*, se analizaron la expresión, función y localización de la proteína NIS y se estudiaron los cambios en el proteoma y el metaboloma de HT29NIS inducidos por la quiescencia y/o hipoxia. También se analizaron cambios a nivel del estado redox celular y sus incidencias en el metabolismo glucolítico y oxidativo en condiciones de quiescencia e hipoxia y su efecto en la expresión de la proteína NIS. Finalmente se analizaron los posibles cambios en el comportamiento

celular como la viabilidad, el estado redox y el metabolismo glucolítico y oxidativo de las células HT29 silvestres cuando son transfectadas con el gen de NIS.

Se encontró que la captación de yoduro, el nivel de expresión de NIS y la localización de NIS en la membrana plasmática se redujeron por quiescencia e hipoxia. Los resultados proteómicos indican que los estados de quiescencia e hipoxia están asociados a una disminución en la expresión de proteínas involucradas en la localización de proteínas en la membrana y se detectan cambios en las proteínas asociadas al metabolismo energético, adicionalmente se encontró que la transfección de la proteína NIS en las células HT29WT reduce el metabolismo glucolítico e incrementa el metabolismo oxidativo.

En conclusión, los resultados aquí reportados mostraron que la hipoxia y la quiescencia perjudican la expresión y la localización celular de la proteína NIS y, en consecuencia, la captación de yoduro. Estos hallazgos también indican que el uso de líneas celulares para la evaluación preclínica de la terapia génica basada en NIS podría conducir a subestimar la eficiencia del método. También es importante tener en cuenta los posibles cambios en el comportamiento celular cuando se introduce un gen exógeno, en líneas celulares que son sometidas a condiciones como hipoxia y quiescencia. De manera más general, este estudio muestra que el microambiente tumoral es un parámetro importante en el uso de NIS en el tratamiento de células cancerosas.

Resolver algunas limitaciones del uso de NIS en la terapia génica, dada por factores del microambiente tumoral, como la heterogeneidad celular, las variaciones en la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, el pH y la producción ROS permitirán en el futuro delimitar áreas del tumor, dosis de radioisótopos, disminución de los efectos secundarios en tejidos sanos, aumentando la radiosensibilidad del tumor y mejorando el pronóstico del paciente con cáncer.

**Palabras claves:** NIS, quiescencia, hipoxia, microambiente tumoral, metabolismo, células HT29.

## **Antitumor treatment based on the expression of NIS protein: Analysis of the tumor microenvironment in an *in vitro* model**

### **Summary**

The sodium/iodide symporter (NIS) mediates iodide uptake in the thyroid. Since decades, NIS-mediated iodide uptake is a very useful tool for radioactive ablation of thyroid cancer cells. NIS-based gene therapy is a promising tool for the treatment of tumor cells of extrathyroidal origin. Some preclinical studies on this approach produced very promising results, but other studies concluded that the required radioactive iodine administrations were too high or resistance to treatment occurs. The reason of this variability was not well-defined.

This work is based on the observations made by the TIRO group from the University of Nice in France. They inoculated subcutaneously HT29NIS cells, colon adenocarcinoma cells (HT29 line) stably expressing exogenous mNIS to induce tumors in nude mice. Using SPECT imaging and immunohistochemistry, they found an unexpected heterogeneous distribution of iodide uptake capacity and NIS expression localized at the border of the xenografts. In this study, the aim was to analyze factors of the tumor microenvironment such as hypoxia and cellular heterogeneity (this term refers to the presence of cells in a proliferative or quiescent state) on the activity of the NIS protein. We studied HT29NIS cells *in vitro* in conditions that induce quiescent and/or hypoxic states. In this *in vitro* model, the expression, function and localization of NIS protein were analyzed. Changes in the proteome and metabolome of HT29NIS induced by quiescence and / or hypoxia were also analyzed. Also, change at the cellular redox state level and its effects on glycolytic and oxidative metabolism under quiescence and hypoxia conditions and its effect on the expression of the NIS protein were analyzed. Finally, possible changes in cellular behavior such as viability, redox status, and glycolytic and oxidative metabolism of wild type HT29 cells when transfected with the NIS gene were analyzed. We found that the iodide uptake, NIS-expression level and NIS localization at the plasma membrane were reduced by quiescence and hypoxia. Our proteomics results indicate that quiescent and hypoxic states are associated to a

decrease in the expression of proteins involved in protein localization to membrane and changes in protein linked to energy metabolism. In addition, transfection of the NIS protein in HT29WT cells was found to reduce glycolytic metabolism and increase oxidative metabolism.

In conclusion, the results showed that hypoxia and quiescence impair NIS expression and NIS cellular localization, and consequently iodide uptake. These findings also indicate that the use of cell lines for preclinical evaluation of NIS-based gene therapy could lead to underestimate the efficiency of the approach. It is also important to consider possible changes in cellular behavior when an exogenous gene is introduced into cell lines that are subjected to conditions such as hypoxia and quiescence. More generally, our study show that tumor microenvironment is an important parameter in the use of NIS in the treatment of cancer cells.

Resolving some limitations of the use of NIS in gene therapy, given by factors of the tumor microenvironment such as cellular heterogeneity, variations in the availability of oxygen and nutrients, pH and ROS production will allow in the future to delimit areas of the tumor, dosage of radioisotopes, decrease of side effects in healthy tissues, increasing the radiosensitivity of the tumor and improving the prognosis of the cancer patient.

**Keywords:** NIS, quiescence, hypoxia, tumor microenvironment, metabolism, HT29 cells

## **Tratamiento antitumoral basado en la expresión de la proteína NIS: Análisis del microambiente tumoral en un modelo *in vitro***

### **1. INTRODUCCIÓN**

El co-transportador sodio/yoduro (NIS) es una glicoproteína localizada en la membrana basal de los tirocitos, que cataliza el transporte activo de yoduro para la síntesis de hormonas tiroideas (1-7). Durante décadas la acumulación de yoduro catalizada por NIS en los tirocitos ha sido una herramienta útil para el diagnóstico y tratamiento de varias patologías de la tiroides (8, 9). NIS media la captura del yoduro radioactivo ( $^{131}\text{I}^-$ ,  $^{125}\text{I}^-$ ,  $^{123}\text{I}^-$  y  $^{124}\text{I}^-$ ) y otros radioisótopos tales como el tecnecio-99m, isómero nuclear metaestable del tecnecio-99 ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) en forma de ion pertecnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ), astato ( $^{211}\text{At}^-$ ), renio como ion perrenato ( $\text{ReO}_4^-$ ) y fluoruro ( $\text{B}_{18}\text{F}_4^-$ ) (5). La captura de estos radioisótopos por células tumorales permite la visualización de los tumores mediante cintigrafía por la emisión de partículas gamma provenientes de  $^{125}\text{I}$  o del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y la destrucción radioterapéutica de los mismos mediante radioterapia metabólica utilizando isótopos radioactivos emisores de partículas  $\beta$  como el  $^{131}\text{I}$ , que se incorporan al metabolismo del órgano diana (10). Por lo tanto, cuando la expresión de NIS es mantenida en lesiones metastásicas, la administración de  $^{131}\text{I}$  después de tiroidectomía total permite ablación selectiva del tejido neoplásico.

De igual forma, se ha determinado que las células epiteliales de la glándula mamaria lactante expresan NIS, cuya función es participar en la translocación del yoduro desde el torrente sanguíneo a la leche materna, para suministrar al recién nacido la cantidad adecuada de  $\text{I}^-$  para la biosíntesis de las hormonas tiroideas (11). Esta habilidad de los humanos para acumular yoduro en leche fue identificada hacia 1952 (12), luego se identificó a NIS como el transportador responsable (11, 13, 14). También se plantea una posible asociación entre el cáncer de tiroides y el cáncer de seno, debido a que comparten algunos factores etiológicos y ambas glándulas son reguladas por el eje hipotalámico-hipofisiario (15). Por lo tanto, el uso del

transportador NIS en cáncer de seno podría ser una herramienta diagnóstica y terapéutica útil que contribuiría en el control de esta enfermedad (16, 17). Aunque aún se necesitan más estudios teóricos y clínicos antes de que estos tratamientos se apliquen en la clínica, las futuras aplicaciones clínicas son prometedoras.

Estudios en terapia génica han facilitado la transferencia de NIS a otros tipos de células por medio de vectores virales, generando como perspectiva prometedora la utilización de estos tratamientos en tumores de origen extratiroideo. Este tipo de aproximaciones experimentales han mostrado ventajas adicionales a los tratamientos convencionales, como la factibilidad y seguridad de usar la terapia con radioisótopos reduciendo la toxicidad extratumoral en una amplia variedad de tumores (10, 18-23). En este caso las células tumorales pueden ser tratadas para destrucción radioterapéutica con radionúclidos como  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  y  $^{211}\text{At}$  (24-27). Un estudio reciente explora un método de transferencia de la proteína NIS usando vesículas extracelulares a células de carcinoma hepatocelular (HCC), lo cual incrementa la captación de yoduro radioactivo y la citotoxicidad (28). La aplicación exitosa de estas estrategias podría permitir la aplicación de la radioterapia metabólica en cánceres no captadores para transformarlos en cánceres captadores de yoduro radioactivo.

En la Unidad TIRO (Transporter in Imaging and Radiotherapy in Oncology, School of Medicine, Université de Nice Sophia-Antipolis), se desarrolló una línea celular de carcinoma de colon (HT29) que expresa de forma estable el gen de NIS denominada HT29NIS. Estas células, se introdujeron en ratones inmuno-deficientes, los cuales formaron tumores que se analizaron por Tomografía Computarizada de Emisión de Fotón Simple (SPECT por su sigla en inglés). El hallazgo más importante de este experimento fue una inesperada distribución heterogénea en la incorporación de yoduro y en la expresión de NIS en las células que forman el tumor, siendo mayor la captación en la parte externa del tumor, donde se encontraron zonas oxigenadas

con probable predominio de células proliferantes. Dicha captación y la expresión de NIS disminuyó notoriamente al interior del mismo, donde prevalecieron zonas hipóxicas posiblemente formadas en su mayoría por células quiescentes. Las células quiescentes se definen, como células en estado no proliferativo, o en fase G0 del ciclo celular, pero que son capaces de responder a un estímulo extrínseco y reentran al ciclo celular y comienzan a proliferar (29) . A estas células quiescentes se les atribuye la resistencia a los tratamientos, las recaídas y metástasis sufridas por los pacientes no respondedores (29-32).

Estos resultados sugirieron que la disminución en la captación de yoduro y la posible disminución de la expresión de NIS en el modelo *in vivo*, podría estar relacionada con las condiciones del microambiente tumoral, particularmente con la presencia de diferentes tipos celulares (células proliferantes y quiescentes), la distribución no uniforme del oxígeno (presencia de zonas hipóxicas), y cambios en la disponibilidad de nutrientes. Todos estos factores pueden alterar la expresión, localización y función de proteínas como NIS, que pueden modificar las características de sensibilidad a los tratamientos antitumorales basados en esta proteína.

Los resultados obtenidos en el grupo TIRO hacen evidente la importancia de comprender: ¿Cómo las condiciones del microambiente tumoral afectan la expresión, localización y función de la proteína NIS?

Con el fin de responder a este interrogante, se estableció una alianza de cooperación en investigación entre el grupo TIRO, el Centro de Control de Cáncer Ltda. de Bogotá, y la Unidad de Bioquímica de la Universidad del Rosario. En el marco de esta cooperación, se realizó un estudio *in vitro* que consistió en imitar en cultivo las condiciones microambientales que se encuentran en los tumores *in vivo* y que determinan la heterogeneidad de los tumores, especialmente relacionadas con la variación en la concentración de oxígeno, y la presencia de células proliferantes y quiescentes. El modelo *in vitro* permitió simular y establecer los

componentes, interacciones y respuestas adaptativas que se presentan a nivel del microambiente tumoral *in vivo*, contribuyendo a entender la complejidad del cáncer y sirviendo como una herramienta base para analizar el efecto de la quiescencia y la hipoxia en la expresión, localización y función de la proteína NIS. También, se evaluaron los cambios en el metabolismo celular, mediante análisis proteómico y metabolómico de las células transfectadas con NIS y su posible incidencia en la expresión y localización correcta de dicha proteína en la membrana celular. De esta forma, con este trabajo se aporta en el conocimiento sobre factores del microambiente tumoral que afectan la expresión, localización y función de la proteína NIS y los posibles cambios metabólicos que explican este comportamiento. Así como también, los cambios en el comportamiento celular, cuando se transfectaron las células HT29WT con el gen de NIS.

El uso de la proteína NIS en diagnóstico y tratamiento del cáncer tiene un futuro prometedor. Todos los esfuerzos que se hagan en superar las dificultades que se presentan en su aplicación son importantes para contribuir en el desarrollo de una terapia eficaz, que permita la liberación eficiente del gen de NIS en tejidos tumorales blanco y su expresión correcta en la membrana plasmática, de tal manera que esté en la capacidad de captar radioisótopos que maximicen el efecto citotóxico en las células malignas destruyendo el tumor y se minimicen los efectos tóxicos secundarios de las células normales.

Además, el conocimiento aportado ayuda a optimizar el uso del gen de NIS como gen reportero permitiendo el seguimiento de genes cotransfectados con el gen de NIS o de células transfectadas con este gen mediante el uso de radiotrazadores ampliando las aplicaciones de NIS en la salud humana.

## 2. ESTADO DEL CONOCIMIENTO

### 2.1. EL CO-TRANSPORTADOR SODIO/YODURO (NIS)

La Glándula tiroides tiene como principal función la síntesis y secreción de las hormonas tiroides 3,5,3'-triyodotironina (T3) y 3,5,3',5'- tetrayodotironina (T4), las cuales son importantes en el control del metabolismo celular, la termorregulación, y en el desarrollo del sistema nervioso central y del sistema óseo en el feto y en los recién nacidos (33). El folículo tiroideo es la unidad estructural y funcional de la tiroides (34, 35). Su forma es ovoide y está constituido por una monocapa de células epiteliales cúbicas (tirocitos) alrededor de un líquido viscoso de proteínas, denominado el coloide, constituido en un 80% de tiroglobulina (Tg). La síntesis de las hormonas tiroideas requiere del transporte activo y acumulación de yoduro desde el torrente sanguíneo hacia el interior de la glándula, específicamente al interior de los folículos. La proteína NIS (también llamada SLC5A5), es una glicoproteína integral de membrana miembro de la familia de cotransportadores sodio/soluto (ver anexo Figura B estructura del gen y la proteína NIS), que reside en la membrana basolateral de los tirocitos (1-7). NIS es un cotransportador que cataliza un transporte acoplado de yoduro y sodio, con una estequiometría de transporte de 1 I<sup>-</sup> por 2 Na<sup>+</sup>, utilizando como fuerza motriz para transportar el yoduro en contra de su gradiente de concentración, el gradiente favorable de sodio creado por la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Así, el yoduro es acumulado al interior de los tirocitos a una concentración mayor que la encontrada en el plasma. NIS fue identificada en la rata (2), luego en el hombre (3), y posteriormente en el ratón por el Grupo TIRO (4). La expresión de NIS y la acumulación activa de yoduro dependiente de sodio ha sido observada también en la mucosa gástrica, glándulas salivares y glándula mamaria lactante (11, 14). Al igual que en la tiroides, la actividad de NIS genera una captación importante de yoduro en estos tejidos. La presencia de NIS, pero no una

acumulación activa de yoduro, ha sido observada en el cerebro, piel, testículos y otros tejidos (4).

Además de yoduro, la proteína NIS también transporta otros aniones monovalentes como el perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ), el cual funciona como un inhibidor competitivo de NIS, el clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ), tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (24, 36) y diferentes radioisótopos tales como el pertecnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) (17), perrenato ( $\text{ReO}_4^-$ ) (26), astato ( $^{211}\text{At}^-$ ) (24, 37) y fluoruro ( $\text{B}_{18}\text{F}_4^-$ ) (5).

## **2.2. NIS Y RADIOTERAPIA METABÓLICA**

Existen varias aproximaciones terapéuticas posteriores al diagnóstico de un tumor maligno, entre ellas encontramos el manejo quirúrgico, la terapia hormonal, la quimioterapia, la radioterapia y de manera reciente la terapia molecular o la combinación de terapias (38). La elección de un tipo de tratamiento sobre otro depende de varias consideraciones tanto técnicas como biológicas. Dentro de estas opciones terapéuticas la radioterapia se considera una parte fundamental en el manejo tumoral. Se estima que el 52% de nuevos pacientes con cáncer se pueden beneficiar con el manejo por radioterapia, considerando que esta puede representar la mejor opción de cura, ejercer el mejor control local a nivel tumoral, mejores efectos paliativos y menores efectos adversos o una combinación de estos (39).

El cáncer de tiroides es la neoplasia maligna más frecuente del sistema endocrino y se ha incrementado rápidamente en las últimas décadas en todo el mundo (40). Sin embargo, la habilidad de la tiroides para concentrar  $\text{I}^-$  a través del transportador NIS ha proporcionado las bases moleculares para el uso de yoduro radioactivo en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de patologías de la tiroides (41, 42). Los carcinomas derivados de células foliculares de tiroides se dividen en tres tipos: bien diferenciados, pobremente diferenciados y no diferenciados sobre la base de parámetros histológicos y clínicos. Los carcinomas diferenciados de tiroides (DTC

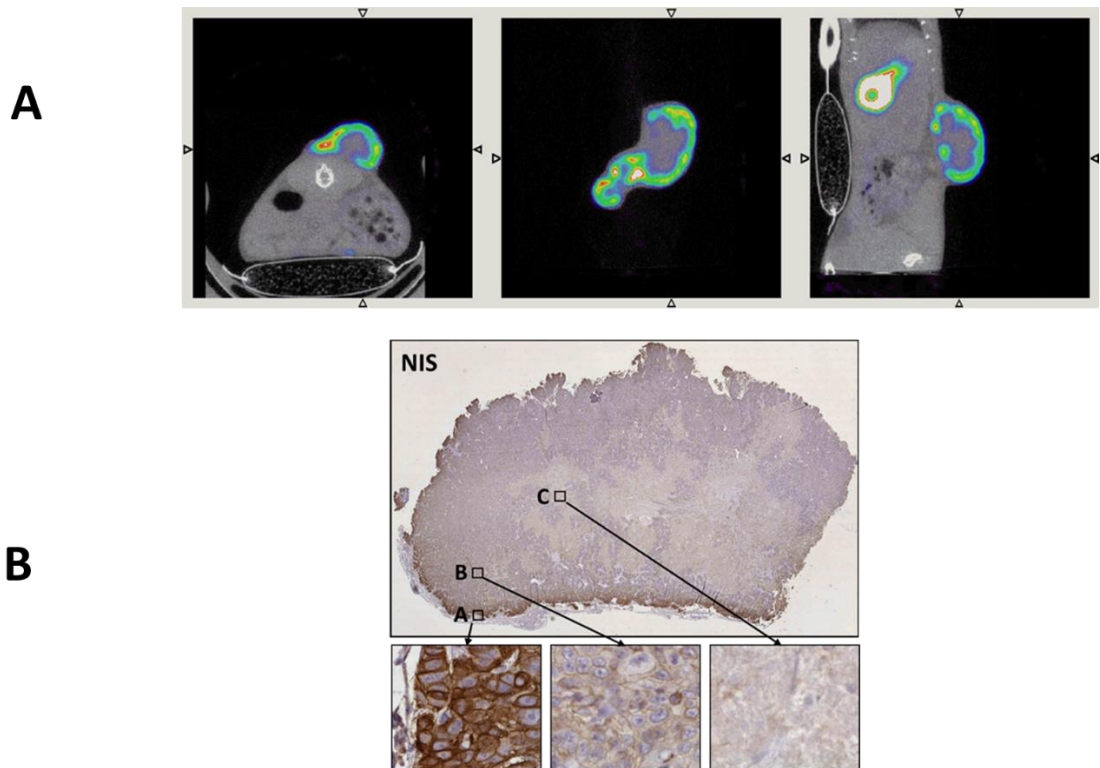
por su sigla en inglés) incluyen los tipos papilar y folicular (43). El diagnóstico histológico del carcinoma papilar se basa en la presencia de inclusiones intranucleares, que están ausentes o en menor proporción en el carcinoma folicular. El tratamiento ideal para este tipo de tumores de alto riesgo es la tiroidectomía seguido de terapia con yoduro radioactivo (44). El carcinoma papilar que es el cáncer más prevalente derivado de células foliculares, se caracteriza por el lento crecimiento y buen pronóstico (45). Sin embargo, el 5-20% de los pacientes con DTC presentan recurrencia en el lecho tiroideo o ganglios linfáticos cervicales y algunos pacientes desarrollan enfermedad metastásica distante, que disminuye la tasa de supervivencia (44). También se reporta que un tercio de todos los DTC y todos los cánceres de tiroides pobremente diferenciados y no diferenciados o anaplásicos no concentran yodo radioactivo, y en consecuencia tienen un mal pronóstico (46-48).

Una disminución en la capacidad de captar yoduro ha sido asociada con algunos de los cánceres tiroideos, produciéndose la aparición de nódulos “fríos”. Está ahora bien establecido que las células cancerosas de tiroides presentan niveles menores de mRNA de NIS que el tejido normal, pudiendo explicar la disminución en la captación de yoduro. En varias de las primeras publicaciones sobre NIS se reportó una baja expresión de la proteína en tejidos tumorales de tiroides (49-51), confirmando la correlación esperada entre los bajos niveles de mRNA de NIS, de la proteína y de la captación de yoduro.

La clonación de NIS ha permitido la utilización de este transportador en terapia génica, ya sea como marcador en imagenología no invasiva o como gen suicida asociado a técnicas de radioterapia metabólica (8, 9, 18). Los avances en terapia génica han permitido la transferencia de NIS a otros tipos de células tumorales, por medio de vectores basados en retrovirus (20), adenovirus (19), lentivirus (21) y baculovirus (23), y la inducción de tumores en modelos *in vivo*, alcanzado con ello, importantes efectos terapéuticos que han permitido expandir la utilidad de estos tratamientos a tumores que no son de origen tiroideo. Así mismo, este tipo de

aproximaciones experimentales han mostrado ventajas adicionales a los tratamientos convencionales, como la reducción de la toxicidad extratumoral y la expresión selectiva y tejido-específica del gen requerido (23, 52). En un estudio reciente se reporta que un nuevo ortopoxvirus quimérico CF33-hNIS es capaz de infectar, replicar y eliminar células de cáncer de colon e inducir una regresión sostenida del tumor *in vivo* (53). Son y colaboradores exploraron un método de transferencia de la proteína NIS usando vesículas extracelulares a células de carcinoma hepatocelular (HCC), lo cual incrementa la captación de yoduro radioactivo y la citotoxicidad (28). También se reportaron ensayos clínicos con promisoría actividad biológica que usan la cepa de la vacuna del virus del sarampión del linaje Edmonston (MV-Edm) que preferencialmente infecta y lisa una amplia variedad de células cancerosas (54). La aplicación exitosa de estas estrategias podría revertir tumores no captadores en tumores radiosensibles.

Con el fin de analizar la evolución y efectividad del tratamiento radioterapéutico a base de yoduro radioactivo, el Grupo TIRO de la Universidad de Niza utilizó la técnica de transfección para introducir el gen de NIS en células de carcinoma de colon (HT29) e inducir con ellas tumores en ratones. El rastreo de las células transfectadas inoculadas en el ratón se hizo por técnicas de imagenología SPECT en pequeños animales e inmunohistoquímica. Las imágenes SPECT obtenidas evidencian la existencia de zonas heterogéneas en la incorporación del radiotrazador  $^{99m}\text{Tc}$  en estos tumores inducidos. En la parte externa del tumor se observa una mayor captación del  $^{99m}\text{Tc}$  y por tanto una alta expresión de la proteína NIS, mientras que en la parte interna se observa una menor o nula captación de este y una disminución de la expresión de NIS (Figura 1A). En la inmunohistoquímica (Figura 1B) se puede observar alta expresión de la proteína en la periferia del tumor y una reducción de la expresión en la parte interna del tumor, con una expresión mínima hacia el centro del tumor. Se ha reportado que la terapia de yoduro radioactivo depende de la habilidad de los tumores de tiroides para acumular yoduro radioactivo, el cual es dependiente de la expresión de NIS funcional en la membrana plasmática (55).



**Figura 1. Imagen SPECT/CT  $^{99m}\text{Tc}$  pertechnetato ( $\text{TcO}_4^-$ ) representativa del análisis de la expresión de NIS en tumores subcutáneos generados con células HT29NIS en modelos murinos. A.** Tumor subcutáneo inducido en ratones con células de cáncer de colon. Inoculación de células HT29-mNIS ( $2 \times 10^6$ ) en ratones desnudos NOD SCID. Se hace el seguimiento 27 días posinfección por inoculación intraperitoneal de  $^{99m}\text{Tc}$  mediante técnicas de imagenología en pequeños animales SPECT/CT. **B.** Detección de la proteína NIS por inmunohistoquímica (ICH) en tumor subcutáneo inducido en ratones con células de cáncer de colon HT29NIS. Se observa alta expresión de NIS en la periferia del tumor (A) y una reducción de la expresión en la parte interna (B), con mínima expresión en la parte central del tumor (C).

Estas observaciones sugieren la búsqueda de nuevas estrategias que incrementen la expresión funcional de NIS en células tumorales con el fin de aumentar la captación de yoduro y reducir el crecimiento de células tumorales. Por ejemplo, Kim

YH y colaboradores demuestran que la función de NIS como gen reportero y gen terapéutico se puede hacer más eficiente cuando se optimiza su secuencia codificante, reemplazando los codones del DNA de NIS silvestre por nuevos codones que tienen mayor uso en la traducción de genes de humanos (56). Esta optimización de codones incrementa los niveles de expresión de la proteína NIS y la captación de yoduro radioactivo reduciendo el tamaño de tumores inducidos en ratones (56). También, se han reportado estudios con células tumorales de tiroides *in vivo* e *in vitro* usando inhibidores de algunas vías de señalización oncogénicas, donde se ha logrado obtener un incremento de la expresión de NIS, y su posterior habilidad para captar yoduro (57-59). Así mismo, se ha reportado en células de cáncer menos diferenciadas la restauración de la expresión de NIS por agentes que inducen diferenciación, actuando por mecanismos genéticos o epigenéticos (57, 60), o aumentando la captación de yoduro mediante estimuladores que potencian la translocación de NIS (61). En un estudio se muestra que la inhibición de la vía MAPK con selumetinib puede regenerar la eficacia terapéutica del yoduro radioactivo aumentando la captación en pacientes con cáncer de tiroides que eran resistentes (62). Feng y colaboradores encontraron que, en células de cáncer de tiroides, la pérdida de PTEN, una alteración somática común y la sobregulación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR encontrada en múltiples tipos de cáncer, probablemente inhibe la glicosilación de NIS y daña la localización en la membrana de NIS, resultando en un incremento de NIS citoplasmático (63, 64). Estos hallazgos suministran bases promisorias para continuar la investigación en las terapias basadas en NIS para aquellos tumores que son resistentes a los tratamientos, sugiriendo el desarrollo de terapias que vayan más allá de solo intentar el incremento de los niveles de NIS.

### 2.3. MICROAMBIENTE TUMORAL

Los tumores no pueden ser considerados como simples grupos de células que crecen indiscriminadamente. Al contrario, estos son altamente complejos, formados por diferentes tipos celulares, que están en constante comunicación, modulan las funciones de las células vecinas e interactúan con el medio circundante, tomando y secretando diferentes componentes claves para su proliferación y crecimiento. Muchos tumores son histopatológicamente diversos, conteniendo regiones demarcadas por varios grados de diferenciación, proliferación, vascularización, inflamación, y/o invasividad (65).

El microambiente tumoral está formado por células cancerosas y células no cancerosas, como las células endoteliales y los pericitos que son de gran importancia al ser responsables de la formación y función de vasculatura tumoral (66); células del sistema inmune, que pueden proporcionar un compartimento inmunosupresor y promotor del crecimiento (67), fibroblastos asociados a cáncer (CAFs por su sigla en inglés) que tienen un fenotipo diferente al de los fibroblastos del tejido normal incrementan la expresión de proteínas de la matriz extracelular (ECM por su sigla en inglés) y la secreción anormal de enzimas proteolíticas que degradan la matriz y factores de crecimiento solubles, lo cual podría facilitar el potencial invasivo y la metástasis de las células tumorales (68-70). La ECM proporciona la organización tridimensional y la arquitectura de una masa tumoral, que, a diferencia de la matriz normal, normalmente está enriquecida en varias proteínas, como el colágeno tipo I y las glucoproteínas altamente glucosiladas, como los proteoglicanos. También en el microambiente tumoral se pueden encontrar adipocitos asociados con el cáncer (CAAs por su sigla en inglés) que promueven el crecimiento y desarrollo de tumores, secretando mediadores antiinflamatorios que evitan la respuesta antitumoral de las células del sistema inmune. Aunque no se conoce bien la influencia directa de los adipocitos en la progresión tumoral, se sabe que la interacción del tejido adiposo en las células

tumorales conduce a un mal pronóstico, principalmente debido a sus diversos componentes (71). Los fibroblastos, adipocitos, macrófagos, células del sistema inmune, células endoteliales y la ECM son los componentes principales del estroma, los cuales han alterado sus funciones para permitir que los tumores invadan tejidos y progresen. Además, el estroma tumoral regula la señalización celular y actúa como un reservorio de factores de crecimiento. (65, 72).

Por otra parte, se tiene evidencia de la existencia de una nueva dimensión de la heterogeneidad intratumoral, una subclase de células neoplásicas dentro de los tumores, llamadas células madre tumorales (cáncer stem cells, CSCs por su sigla en inglés). Las CSCs son constituyentes comunes en muchos tumores y están presentes con variada abundancia (73-76). Se ha sugerido que las CSCs son más resistentes a los tratamientos quimioterapéuticos comúnmente usados (31, 77), lo cual puede explicar la recurrencia de la enfermedad después de tratar tumores sólidos con radiación y varios quimioterapéuticos. La existencia de las CSCs puede explicar ciertas formas de latencia de los tumores, que perduran por años después de resección quirúrgica o radio/quimioterapia que súbitamente generan enfermedad. Las CSCs pueden representar una doble amenaza, la primera, las CSCs son más resistentes a las terapias y la segunda, están dotadas con la habilidad para regenerar el tumor una vez la terapia se deja de aplicar. Estas características de las CSC puede estar relacionada con poblaciones de estas células que se encuentran en estado quiescente (G0) y se les conoce como células madre quiescentes no proliferativas, las cuales al parecer, tienen la habilidad de detectar cambios en el microambiente y responden activando nuevamente el ciclo celular a través de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales que están bajo estudio (76, 78).

Adicional a estas observaciones, también se ha reportado que en la periferia de los tumores se presentan zonas más vascularizadas y por tanto más oxigenadas que favorecen el suministro de nutrientes que permiten el crecimiento del tumor, estas

zonas constan principalmente de células proliferantes que se encuentran en división activa a través del ciclo celular. Hacia el interior del tumor se encuentran zonas menos vascularizadas y por tanto menos oxigenadas y con menor suministro de nutrientes, estas zonas están conformadas en su mayoría de células quiescentes las cuales escapan del ciclo celular y entran en un estado de reposo reversible no proliferativo (G0). Collier y colaboradores concluyen en su trabajo que la quiescencia no es un único estado, sino más bien es un conjunto de estados que son determinados por la señal de iniciación; que es posible identificar genes que son universalmente característicos del estado quiescente (independientes de la señal), lo que implica la existencia de un programa de quiescencia y que la quiescencia es funcionalmente diferente de la detención del ciclo celular (29). El estado quiescente no es pasivo, las células en estado quiescente están listas para activación por mecanismos específicos favorables energéticamente que son compatibles con el bajo estado metabólico de la quiescencia y que permiten una rápida y global respuesta necesaria para la activación. Uno de los ejemplos de regulación del estado quiescente está dado por los miRNAs los cuales ejercen su efecto regulatorio a nivel postranscripcional (79, 80). A estas células se les atribuye en parte la resistencia que presentan los tumores a los tratamientos tanto quimio como radioterapéuticos, que luego mediante el estímulo adecuado reingresan en el ciclo celular y se convierten en proliferantes dando lugar a la expansión de las células tumorales y a metástasis (29, 30, 76). Las características comunes de las células madre y las células cancerosas proporcionan los componentes básicos para el mantenimiento y la supervivencia del cáncer, desde la autorrenovación y la potencial diferenciación hasta la organización de microambientes que soportan la pluripotencialidad (stemness) (76).

La composición del microambiente tumoral es altamente variable, se presentan diferencias entre pacientes y diferencias entre áreas del mismo tumor. El microambiente tumoral es a menudo alterado mientras la enfermedad progresa (81). Las condiciones que comúnmente se encuentran en el microambiente tumoral son:

bajos niveles de oxígeno (hipoxia), condiciones ácidas (pH bajo) y niveles bajos de glucosa. Además, ocurre una muerte celular masiva, resultando en la liberación de proteínas y otras moléculas al microambiente (82). La distribución gradual y local de estas condiciones del microambiente en la masa tumoral contribuye a otra característica muy importante del cáncer, que es, la heterogeneidad intratumoral, que representa un obstáculo importante para el perfil molecular del tumor a gran escala y al tratamiento exitoso de pacientes con cáncer (83).

La hipoxia se caracteriza por bajos niveles de oxígeno dentro de los tumores sólidos como resultado de la formación anormal de vasos sanguíneos, perfusión sanguínea defectuosa y una proliferación ilimitada de las células cancerosas (84). El acceso al oxígeno es fundamental para la mayoría de los organismos, de forma tal que las fluctuaciones en los niveles de este gas han obligado a los organismos multicelulares a responder y adaptarse a estos cambios a través de elaborados mecanismos moleculares que han evolucionado con el tiempo. La hipoxia genera gradientes de oxígeno intratumorales, contribuyendo a la plasticidad y heterogeneidad de los tumores y promoviendo un fenotipo más agresivo y metastásico. En este proceso, el sello distintivo fundamental, es el incremento de la expresión del factor inducible por hipoxia  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$  por su sigla en inglés) (85). HIF- $1\alpha$  orquesta la activación de genes que regulan la glucólisis, el transporte de glucosa, los reguladores de acidosis, la angiogénesis, entre otros (86). Cuando el oxígeno se vuelve limitante, las células responden cambiando su metabolismo celular hacia el bajo consumo de oxígeno y minimizando la influencia de los radicales libres de oxígeno (ROS por su sigla inglés); como consecuencia, se presenta una disminución en la fosforilación oxidativa y un incremento en la dependencia de la glicólisis como fuente primaria de producción de ATP (87). Entre los cambios moleculares más importantes que buscan contrarrestar los efectos deletéreos de los bajos niveles de oxígeno se encuentran: el aumento en la expresión de genes que codifican para enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa que permiten el cambio hacia la vía glucolítica; factores de transcripción

que expresan enzimas encargadas de regular el estrés oxidativo; factores angiogénicos que promueven la formación de nueva vasculatura para incrementar la oxigenación; y oncoproteínas, que le dan a las células tumorales hipóxicas ventajas en su crecimiento (88).

Debido a los cambios en los niveles de oxígeno, las células cancerosas pueden cambiar su metabolismo energético. El efecto Pasteur se observa en niveles normales de oxígeno, lo que resulta en la activación de fosforilación oxidativa y la inhibición de la glucólisis. Sin embargo, las células cancerosas desarrollan un mecanismo de escape inducido por hipoxia, que cambia la fosforilación oxidativa a glucólisis (también conocido como el efecto Warburg) para apoyar la alta proliferación (89). Esta reprogramación del metabolismo energético inducida por hipoxia le suministra a las células tumorales combustible para el crecimiento y división celular. Bajo condiciones aeróbicas las células normales transforman la glucosa a piruvato en el citosol mediante glucólisis y luego a dióxido de carbono en la mitocondria; bajo condiciones anaeróbicas, la glicólisis es favorecida y relativamente poco piruvato es enviado a la mitocondria, lo que provoca su reducción a lactato. Otto Warburg fue el primero en observar alteraciones en el metabolismo energético celular en cáncer (90, 91) y en demostrar que, incluso en la presencia de oxígeno, las células cancerosas reprograman su metabolismo, y por tanto su producción de energía, limitando su metabolismo energético en gran medida a la glicólisis (glicólisis aerobia) o fermentación láctica. Para ello, estas células sobreexpresan transportadores de glucosa como GLUT1 (92-94) y múltiples enzimas de la vía glucolítica (92, 93), lo que incrementa el transporte de glucosa dentro del citoplasma y la eficiencia de la vía metabólica.

En algunos tumores se sugiere la presencia de al menos dos subpoblaciones de células cancerosas que difieren en las vías de generación de energía. Una subpoblación consiste de células que dependen de glucosa (efecto Warburg) y que secretan lactato, una segunda subpoblación que utiliza el lactato producido por sus vecinas como fuente principal de energía, a través de la oxidación completa del

piruvato en la respiración celular (95-97). En los tumores se pueden identificar zonas hipóxicas y zonas con mayor disponibilidad de oxígeno. Las condiciones de normoxia e hipoxia no son estáticas, hay una fluctuación temporal y regional probablemente como resultado de la inestabilidad y organización caótica de la neovasculatura asociada al tumor (98). Se ha establecido que variaciones en la perfusión y vascularización en los tumores modulan el metabolismo energético en las células de cáncer y una inadecuada vascularización puede resultar en hipoxia, activando el sistema de respuesta HIF-1 $\alpha$ , el cual entre sus múltiples efectos puede estimular la glicolisis aeróbica, favoreciendo la supervivencia y proliferación en estas condiciones (97).

Las células tumorales generan productos metabólicos ácidos, incluyendo ácido láctico, protones y dióxido de carbono. Para contrarrestar la acumulación de estos metabolitos ácidos y evitar acidosis intracelular prolongada, las células activan constituyentes de la maquinaria reguladora de pH, incluyendo intercambiadores iónicos como la isoforma 1 del intercambiador de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE1) que es una proteína ubicua de la membrana plasmática que regula el pH intracelular mediante la eliminación de un protón en intercambio por sodio extracelular (99) y transportadores de monocarboxilato acoplado a protones como MCT4 que media principalmente el flujo de salida de lactato de las células hiperglicolíticas y está regulado por hipoxia (100), muchos de estos constituyentes y sus reguladores son moléculas sensibles al pH que se activan una vez el pH intracelular (pHi) alcanza valores ácidos incompatibles con las reacciones biosintéticas y con los procesos de señalización (101). Debido a que las células tumorales se pueden adaptar, la acidosis les dota de una ventaja selectiva sobre las células normales que favorece su expansión y diseminación y las hace quimo/radioresistentes, suprime la respuesta inmune de linfocitos T citotóxicos (CTL), induce respuesta inmune innata e inflamación, favorece la angiogénesis, la invasión y está asociada con fenómenos de aneuploidía, tasa de mutación, autofagia (102), supervivencia, y migración celular entre otras (103).

Las células cancerosas exhiben niveles persistentemente altos de ROS como consecuencia de la inestabilidad genética y metabólica asociada al microambiente tumoral. Estos altos niveles de ROS se compensan con una mayor capacidad antioxidante de las células cancerosas (104). Las ROS juegan un papel importante en la tumorigénesis y afectan múltiples procesos biológicos como la proliferación celular, la inestabilidad genómica, la inflamación, la resistencia a la apoptosis y la reprogramación metabólica (105). En general, la baja concentración de ROS actúa como mitógeno y promueve la proliferación y supervivencia celular, mientras que la concentración intermedia conduce a una detención transitoria o permanente del ciclo celular e induce la diferenciación celular. A altas concentraciones, ROS puede producir daño oxidativo, especialmente en el ADN, causando mutaciones que eventualmente conducen al cáncer (104). La generación de ROS es un evento que se exacerba luego de la hipoxia y uno de los mecanismos más importantes por el cual las células de mamíferos pueden detectar y adaptarse al estrés químico y oxidativo, lo constituye el sistema del factor nuclear Nrf2 (erythroid 2-related factor 2)/Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (104, 106-108). Normalmente, Keap1 secuestra a Nrf2 y lo marca para ubiquitinación en el citoplasma con lo cual, promueve su degradación en el proteosoma (109). En respuesta al estrés oxidativo, la interacción entre Nrf2 y Keap1 se pierde resultando en la estabilización y acumulación nuclear de Nrf2 (110), en donde interactúa con elementos de respuesta antioxidante (ARE) en la región promotora de una serie de genes que codifican para enzimas detoxificantes de fase 2 (glutatión S transferasa y NAD(P)H quinona oxidoreductasa), proteínas antioxidantes (enzimas para la síntesis de glutatión) y transportadores (ej. ABCC2, ABCC3, ABCG2 and xc- subunit), entre otros (111-114).

En muchos cánceres humanos, se pierde la naturaleza transitoria e inducible del sistema Keap1-Nrf2. Nrf2 se estabiliza de manera persistente, lo que resulta en una mayor amplitud y duración de la vía de activación de Nrf2. La activación de la vía

Nrf2 promueve la tumorigénesis al permitir una proliferación agresiva y metástasis (115, 116) y conferir resistencia terapéutica a los estándares actuales de atención, incluyendo quimioterapia e inmunoterapia (117, 118). Estas células cancerosas son altamente dependientes de la actividad de Nrf2 para su supervivencia y proliferación, un estado denominado adicción a Nrf2 (119, 120). En algunos tipos de cáncer se han encontrado niveles elevados de Nrf2, como el de cabeza y cuello (121), vesícula (122), pulmón (123) y páncreas (124). Varios estudios han demostrado que la adicción a Nrf2 de las células cancerosas esta respaldada por actividades metabólicas únicas (115). Por lo tanto, los cánceres adictos a Nrf2 adoptan un metabolismo altamente especializado que favorece la síntesis de glutatión que es esencial para la potente capacidad antioxidante y de desintoxicación, que no se puede lograr con un simple activación de Nrf2 (125). Mientras que Nrf2 contribuye principalmente a la función antioxidante y a la desintoxicación en células quiescentes normales, en células proliferantes Nrf2 contribuye a la reprogramación del metabolismo, facilitando la vía de las pentosa fosfato y la síntesis de serina (126). El incremento en la síntesis de nucleótidos de purina a través de la vía de las pentosas fosfato resulta ventajoso para la proliferación celular y la tumorigénesis de células cancerosas adictas a Nrf2 (126). Esto indica que la desregulación del sistema Nrf2/Keap1, podría proteger a las células contra los efectos deletéreos del estrés oxidativo, confiriéndole a su vez, propiedades de mejoramiento de la proliferación y un fenotipo resistente a drogas y a los efectos de la radiación ionizante (127, 128). En ciertos tipos de cáncer; Nrf2 actuaría entonces como un “arma de doble filo” (129) y que lo convierte en un blanco de estudio para incrementar la efectividad de los tratamientos contra el cáncer.

Todos los aspectos que hacen parte del microambiente tumoral tratados aquí influyen en los diferentes tratamientos antitumorales, afectando su efectividad y reduciendo el pronóstico de supervivencia de los pacientes con cáncer. Por lo tanto se deben tener en cuenta a la hora de analizar posibles estrategias tanto de

diagnóstico como de tratamiento. En nuestro trabajo se propone el análisis *in vitro* de dos aspectos claves del microambiente tumoral como son la hipoxia y la heterogeneidad celular y su influencia en la expresión de la proteína NIS, la cual tiene un futuro promisorio en el diagnóstico y tratamiento antitumoral.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto de la hipoxia y la heterogeneidad celular (células en estado proliferativo o quiescente) sobre la actividad de la proteína NIS en un modelo *in vitro* de células de adenocarcinoma de colon establemente transfectadas con el gen de la proteína NIS (HT29NIS).

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**3.2.1.** Identificar el efecto de la hipoxia y los cambios en la proliferación celular sobre la expresión, localización y función de la proteína NIS en el modelo *in vitro*.

**3.2.2.** Identificar cambios en la captación de glucosa y en la expresión de genes claves del metabolismo glucolítico en el modelo *in vitro*, inducidos por los cambios en la proliferación celular y la hipoxia.

**3.2.3.** Estudiar la producción de ROS y la activación de la vía de respuesta a estrés celular Nrf2 en el modelo *in vitro*, asociados a los cambios en la proliferación celular y la hipoxia.

**3.2.4.** Identificar cambios en el comportamiento metabólico debidos a la transfección del gen de NIS en células HT29WT.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cómo aspectos del microambiente tumoral como la hipoxia y la heterogeneidad celular afectan la actividad de la proteína NIS?

## **5. CAPÍTULO I: EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA HETEROGENEIDAD CELULAR (CÉLULAS EN ESTADO PROLIFERATIVO O QUIESCENTE) SOBRE LA EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA NIS**

### **5.1. OBJETIVO**

Identificar el efecto de la hipoxia y los cambios en la proliferación celular sobre la expresión, localización y función de la proteína NIS en el modelo *in vitro*.

### **5.2. METODOLOGÍA**

Se describe la metodología propuesta que pretendía imitar *in vitro* las condiciones microambientales que determinan la heterogeneidad tumoral que se encuentra en los tumores *in vivo*, como las relacionadas con la variación en la concentración de oxígeno y las diferencias en el estado celular de las subpoblaciones celulares (células proliferantes y quiescentes). Se utilizó como modelo de estudio la línea celular HT29NIS, y su línea de origen HT29WT (wild type por su sigla en inglés) como control, para analizar los efectos potenciales ligados a la expresión de NIS. Las células se cultivaron en condiciones de hipoxia (1% de Oxígeno por 24 h) o normoxia (21% de oxígeno por 24h), para analizar las condiciones más extremas de variación en la oxigenación tumoral. De igual forma se realizó una comparación entre células proliferativas, las cuales tiene una tasa normal de división celular y células quiescentes que corresponden a células en estado de reposo reversible no proliferativo, para intentar imitar la heterogeneidad celular normalmente presente en el tumor. Se analizaron las diferencias en la expresión, localización y función de la proteína NIS.

### 5.2.1. Cultivo celular

En este estudio se utilizaron como modelos la línea celular HT29WT (ATCC HTB-38, LGC Standards, Molsheim, Francia), derivada de carcinoma de colon, y la línea HT29NIS, que corresponde a un clon de la línea HT29WT establemente transfectado con el vector de expresión eucariótico pcDNA3.1-mNIS (NIS de ratón) (4). Los clones estables fueron seleccionados tres días después de la transfección adicionando al medio geneticina (G418, Disulfate salt solution, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia). Se verificó la expresión de NIS en los clones establemente transfectados mediante la captación  $^{125}\text{I}$ , se hicieron análisis por western blot y experimentos de inmunotinción, que mostraron una alta localización de la proteína NIS en la membrana plasmática. Se seleccionó un clon de HT29NIS para los experimentos de toma de imágenes *in vivo* (130, 131).

Las dos líneas celulares HT29WT y HT29NIS se cultivaron en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Gibco 31966-021), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Fetal Bovine Serum, PAA, Gold A11-151), 10 mM L-glutamina y 0.01 mg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, Francia) en una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$ . A la línea HT29NIS se adicionó 0.2 mg/mL del antibiótico G418, para mantener la selección del clon transfectado de HT29NIS como fue descrito previamente por Richard-Fiardo y colaboradores (130).

### 5.2.2. Células proliferativas y quiescentes

Las células proliferativas se obtuvieron sembrando  $2 \times 10^6$  células de las líneas HT29WT y HT29NIS (confluencia ~10%) con medio DMEM suplementado con FBS al 10% por 24h en cajas de Petri de 10 cm. Las células quiescentes se obtuvieron sembrando  $10 \times 10^6$  células de las líneas HT29WT y HT29NIS (confluencia ~50%) con medio DMEM suplementado con FBS al 0.1% por 48h, también en cajas de Petri de 10 cm (29).

### **5.2.3. Inducción de hipoxia**

Las células se crecieron en condiciones de hipoxia (1% de oxígeno por 24 horas en la cámara de hipoxia 200 INVIVO2 Hypoxia Workstation, Ruskin Technology Ltd, UK) o normoxia (21% de oxígeno), para imitar las condiciones de oxigenación variable en los tumores.

### **5.2.4. Ensayos de viabilidad celular**

Para determinar el efecto de la hipoxia y la heterogeneidad celular sobre la viabilidad de las células HT29NIS y HT29WT, se utilizó la técnica de tinción con Azul de Tripán (Gibco 15250-061), el conteo celular se realizó en la cámara de Neubauer como lo describe Sabit y colaboradores (132). Resumiendo, la suspensión celular se diluyó 1:10 con el colorante, se incubó por 3 minutos y luego se cargó en la cámara Neubauer. Las células se contaron bajo el microscopio invertido. Las células brillantes no coloreadas se consideraron viables, mientras que las células teñidas de azul se consideraron muertas.

### **5.2.5. Análisis de la expresión de la proteína NIS**

Las variaciones en la expresión de la proteína NIS, en el modelo *in vitro*, se determinaron por Western Blot, y los posibles cambios en su localización subcelular se determinaron por inmunofluorescencia. Para la realización del western blot se prepararon los extractos proteicos totales de células HT29WT y HT29NIS proliferantes y quiescentes bajo normoxia e hipoxia usando el buffer de lisis RIPA (10mM tris-HCl, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, en presencia de inhibidores de proteasa cOmplete (Sigma-Aldrich)), los extractos proteicos se cuantificaron usando el método de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia), se midió la absorbancia a 600 nm en el espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer, Hamburg, Germany). Se corrieron geles de electroforesis SDS-PAGE al 10%, se

cargaron 40µg de proteína por pozo, se transfirieron las proteínas a la membrana PVDF (Dry iBLOT2 blotting system y Regulate Novex PVDF Stacks, ref IB24001, Life Technologies, USA). Las membranas se saturaron por 45 minutos en buffer de bloqueo (2g/L I-Block, Thermo Fisher Scientific) y luego se incubaron por 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario. La inmunodetección de NIS fue realizada usando el anticuerpo policlonal casero 25 diluido (1:2000) (133). Como control de carga se detectó  $\beta$ -actina usando un anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -actina producido en ratón (Sigma A5316). Los anticuerpos primarios fueron diluidos en PBST (PBS1X (Gibco 14190-094), 0.05% v/v de Tween 20) con leche al 5 % (anti-NIS 1:2.000 y anti- $\beta$ -actina 1: 7.500). Los blots fueron lavados en PBST, un lavado rápido, y 5 lavados de 10 minutos cada uno para remover uniones inespecíficas. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP (Horseradish Peroxidase) y sus diluciones fueron: para la detección de NIS se usó el anticuerpo de Pierce 31430 goat antimouse IgG (H + L) en dilución 1:10.000 en PBST con leche al 5% y para la detección de  $\beta$ -actina se usó el anticuerpo de Pierce 31460 goat anti-rabbit IgG (H + L) en dilución 1: 5.000 en PBST con leche al 5%. Los blots fueron incubados con los anticuerpos secundarios por 1 hora sobre plancha de agitación a temperatura ambiente y luego se lavaron con PBST como se describió para los anticuerpos primarios. La inmunoreactividad fue detectada usando el kit ECL (GE Healthcare RPN2232). Los westerns blots fueron analizados usando el equipo LAS-3000 (FujiFilm, Tokyo, Japan) para capturar imágenes de quimioluminiscencia. Luego los westerns blots se cuantificaron usando el software Image J Version 1.50 g. Los datos de cuantificación son presentados como la relación densitométrica de la intensidad de las bandas de la proteína de interés (calculada por Image J) dividida entre la intensidad de la banda de  $\beta$ -actina.

#### **5.2.6. Captación de yoduro por la proteína NIS**

Los cambios en la función de la proteína NIS se determinaron midiendo los niveles de captación de yoduro, utilizando un radioisótopo de yoduro ( $^{125}\text{I}$ ) como marcador.

Células HT29WT y HT29NIS proliferantes y quiescentes bajo normoxia e hipoxia se incubaron por 30 minutos en medio de cultivo suplementado con 30  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (50Ci/mol Perkin Elmer Courtaboeuf, Francia). La captación de yoduro fue detenida adicionando medio de cultivo DMEM frío (previamente incubado a 4°C), seguido de dos lavados con el mismo medio frío. Las células fueron permeabilizadas con etanol 90% frío (previamente incubado a 4°C) y la radioactividad de cada muestra se mide en un contador gamma ( $\gamma$ ) (BioTraces, Herndon, Virginia, USA). Para verificar que la captación de yoduro se realizó a través de la proteína NIS, se determinaron los niveles de captación de  $^{125}\text{I}$  en las líneas celulares cultivadas en presencia de perclorato de sodio ( $\text{NaClO}_4$ , Sigma 410241), un conocido inhibidor competitivo de esta proteína.

### **5.2.7. Localización subcelular de la proteína NIS**

La localización subcelular de la proteína NIS se realizó mediante inmunofluorescencia. Para este ensayo se usaron células HT29NIS proliferativas y quiescentes en condiciones de normoxia e hipoxia, como control se usaron células HT29WT. Las células se cultivaron sobre cubreobjetos (coverslips) bajo las condiciones mencionadas arriba, después del periodo de incubación fueron lavadas con PBS1X, se fijaron en PBS1X con paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 0.02% por 20 minutos a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en metanol al 1% por 5 minutos a temperatura ambiente. Para evitar la autofluorescencia, las células se incubaron con cloruro de amonio 50mM ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Las células se lavaron e incubaron por 30 minutos en PBS que contiene albúmina sérica bovina 1% (BSA por su sigla en inglés) por 30 minutos a temperatura ambiente sin agitación. Las células se lavaron con PBS1X, se incubaron con el anticuerpo primario para NIS (anticuerpo casero 25; dilución 1:1000) (133), toda la noche a 4°C, luego se lavaron con PBS1X, se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor 488 (Invitrogen A11001; dilución 1:1000) protegidas de la luz, luego, se lavaron con PBS1X. Para teñir los núcleos se

incubaron con Hoechst 33342 por 1 minuto en oscuridad, se lavaron con PBS1X, luego, se adicionó fluoromount (Sigma F4680) como medio de montaje y se dejaron secar por 1 hora, finalmente, las células fueron analizadas en el Cytation 3 imaging reader (BioTek instruments, Inc.).

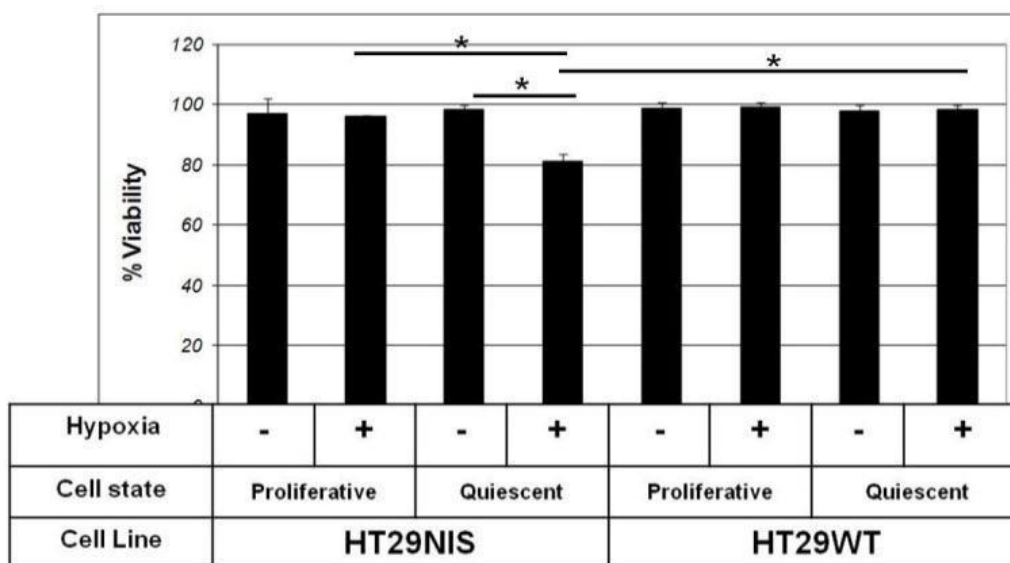
### **5.3. RESULTADOS**

#### **5.3.1. Establecimiento de las condiciones *in vitro* que imitan el microambiente tumoral**

En este estudio se usa como modelo la línea celular HT29NIS la cual corresponde a un clon de la línea HT29WT establemente transfectada con el gen de NIS de ratón. Como se describió en la metodología, las células HT29NIS y HT29WT se cultivan en confluencias de 10% y 50% y en concentraciones de suero fetal bovino de 0.1% y 10% para tener los estados proliferativos y quiescentes respectivamente. Se cultivan en concentraciones de oxígeno de 21% y 1% para ajustar las condiciones de normoxia e hipoxia respectivamente.

#### **5.3.2. Determinación de la viabilidad celular en las condiciones establecidas**

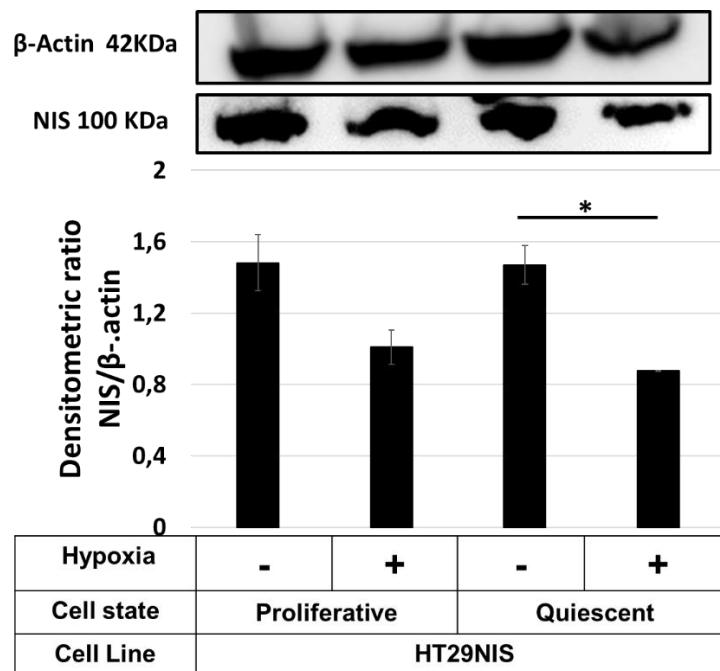
Con el fin de analizar el efecto de las condiciones de cultivo en la viabilidad celular se utilizó la técnica de tinción con azul de tripán y el conteo en la cámara de Neubauer. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2, donde se detecta una reducción significativa de la viabilidad (19%) para las células HT29NIS quiescentes en hipoxia. Para las otras condiciones utilizadas en el estudio no se observan cambios significativos.



**Figura 2. Porcentaje de viabilidad de células HT29WT silvestres y HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia.** Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SD (n=3). Las diferencias significativas corresponden a un \*  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

### 5.3.3. Efecto de la heterogeneidad celular y la hipoxia en la expresión de la proteína NIS

Para evaluar el efecto de la heterogeneidad celular y de la hipoxia en la expresión de la proteína NIS se realizó Western Blot a partir de extractos proteicos totales obtenidos de células HT29NIS proliferantes y quiescentes sometidas a normoxia e hipoxia. Se encuentra que la expresión de la proteína NIS se reduce (1.5 veces) en células HT29NIS proliferantes en hipoxia comparado con las células proliferantes en normoxia (Figura 3). La disminución relacionada a la condición de hipoxia fue ligeramente más importante (1.7 veces) en células quiescentes. No se encontraron diferencias significativas entre células proliferativas y células quiescentes. Estos resultados indican que la hipoxia, pero no la quiescencia induce una disminución de la expresión de la proteína NIS en células HT29NIS.

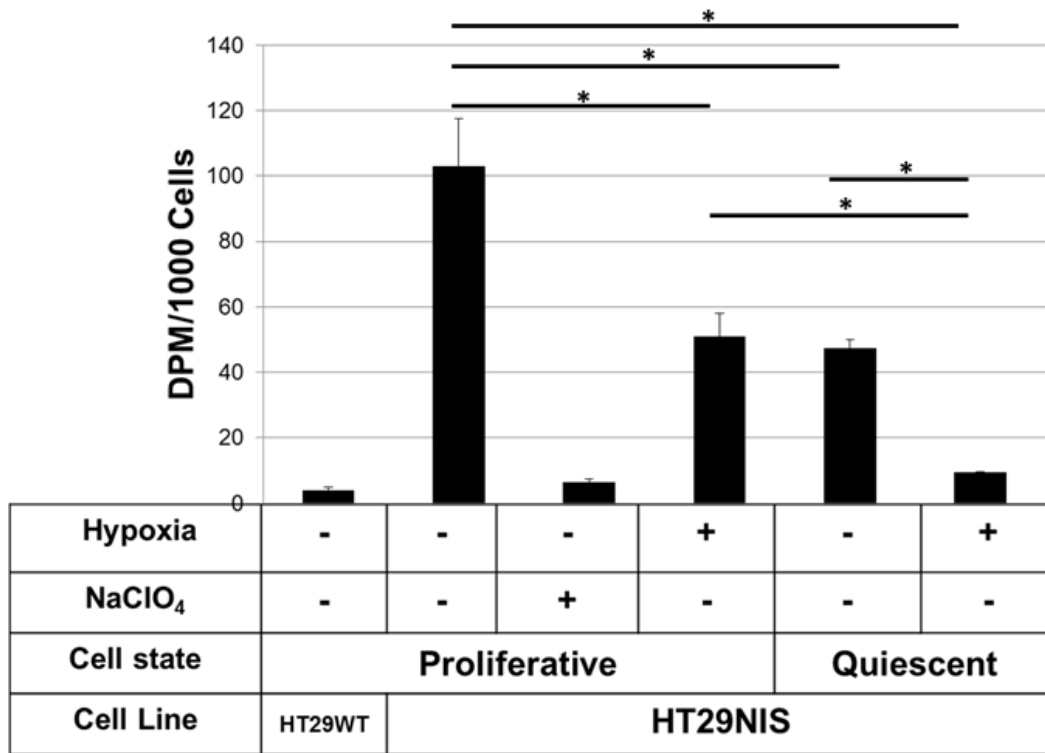


**Figura 3. Análisis de la expresión de NIS en células HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia mediante western blot.** Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SD (n=3). Las diferencias significativas corresponden a un \* p <0.05. El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

#### **5.3.4. Efecto de la heterogeneidad celular y la hipoxia en la actividad captadora de yoduro de la proteína NIS**

Para determinar la actividad de la proteína NIS, se analizó la capacidad captadora de yoduro en las células HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia. Como se muestra en la figura 4, la hipoxia reduce significativamente (50.4%) la capacidad captadora de yoduro de las células proliferantes. Además, las condiciones de quiescencia utilizadas en este estudio inducen también una disminución (54%) de la captación de yoduro en normoxia. Finalmente, la captación de yoduro fue fuertemente reducida (91 %) en las células quiescentes bajo hipoxia. En conclusión, los resultados indican que la hipoxia y la quiescencia inducen

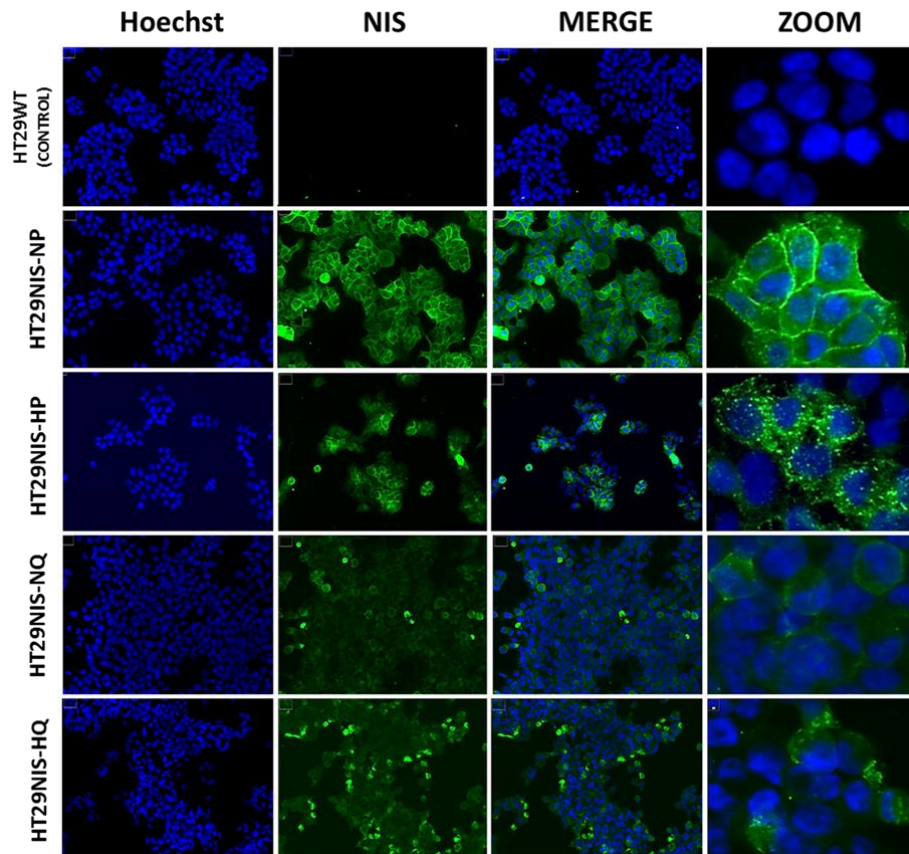
deterioro de la capacidad captadora de yoduro de la proteína NIS en células HT29NIS.



**Figura 4. Análisis de la captación de <sup>125</sup>I por 1000 células (en desintegraciones por minuto, DPM) de células HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia.** Las células HT29WT que no expresan NIS son usadas como control negativo de captación y se usó el perclorato (NaClO<sub>4</sub>) como inhibidor competitivo de la proteína NIS. Los resultados mostrados corresponden al promedio ± SD (n=3). \* Indica diferencias significativas con un valor de p<0.05. El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

### **5.3.5. Efecto de la heterogeneidad celular y la hipoxia en la localización subcelular de la proteína NIS**

Para determinar el efecto de la heterogeneidad celular y la hipoxia en la localización subcelular de la proteína NIS, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. En la figura 5 se muestra imágenes representativas que muestran los resultados obtenidos. Las células HT29NIS proliferativas en normoxia (HT29NIS-NP) presentan alta expresión de la proteína NIS localizada principalmente a nivel de la membrana citoplasmática, mientras que en las células HT29NIS proliferativas en hipoxia (HT29NIS-HP), la proteína NIS fue localizada predominantemente en el citosol y acumulada en áreas intracelulares. En células quiescentes en normoxia (HT29NIS-NQ), la inmunotinción específica de NIS fue distribuida en el citosol de las células y principalmente sobre la membrana plasmática. Finalmente, para las células quiescentes en hipoxia (HT29NIS-HQ), la proteína NIS se observa difusa en el citosol y acumulada en áreas intracelulares. Casi nada de inmunotinción específica para la proteína NIS fue observada en la membrana plasmática. En conclusión, los resultados indican que la hipoxia y la quiescencia alteran la localización subcelular de la proteína NIS en células HT29NIS.



**Figura 5. Localización subcelular de la proteína NIS mediante inmunofluorescencia en células HT29NIS proliferativas en normoxia (HT29NIS-NP), HT29NIS proliferativas en hipoxia (HT29NIS-HP), células HT29NIS quiescentes en normoxia (HT29NIS-NQ) y células HT29NIS quiescentes en hipoxia (HT29NIS-HQ). Como control negativo se usaron células HT29WT que no expresan NIS. Se muestra imágenes representativas que muestran los resultados obtenidos.**

#### **5.4. DISCUSIÓN RESULTADOS**

Desde hace décadas, la captación de yoduro radioactivo mediada por NIS es una herramienta terapéutica útil para las células metastásicas en el cáncer de tiroides. Estudios recientes sugieren que la radioterapia basada en NIS podría ser un

enfoque muy prometedor para las terapias contra el cáncer no tiroideo. A pesar de estos usos clínicos de la captación de yoduro mediada por NIS en cancerología, los efectos del microambiente tumoral sobre NIS son poco conocidos. Por lo tanto, en este estudio, nosotros analizamos los efectos de la hipoxia y la quiescencia en la actividad, expresión y localización subcelular de la proteína NIS. El modelo propuesto está basado en la línea celular de adenocarcinoma de colon HT29 (HTB-38, ATCC), establemente transfectada con el gen de NIS de ratón (4), bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), incluido en el vector de expresión eucariótico pcDNA3.1; este promotor es usado porque promueve alta expresión y no es regulado por TSH. Adicionalmente, se tiene una expresión prolongada de NIS que es muy útil para estudios de terapia, donde el efecto no se puede observar en un corto tiempo. Además, este modelo permite el análisis de la regulación postranscripcional de NIS, que puede afectar su traducción, traslocación y su función como transportador. Kim y sus colaboradores (134) observaron que la doxorubicina mejora la expresión del transgén bajo el control del promotor CMV en la línea celular de carcinoma anaplásico de tiroides humano transfectado con un plásmido que codifica hNIS. Los autores asociaron la activación del promotor CMV con la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Curiosamente, la hipoxia y la quiescencia inducen NF- $\kappa$ B (135). En la dirección opuesta, Wendland y sus colaboradores (136) informaron que la expresión de la proteína bajo el control del promotor CMV podría reducirse por hipoxia. Teniendo en cuenta estos reportes es necesario no descartar posibles efectos de las condiciones usadas en este estudio que puedan modificar la actividad del promotor. Dichos modelos celulares permitieron combinar experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando las mismas células. Los experimentos *in vivo* realizados por el Grupo TIRO mostraron que la captación mediada por NIS y su localización en la membrana plasmática son alteradas en áreas intratumorales de los xenoinjertos (Figura 1), dando lugar a una inesperada distribución heterogénea en la incorporación de yoduro y en la expresión de NIS, probablemente asociada con factores del microambiente tumoral. Mediante los experimentos *in vitro* realizados en este estudio se pretendió imitar las condiciones

microambientales que determinan la heterogeneidad tumoral que se encontró en los tumores *in vivo*, especialmente las relacionadas con la variación en la concentración de oxígeno (normoxia e hipoxia) y las diferencias en las tasas de proliferación de las subpoblaciones celulares (células en estado proliferativo y células en estado quiescente). La necesidad de establecer un modelo *in vitro* que permita ajustar las condiciones que ocurren en el microambiente tumoral *in vivo* radica en la reducción de la complejidad del microambiente tumoral y facilita el control de los factores que se desean analizar. Los experimentos *in vitro* con células HT29NIS permiten estudiar individualmente los efectos de la hipoxia y la quiescencia; que de acuerdo con el análisis *in vivo* son componentes claves del microambiente tumoral que podrían modificar la expresión y función de la proteína NIS.

El primer paso en el análisis con el modelo *in vitro* fue determinar la viabilidad celular en las condiciones de estudio. La figura 2 muestra una reducción significativa de la viabilidad en células HT29NIS quiescentes en hipoxia. La reducción observada en la proliferación de células tumorales en condiciones de hipoxia ya ha sido reportada previamente y está dada principalmente por la reprogramación del metabolismo glucolítico (137, 138). Coller et al (2006) (29), reportan que el estado de quiescencia induce la detención reversible del crecimiento o proliferación celular. Igualmente, otros estudios reportaron que la hipoxia influencia el ciclo celular induciendo un estado de quiescencia, cuando las condiciones ambientales, tales como la presión de oxígeno, son desfavorables (139, 140).

El análisis de la expresión de la proteína NIS mediante Western Blot (Figura 3), mostro que la condición de hipoxia, pero no la quiescencia induce reducción de la expresión de la proteína NIS. En el análisis de la función captadora de yoduro de NIS (figura 4) se observó que tanto la hipoxia como la quiescencia reducen la capacidad captadora de yoduro de la proteína NIS. Para verificar los resultados anteriores se determinó la localización subcelular de NIS en las condiciones de estudio, los resultados de este ensayo se muestran en la figura 5, donde se pueden observar imágenes representativas de la localización subcelular de NIS obtenidas

por inmunofluorescencia, a partir de estas imágenes se puede deducir que tanto la hipoxia como la quiescencia alteran la localización subcelular de la proteína NIS, generando disminución de la expresión de la proteína en la membrana y promoviendo su acumulación en áreas intracelulares.

## **6. CAPÍTULO II: CAMBIOS EN EL METABOLISMO GLUCOLÍTICO EN EL MODELO *IN VITRO* INDUCIDOS POR LA HETEROGENEIDAD CELULAR Y LA HIPOXIA**

### **6.1. OBJETIVO**

Identificar cambios en la captación de glucosa y en la expresión de genes claves del metabolismo glucolítico en el modelo *in vitro*, inducidos por los cambios en la proliferación celular y la hipoxia.

### **6.2. METODOLOGÍA**

La metodología propuesta para el desarrollo de este objetivo busca evaluar los cambios que se presentan en el metabolismo glucolítico de las células HT29NIS en hipoxia y quiescencia al compararlo con las células HT29WT. Se define si los cambios son generados por las condiciones de hipoxia y/o quiescencia o si se producen por la transfección del gen de la proteína NIS a las células HT29WT.

#### **6.2.1. Captación de glucosa y potencial redox citosólico**

Se describen las dos metodologías para captación de glucosa y el potencial redox citosólico. Los dos ensayos se realizan simultáneamente, en esta parte analizamos

la captación de glucosa y en el tercer objetivo analizamos el potencial redox citosólico, el efecto del yoduro de sodio (NaI), del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el de la N-acetil-L-cisteína (NAC).

Los cambios en el metabolismo glucolítico celular inducidas por las condiciones de quiescencia e hipoxia en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes, se determinaron midiendo los niveles de captación de glucosa, y la expresión de proteínas asociadas al metabolismo glucolítico. La determinación de los niveles de captación de glucosa se realizó a través de imágenes de fluorescencia, utilizando la sonda 2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino-2deoxyglucose (2-NBDG, 72987-1MG, Sigma), una forma fluorescente y no metabolizable de la glucosa.

También en estas mismas células y en las mismas condiciones se detectó el potencial redox citosólico usando una sonda fluorescente RedoxSensor™ Red CC-1 (Molecular Probes R-14060). La sonda no fluorescente es oxidada en el citosol a un producto rojo fluorescente el cual se acumula en la mitocondria, o la sonda no fluorescente es transportada a los lisosomas donde este es oxidado. La distribución diferencial del producto oxidado entre la mitocondria y los lisosomas parece depender del potencial redox del citosol. En células proliferantes, predomina la tinción mitocondrial; mientras que en células inhibidas por contacto o quiescentes, la tinción principal es lisosomal.

Adicionalmente, en estas mismas células se tiñeron los núcleos usando Hoechst 33342 (B2261-100MG, Sigma), este componente es permeable a la membrana celular, tiñe fluorescente el DNA con baja toxicidad, se intercala en regiones de adenina-timina (A-T) del DNA.

Después de la incubación con las sondas fluorescentes se obtuvieron 100 imágenes por cada condición mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss), las cuales se analizaron usando el software ImageJ.

#### **6.2.1.1. Preparación de las células quiescentes**

En dos platos de cultivo negros de 24 pozos con fondo claro ( $\mu$ -Plate 24 well, Ibidi Ordering Number 82406, Germany) se sembraron 200.000 células HT29NIS o HT29WT en 1 mL de DMEM suplementado con FBS al 10%, se incubaron por 24h a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión celular. Después de las 24 horas de incubación, se removió el medio, se lavaron 2 veces con PBS1X y se adicionó DMEM con FBS al 0.1%, se incubaron por 48 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Después de 48h de incubación, se adicionó a los pozos (Figura 6) 10  $\mu$ L del stock de N-acetil-L-cisteína (0.5M) para obtener una concentración final de 5mM. Igualmente, a los pozos (Figura 6) se les adicionó 5  $\mu$ L del stock de yoduro de sodio 1mM (NaI) para alcanzar una concentración final de 5  $\mu$ M. Se incubaron los dos platos por 30 minutos a 37°C en normoxia (21% de oxígeno). Después de los 30 minutos de incubación uno de los platos fue transferido a la cámara de hipoxia y se incubó al 1% de oxígeno a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. El otro plato se incubó por 24 horas en normoxia a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **6.2.1.2. Preparación de las células proliferantes**

Este ensayo con las células proliferantes se preparó al tercer día de montar el ensayo con las células quiescentes descrito en el ítem anterior. En dos platos de 24 pozos de las mismas características usados con las células quiescentes, se sembraron 100.000 células HT29NIS o HT29WT en 1 mL de DMEM suplementado con FBS al 10%. Se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión celular. Después de las 24 horas de incubación, se adicionó a los pozos (Figura 6) 10  $\mu$ L del stock de N-acetil-L-cisteína (0.5M) para obtener una concentración final de 5mM, este compuesto funciona como antioxidante neutralizando especies reactivas de oxígeno, se usa con el fin de ver el efecto en el metabolismo glucolítico. Igualmente, a los pozos mostrados en la figura 6 se les adicionó 5  $\mu$ L del stock de yoduro de sodio 1mM (NaI) para alcanzar una concentración final de 5  $\mu$ M, este compuesto se usó con el fin de evaluar el efecto

de la presencia de yoduro en el metabolismo glucolítico, teniendo en cuenta que las células HT29NIS captan yoduro, y su efecto en el potencial redox celular, sabiendo que el yoduro puede actuar como oxidante o antioxidante, dependiendo de las condiciones celulares. Se incubaron los dos platos por 30 minutos a 37°C en normoxia (21% de oxígeno). Después de los 30 minutos de incubación uno de los platos fue transferido a la cámara de hipoxia y se incubó al 1% de oxígeno a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. El otro plato se incubó por 24 horas en normoxia a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **6.2.1.3. Captación de glucosa y potencial redox citosólico en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia**

El día del experimento a los pozos mostrados en la figura 6 (plato incubado en normoxia) se les adicionó 5µL del stock de peróxido de hidrogeno 1M (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para obtener una concentración final de 5mM, el plato se incubó por 1h a 37°C en normoxia, este componente se adicionó con el fin de tener un control positivo del potencial redox, generando un ambiente oxidante a nivel celular. Luego, se retiró el medio a todos los pozos y se lavaron dos veces con PBS 1X frio. Se adicionaron 250 µL de una mezcla preparada en PBS 1X que contiene las sondas fluorescentes a una concentración final indicada 2-NBDG (200mM), Redox Sensor Red CC-1 (5µM) y Hoechst 33342 (0.1µg/mL). Esta adición se hizo en oscuridad para evitar la degradación de las sondas fluorescentes. La adición de la mezcla de sondas se hizo de acuerdo con lo mostrado en la figura 6. El plato se cubrió con papel aluminio y se incubó a 37°C por 15 minutos. Terminada la incubación, se realizaron los siguientes pasos en oscuridad: se retiró la mezcla de sondas fluorescentes y las células se lavaron dos veces con PBS 1X frio, el cual se retiró completamente. Se adicionó a cada pozo 1 mL de DMEM libre de suero y se cubrió el plato nuevamente con papel aluminio, inmediatamente se procede a la adquisición de imágenes usando el microscopio de fluorescencia. Este procedimiento se repitió con el plato incubado en hipoxia, todos los pasos se realizaron dentro de la cámara de hipoxia.

Una diferencia de dos horas entre la adición de las sondas para cada plato es necesaria para la posterior adquisición de imágenes, esto con el fin de evitar pérdida de la actividad de las sondas en el segundo plato, lo que afectaría su cuantificación.

Normoxia					
Mixture					
With probes:					
2-NBDG+Hoechst+Redox					
NIS Cells 1X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM	NIS cells 1X10 <sup>5</sup> + H2O2 5mM	NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM
NIS Cells 1X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM	NIS cells 1X10 <sup>5</sup> + H2O2 5mM	NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM
NIS Cells 2X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM	NIS cells 1X10 <sup>5</sup> Control	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM
NIS Cells 2X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup> Control	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM

Hypoxia					
Mixture					
With probes:					
2-NBDG+Hoechst+Redox					
NIS Cells 1X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM		NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM
NIS Cells 1X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM		NIS Cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM
NIS Cells 2X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM	NIS cells 1X10 <sup>5</sup> Control	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM
NIS Cells 2X10 <sup>5</sup>	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup>	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + NAC 5mM	HT29 cells 1X10 <sup>5</sup> Control	NIS Cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM	HT29 cells 2X10 <sup>5</sup> + Nal 5µM

**Figura 6. Distribución de las células en los platos de cultivo para el ensayo con sondas fluorescentes (2NBDG, RedoxSensor Red CC-1 y Hoechts).**

### 6.2.2. Expresión de proteínas asociadas al metabolismo glucolítico

El nivel de expresión de proteínas asociadas al metabolismo de la glucosa: transportador de glucosa (GLUT1), lactato deshidrogenasa A (LDHA) y piruvato kinasa 2 (PKM2) fue determinado por Western Blot, siguiendo el procedimiento descrito para la expresión de NIS (sección 5.3.3).

Los anticuerpos primarios y las diluciones usadas fueron:

- GLUT1: Anti-SLC2A1/Glut1 Picoband™ Antibody (Boster Biological Technology, Pleasanton CA, USA, Catalog # PB9435). Dilución 1:7.500.
- PKM2: Antibody PKM2 Produc Number 3198S, Cell Signalling Technology, Inc. Dilución 1:1000.
- LDHA: Anti-LDHA antibody, ab47010, abcam, England. Dilución: 1:1.000
- $\beta$ -actina: anti- $\beta$ -actin Antibody, Sigma A5316. Dilución: 1:7.500.

Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP (Horseradish Peroxidase) y sus diluciones: Pierce 31430 goat antimouse IgGa (H + L) fue usado en dilución 1:10.000 en PBST con leche al 5% y Pierce 31460 goat anti-rabbit IgG (H + L) fue usado en dilución 1: 5.000 en PBST con leche al 5%.

### **6.2.3. Expresión de los mRNAs de genes asociadas al metabolismo glucolítico**

Se determinaron los niveles de expresión de los mRNAs que codifican para cada una de las proteínas de interés (GLUT1, PKM2 y  $\beta$ -actina) utilizando la técnica de qPCR en tiempo real. Se inició con la obtención de RNA total con Trizol (ambion, Life technologies 15596-018) de células HT29WT y HT29NIS proliferantes y quiescentes bajo normoxia e hipoxia. Luego se obtuvo el cDNA usando Superscript® First-strand Synthesis System (invitrogen18080-044). La qPCR se realizó en un equipo de tiempo real Opticon II MJ Research, se usó el fluorocromo SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems 4385612).

Los primers utilizados para cada gen de interés son:

- GLUT1: GLUT1-Directo 5'-CTTTGTGGCCTTCTTTGAAGT-3'; GLUT1-Reverso 5'- CCACACAGTTGCTCCACAT-3'. Tamaño del fragmento amplificado 167 pb, temperatura de anillaje 60°C.
- PKM2: PKM2-Directo 5'-CATGCAGCACCTCATAGC-3'; PKM2-Reverso 5'-ATGGCTTCCATGAGGTC-3'. Tamaño del fragmento amplificado 107 pb, temperatura de anillaje 60°C.

- Como control se amplificó el gen de  $\beta$ -actina, los primers usados son:  $\beta$ -actina-Directo-5'-GCCAACACAGTGCTGTCT-3';  $\beta$ -actina Reverso 5'-GGAGCAATGATCTTG ATCTT-3'. Tamaño del fragmento amplificado 112 pb, temperatura de anillaje 60°C.

### **6.3. RESULTADOS**

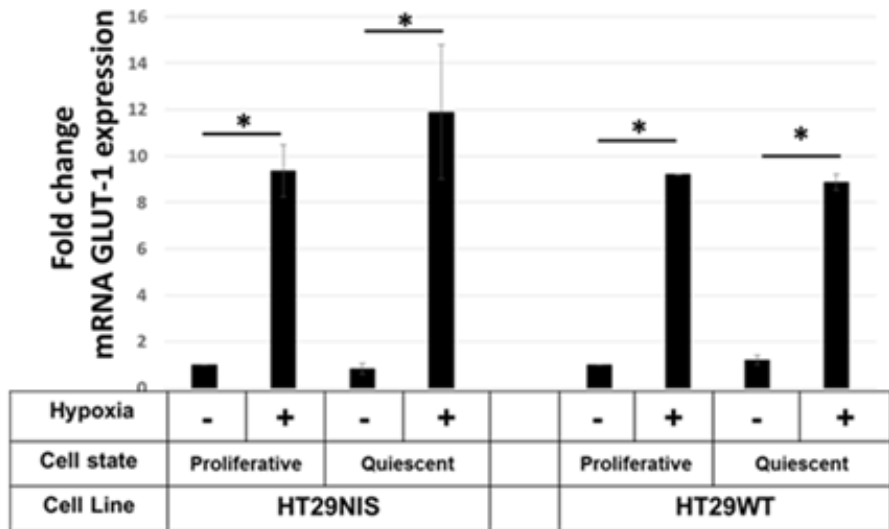
Para establecer cambios en el metabolismo glucolítico dados por las condiciones de hipoxia o heterogeneidad celular se hicieron análisis de RT-qPCR y Western Blot, para las proteínas GLUT1 (SLC2A1), PKM2, y LDHA en las células HT29NIS en estado proliferativo o quiescente y se compararon con los análisis obtenidos para las células HT29WT en las mismas condiciones, con el fin de definir si los posibles cambios podrían estar asociados con la transfección del gen de la proteína NIS en estas células.

#### **6.3.1. Cambios en la expresión de GLUT1**

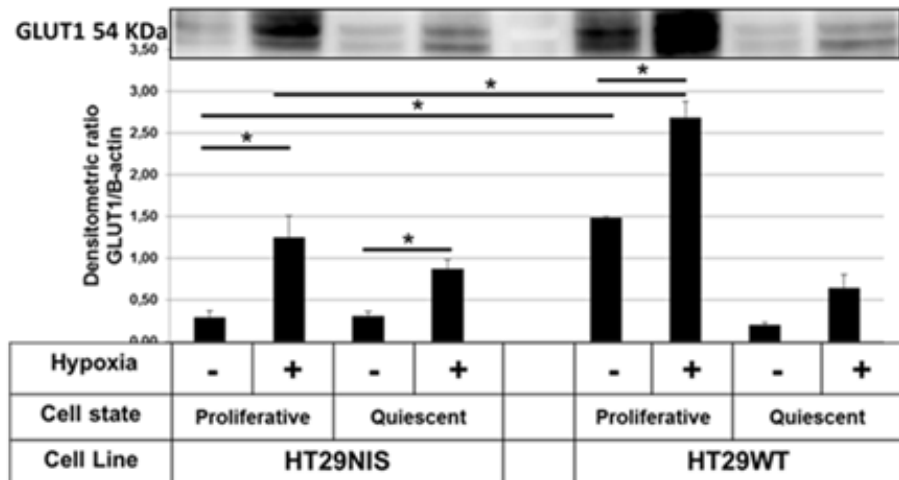
Determinamos la expresión del transportador GLUT1, debido a que esta asociado con el metabolismo glucolítico, permitiendo la captación de glucosa por las células. En la figura 7A se analizaron las veces de cambio en la expresión del mRNA y en la figura 7B la expresión proteica para GLUT1. Se encontró que en condición de hipoxia se incrementan significativamente la expresión del mRNA (9 veces en las dos líneas celulares proliferantes) y la expresión proteica dada como relación densitométrica con respecto al control de  $\beta$ -actina, se incrementa 4.2 veces en HT29NIS y 1.8 veces HT29WT en las mismas condiciones. Para las células quiescentes en hipoxia la expresión del mRNA y proteica aumentan significativamente en 11.9 y 8.9 veces y en 2.8 y 3.3 veces para HT29NIS y HT29WT respectivamente. El estado de quiescencia no ejerce efecto sobre la expresión del mRNA ni la expresión proteica de GLUT1 en las dos líneas celulares. La expresión

del mRNA no presenta cambios significativos entre las dos líneas celulares en las condiciones del estudio. En la expresión proteica si se encuentran diferencias significativas entre las dos líneas proliferantes en normoxia e hipoxia. La expresión de la proteína GLUT1 es menor en HT29NIS proliferantes en normoxia en 5 veces y 2,1 veces más baja en las mismas células en hipoxia con respecto a las HT29WT. Se concluye que en hipoxia el transportador GLUT1 se sobreexpresa en células proliferativas y quiescentes HT29NIS y HT29WT, y en células HT29NIS es menor la expresión. También se determina que el estado de quiescencia no afecta la expresión de GLUT1 en células HT29NIS.

**A**



**B**



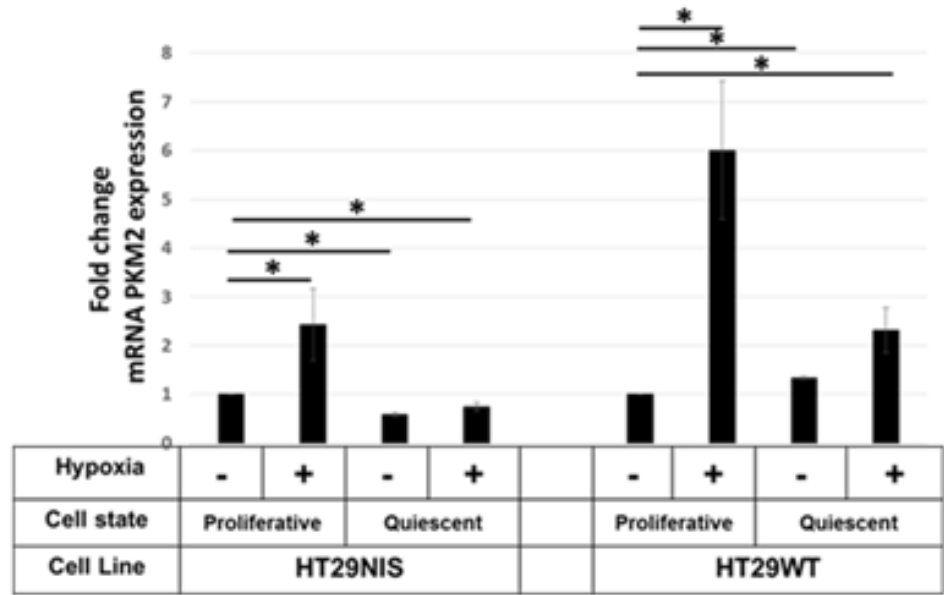
**Figura 7. Análisis de la expresión de GLUT1 en células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia: A.** Cambio en la expresión de mRNA de GLUT1 mediante qPCR en tiempo real; **B.** Expresión de la proteína GLUT1 mediante Western blot. \* Indica diferencias significativas con un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

### **6.3.2. Cambios en la expresión de PKM2**

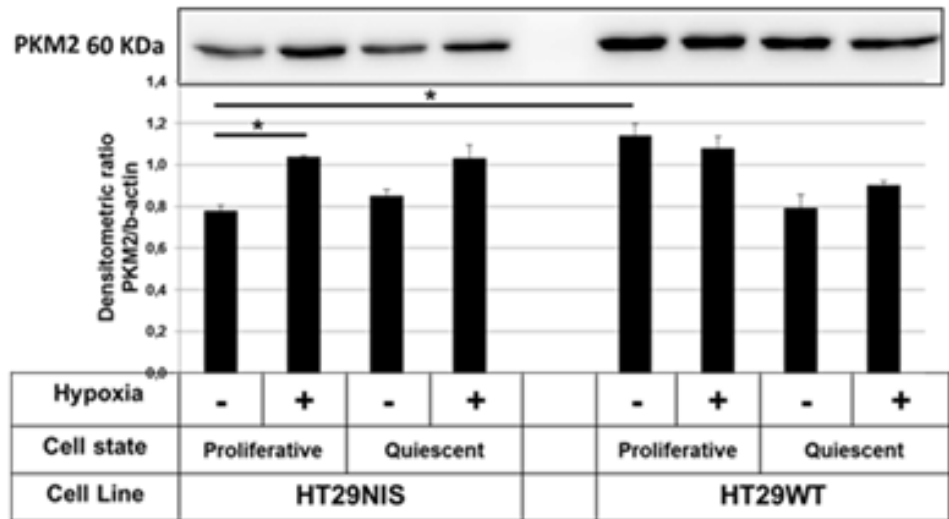
En la figura 8A y 8B se analizaron las veces de cambio en la expresión del mRNA y la expresión proteica para PKM2. Una enzima que participa en la transformación del fosfoenolpiruvato en piruvato al final de la glucólisis y un regulador muy importante de esta vía. Se encontró que en condición de hipoxia se incrementa significativamente la expresión del mRNA de PKM2 en las células HT29NIS y HT29WT proliferantes (2.1 y 5.7 veces respectivamente), la expresión proteica para las células en las mismas condiciones se comporta de manera similar al mRNA, aumenta significativamente (1.3 veces en HT29NIS y 1.5 veces en HT29WT). No se presentan cambios significativos entre las dos líneas celulares en las condiciones del estudio. En las células HT29NIS proliferativas en normoxia se reduce significativamente la expresión de la proteína PKM2, con respecto a las células HT29WT en las mismas condiciones.

Se concluye que en hipoxia la proteína PKM2 se sobreexpresa en células proliferativas y quiescentes HT29NIS, y en células HT29NIS proliferativas en normoxia se reduce la expresión, con respecto a las células HT29WT en las mismas condiciones.

**A**



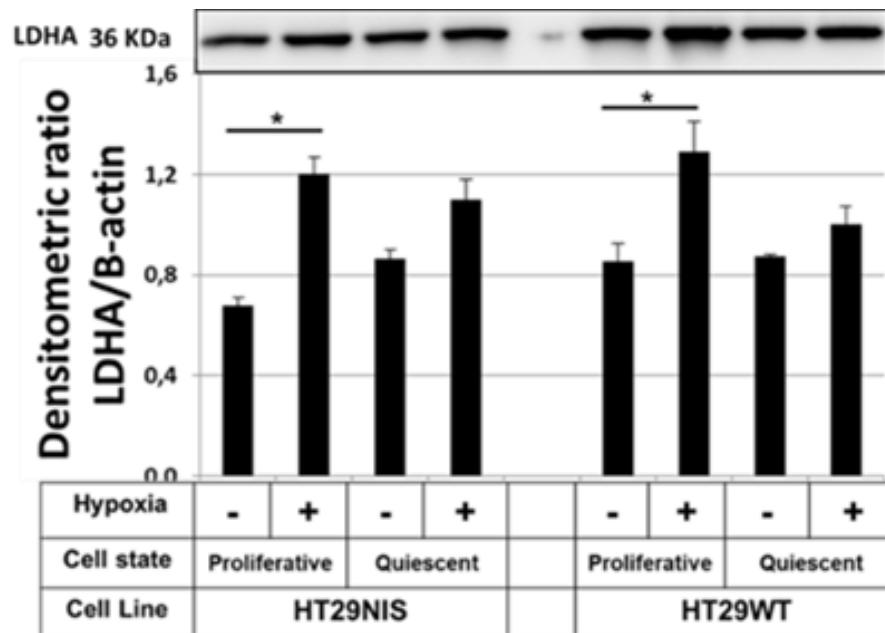
**B**



**Figura 8. Análisis de la expresión de PKM2 en células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia: A.** Cambio en la expresión de mRNA de PKM2 mediante qPCR en tiempo real; **B.** Expresión de la proteína PKM2 mediante Western blot. \* Indica diferencias significativas con un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

### 6.3.3. Cambios en la expresión de LDHA

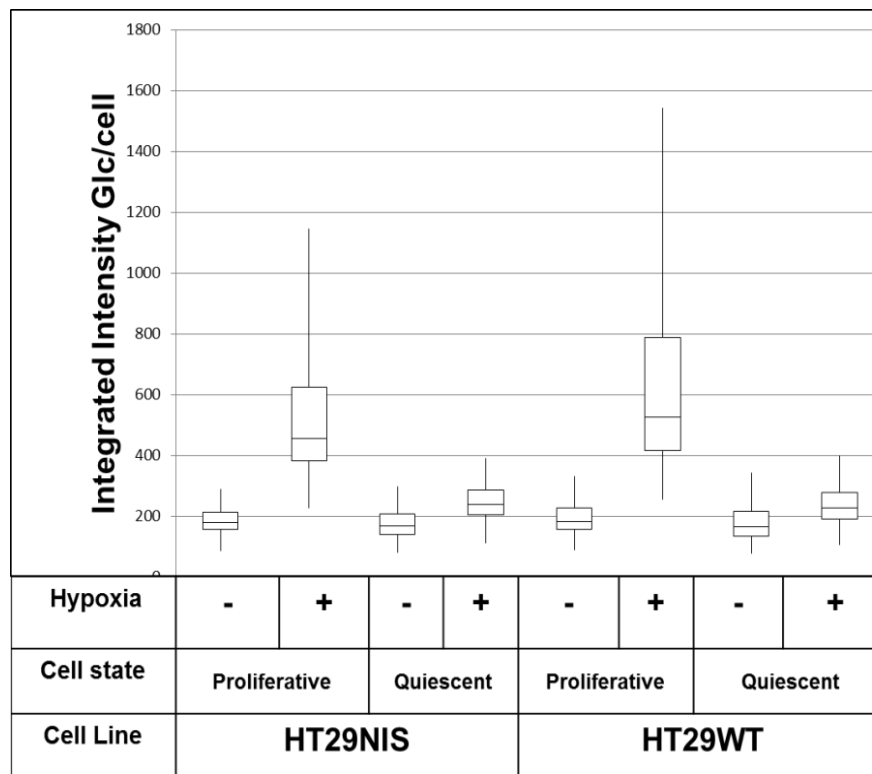
Otra enzima que se analizó fue la LDHA, que transforma el piruvato en lactato bajo condiciones anaerobias (glucólisis anaerobia). En la figura 9 se muestra el Western Blot y la cuantificación para esta proteína, la cual permite evidenciar que en condición de hipoxia se incrementa significativamente la expresión LDHA en las dos líneas celulares proliferantes (1.8 veces en HT29NIS y 1.5 veces en HT29WT). Se concluye que en la condición de hipoxia se incrementa la expresión de la proteína LDHA en las células HT29NIS y HT29WT. El estado quiescente no tiene efecto en la expresión de esta proteína.



**Figura 9. Análisis de la expresión de LDHA en células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia:** Expresión de la proteína LDHA mediante Western blot. \* Indica diferencias significativas con un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

#### **6.3.4. Captación de glucosa**

Para analizar las diferencias en el metabolismo glucolítico, es importante determinar la captación de glucosa en las condiciones de estudio. En este ensayo las células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes después de ser sometidas a hipoxia y normoxia, se incuban inmediatamente con la sonda fluorescente, manteniendo las condiciones de hipoxia y normoxia iniciales. Después de la incubación con la sonda fluorescente se toman las imágenes para cada condición (100 imágenes por pozo, con duplicado de cada condición). El análisis de las imágenes es mostrado en la figura 10, donde se puede ver que la captación de glucosa se incrementó en un 60.66% en las células HT29NIS proliferativas en hipoxia comparado con las mismas células en normoxia. En las células HT29NIS quiescentes en hipoxia el incremento fue de 29.60% comparado con las mismas células en normoxia. Para las células HT29WT proliferativas en hipoxia el incremento en la captación de glucosa fue de 65.36% al compararlo con las mismas células en normoxia, mientras que para las células HT29WT quiescentes en hipoxia el incremento fue de 27.40% al compararlo con las mismas células en normoxia. Al comparar la captación de glucosa entre las células HT29NIS y HT29WT, la diferencia más importante se encontró en las células HT29NIS proliferativas en hipoxia, en las cuales la captación se redujo en 13.46% comparado con las células HT29WT en las mismas condiciones. Se concluye que en condición de hipoxia la captación de glucosa se incrementa en las dos líneas celulares proliferativas y quiescentes. También, Las células HT29NIS proliferativas en hipoxia captan menos glucosa que las células HT29WT en las mismas condiciones.



**Figura 10. Diagrama de cajas para la captación de glucosa de las células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia.** La determinación se realiza a través de imágenes de fluorescencia, utilizando la sonda 2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3diazol-4-ylamino-2-deoxyglucose (2-NBDG). Se muestran los resultados obtenidos para los duplicados de cada condición. Después de la incubación con la sonda fluorescente se obtuvieron aproximadamente 100 imágenes por cada condición mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss), las cuales se analizaron usando el software ImageJ.

Células y condición	GLC	GLUT1	PKM2	LDHA
NIS vs WT (NP)	=	↓	↓	=
NIS vs WT (HP)	↓	↓	=	=
NIS vs WT (NQ)	=	=	=	=
NIS vs WT (HQ)	=	=	=	=

**Figura 11. Resumen de los cambios más sobresalientes de los ensayos realizados en el capítulo II.** GLC (captación de glucosa), GLUT1 (expresión proteica de GLUT1), PKM2 (expresión proteica de PKM2) y LDHA (expresión proteica de LDHA). ↓ indica disminución en la captación de glucosa o en la expresión proteica. = Indica que no hay cambios significativos en la captación de glucosa o expresión proteica.

#### **6.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Con el objetivo de determinar si los cambios en el microambiente tumoral como la heterogeneidad celular y la hipoxia afectan el metabolismo glucolítico de las células HT29NIS, se analizó la expresión génica y la expresión proteica mediante western blot de componentes claves involucrados en la vía glucolítica como GLUT1, PKM2 y LDHA. También, se analizó la captación de glucosa. Todos estos análisis se realizaron en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes sometidas a normoxia e hipoxia, los resultados obtenidos se pueden ver en las figuras 7 a 11.

En la figura 7 se puede ver el análisis de la expresión del transportador GLUT1 que, aunque no está directamente involucrado en la glucólisis es importante en la captación de glucosa que ingresa a esta vía. Se puede observar que la expresión del transportador GLUT1 aumenta en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en hipoxia. En este caso se observa una relación directa entre la expresión del mRNA y la proteína (Figura 7A y 7B). Previamente se ha reportado que la hipoxia regula la glicólisis en células tumorales, mediante la producción de HIF-1 $\alpha$  que reprograma las células cancerosas al metabolismo glucolítico y regula la expresión de GLUT1 (89, 141-143). Las HT29 usadas en nuestro estudio tienen p53 mutada (144), y se ha reportado que p53 mutada estimula el efecto Warburg de células tumorales en cultivo favoreciendo la sobreexpresión de GLUT1 en la membrana plasmática (145). El aumento de la expresión de GLUT1 correlaciona con pobre supervivencia y pobre resultado terapéutico en pacientes con cáncer (89).

El aumento de la expresión del transportador GLUT1 en hipoxia obtenido por nosotros, es un resultado esperado de acuerdo a lo previamente reportado. Al comparar las dos líneas celulares, se observa que las células HT29WT expresan niveles más altos de GLUT1 que las células HT29NIS, tanto en normoxia como en hipoxia. Esta observación permite sugerir que las células HT29NIS captan menos glucosa, esta observación está relacionada con lo reportado por Filetti y colaboradores (1986) quienes sugirieron que el tratamiento con yoduro de cultivos primarios de tiroides de porcino reduce los transportadores funcionales que median el transporte de glucosa en la tiroides (146). También, en otro estudio se observó una reducción significativa del nivel de glucosa en sangre en ratas cuando se administra yoduro de potasio KI (147). De acuerdo a estos reportes, se puede sugerir que, la transfección del gen del transportador NIS en las células HT29 podría inducir reducción de la captación de glucosa.

Otro de los genes analizados fue *PKM2* que codifica para una de las isoformas de la piruvato quinasa (PK) que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato y que es sobreexpresada en células tumorales (148). PKM2 es menos activa que PKM1 lo que permite la acumulación de intermediarios glucolíticos usados en vías biosintéticas necesarios para células de proliferación rápida (149). La figura 8 muestra que solo para las células HT29NIS proliferantes en hipoxia se incrementa de manera significativa la expresión del mRNA y la expresión de la proteína. En el análisis de este resultado se deben tener en cuenta las observaciones de Otto Warburg quien observó que independientemente de la disponibilidad de oxígeno, las células de cáncer tenían un metabolismo distinto que era en gran medida dependiente de la glicólisis en lugar de la fosforilación oxidativa mitocondrial (150). Este proceso fue llamado el efecto Warburg, o glicólisis aeróbica (91). Esta reprogramación metabólica de las células de cáncer proporcionan ATP y le permiten a las células sobrevivir bajo condiciones hipóxicas (151). Además, la reprogramación metabólica le suministra a las células intermediarios y sustratos para la síntesis de nucleótidos, proteínas y componentes de membrana, los cuales

son requeridos por células en estado proliferativo (152). También en la figura 8, se puede ver que en las células HT29NIS en normoxia la expresión de PKM2 se reduce de manera significativa al comparar con las células HT29WT. Este resultado sugiere que en las células HT29NIS se reduce el metabolismo glucolítico.

También se analizó la expresión de la lactato deshidrogenasa A (LDHA) una enzima involucrada en la conversión de piruvato a lactato permitiendo un flujo rápido a través de la glucolisis que es necesario para reunir la energía necesaria para las células que proliferan rápidamente (153). En nuestro caso se muestran diferencias significativas en la expresión de LDHA en condiciones de hipoxia de células proliferativas HT29NIS y HT29WT (Figura 9). Datos que están de acuerdo con el incremento reportado para esta enzima en condiciones de hipoxia (154, 155). En las células HT29NIS en normoxia se detecta una ligera reducción no significativa de LDHA al comprar con las células HT29WT. Se puede sugerir una ligera reducción en el metabolismo glucolítico en las células HT29NIS.

Para complementar los resultados antes mencionados se determinó la captación de glucosa por las células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia (Figura 10), donde se observa la integración de la intensidad de fluorescencia para la sonda 2-NBDG, análogo no metabolizable de la glucosa, para duplicados de cada condición. Las imágenes fueron obtenidas mediante el microscopio de fluorescencia. Se puede ver que la captación de glucosa fue mayor en las células HT29NIS y HT29WT proliferativas en hipoxia, como se ha reportado previamente, donde se ha visto que en condiciones de hipoxia se aumenta la captación de glucosa (141-143). En células quiescentes en hipoxia de las dos líneas celulares no se observan cambios significativos en cuanto a la captación de glucosa (Figura 10), indicando que la condición de quiescencia no afecta la captación de glucosa. Si comparamos la captación de glucosa en hipoxia de las células HT29NIS y HT29WT proliferativas con las mismas células en quiescencia se observa una reducción en el estado de quiescencia. Debemos tener en cuenta que un

componente importante del microambiente tumoral es el pH, como se sabe en condiciones de hipoxia las células tumorales modifican el metabolismo glucolítico, aumentando la producción de ácido láctico, por lo tanto, la célula tumoral aumenta la presencia de transportadores de monocarboxilato en su membrana MCT1/MCT4 para eliminar el exceso de lactato (156), dando lugar a la acidificación del medio extracelular como se observa en la figura A (ver anexos) para las células HT29WT y HT29NIS quiescentes en hipoxia. Esta acidosis del microambiente tumoral suprime la glicolisis y aumenta la respiración mitocondrial en las células cancerosas (157, 158), explicando de esta manera la reducción de la captación de glucosa vista en la figura 10 en estas condiciones. En la figura 10, también se puede ver que en hipoxia la captación de glucosa se reduce en las células HT29NIS al comparar con las células HT29WT. Lo que nos permite sugerir que en las células HT29NIS se reduce el metabolismo glucolítico.

Con los resultados obtenidos se puede concluir que la condición de hipoxia aumenta y la condición de quiescencia no modifica el metabolismo glucolítico en las dos líneas celulares. También se puede concluir que en las células HT29NIS se reduce el metabolismo glucolítico al compararlo con las HT29WT (figura 11). Se sugiere que esta reducción está asociada con la transfección del gen de NIS en las células HT29WT, como ya fue discutido. Se ha reportado evidencia clínica que sugiere que, si un tumor de tiroides primario o diferenciado metastásico pierde la habilidad de captar yoduro, es más propenso a captar  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG), que es un análogo no metabolizable de la glucosa. Esta habilidad es mediada por transportadores GLUT, cuya expresión de mRNA es alta en tumores de tiroides extremadamente no diferenciados (159-161). En los pacientes con cáncer de tiroides papilar se busca que el tratamiento aplicado aumente la expresión de la proteína NIS y se reduzca el metabolismo glucolítico (162). El modelo *in vitro* planteado por nosotros presenta estas características mencionadas, las cuales se modifican al inducir tumores en ratones (Figura 1).

## **7. CAPÍTULO III: CAMBIOS EN EL POTENCIAL REDOX ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DE NIS Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN CON EL METABOLISMO GLUCOLÍTICO**

### **7.1. OBJETIVO**

Estudiar la producción de ROS y la activación de la vía de respuesta a estrés celular Nrf2 en el modelo *in vitro*, asociados a los cambios en la proliferación celular y la hipoxia.

### **7.2. METODOLOGÍA**

Los cambios en el potencial redox celular inducidos por las condiciones de quiescencia e hipoxia en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes, se determinaron usando una sonda fluorescente RedoxSensor™ Red CC-1 (Molecular Probes R-14060), siguiendo el procedimiento indicado en el numeral 6.2.1. Aquí también se analiza el potencial redox celular y su posible asociación con la captación de glucosa en las dos líneas celulares en las condiciones ya mencionadas. También se determina en las dos líneas celulares proliferativas y quiescentes el efecto del Nal y de la NAC en el potencial redox y su asociación con la captación de glucosa en las condiciones de hipoxia y normoxia.

Los cambios en la expresión del factor de transcripción Nrf2 involucrado en la respuesta antioxidante, se determina mediante Western Blot en las células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en condiciones de normoxia e hipoxia.

Finalmente, se determina la activación del factor inducido por hipoxia HIF-1 $\alpha$ , en las dos líneas celulares proliferantes y quiescentes en condiciones de normoxia e hipoxia.

### **7.2.1 Ensayo de detección del potencial redox citosólico**

Se realizó en células HT29WT y HT29NIS proliferantes y quiescentes bajo normoxia e hipoxia como se indicó en el apartado 6.2.1.

Después de la incubación con las sondas fluorescentes se obtuvieron 100 imágenes por cada condición mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss), las cuales se analizaron usando el software ImageJ.

### **7.2.2. El nivel de expresión Nrf2**

El nivel de expresión de la proteína asociada a condiciones de estrés celular Nrf2 se determinó en extractos nucleares (usando Nuclear Extract Kit Active Motif Catálogo No 40010) de células HT29WT y HT29NIS proliferantes y quiescentes bajo normoxia e hipoxia mediante Western Blot. La cuantificación de la expresión de esta proteína se realizó usando el programa ImageJ, usando como control  $\beta$ -actina.

El anticuerpo primario y la dilución usada fue:

Nrf2: Anti- Nrf2 antibody, ab31163, abcam, England. Dilución: 1:1.000

El anticuerpo secundario conjugado a HRP (Horseradish Peroxidase) y su dilución: Pierce 31460 goat anti-rabbit IgG (H + L) fue usado en dilución 1: 5.000 en PBST con leche al 5%.

### **7.2.3. Determinación de la activación de HIF-1 $\alpha$**

Se determinó la activación de HIF-1 $\alpha$ : para esta determinación se usó el kit TransAM™ HIF-1 (Active Motif catálogo No 47096), este sistema usa oligonucleótidos inmovilizados a una microplaca sólida los cuales contienen el elemento de respuesta a hipoxia (HRE). Los dímeros de HIF-1 $\alpha$  en los extractos nucleares se unen específicamente a este oligonucleótido y son detectados mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra HIF-1 $\alpha$ . Posteriormente, la adición

de un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), permite la detección colorimétrica cuantitativa por medio de espectrofotometría.

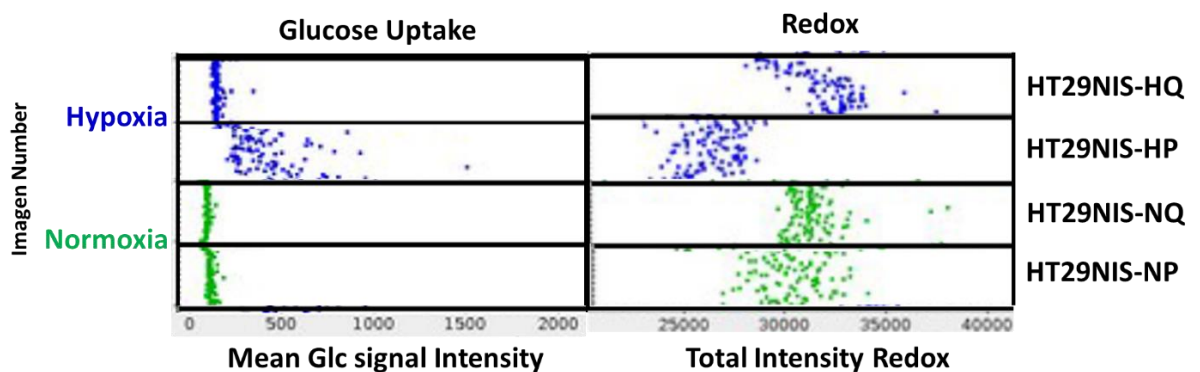
### **7.3. RESULTADOS**

#### **7.3.1. Potencial redox citosólico y su asociación con cambios en el metabolismo glucolítico y la expresión de NIS**

El propósito de este ensayo fue determinar los cambios en el potencial redox en las células HT29NIS proliferantes y quiescentes en condiciones de normoxia e hipoxia, asociados a la expresión de NIS y su posible asociación con el metabolismo glucolítico.

Inicialmente se planteó determinar la asociación del estado redox celular con la captación de glucosa, ya que se ha reportado que la captación de glucosa incrementa la producción de ROS (163). En este ensayo las células HT29NIS proliferativas y quiescentes después de ser sometidas a hipoxia y normoxia, se incuban inmediatamente con las sondas fluorescentes, manteniendo las condiciones de hipoxia y normoxia iniciales, como se describe en la metodología. Después de la incubación con las sondas fluorescentes se toman las imágenes para cada condición (100 imágenes por pozo, con duplicado de cada condición). El análisis de las imágenes es mostrado en la figura 12, donde se pueden ver las células HT29NIS proliferativas en normoxia, las cuales, captan glucosa normalmente y presentan un estado redox citosólico aumentado, probablemente debido al metabolismo oxidativo que se da en estas células. Para las células HT29NIS quiescentes en normoxia el comportamiento es similar al anterior. Para las células HT29NIS proliferantes en hipoxia, se aumenta drásticamente la captación de glucosa, pero se reduce fuertemente el estado redox citosólico,

probablemente debido al cambio en el metabolismo de oxidativo a glucolítico inducido por la condición de hipoxia, intentando proteger las células de los efectos dañinos de ROS como se ha reportado. En las células HT29NIS quiescentes en hipoxia no hay cambio en la captación de glucosa, pero se incrementa el estado redox citosólico. Probablemente las células quiescentes en hipoxia vuelvan al metabolismo oxidativo y reduzcan el metabolismo glucolítico.

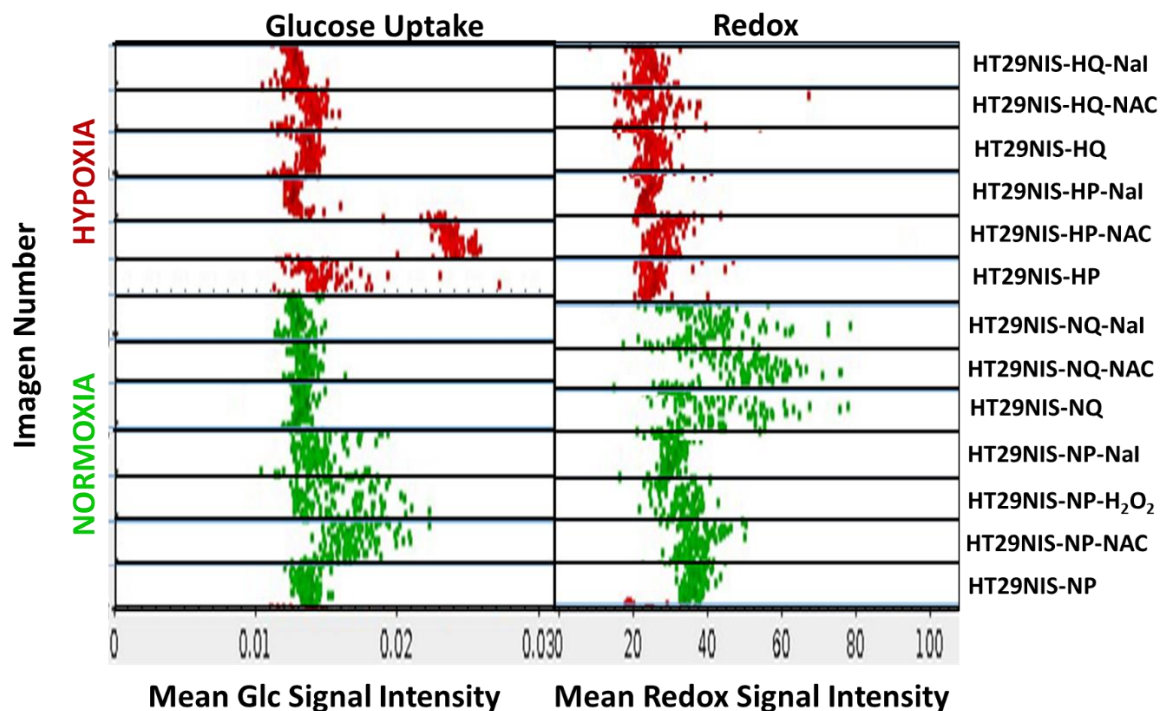


**Figura 12. Captación de glucosa y potencial redox citosólico de las células HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia.** La determinación se realiza a través de imágenes de fluorescencia, para la captación de glucosa se usó la sonda 2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3diazol-4-ylamino-2-deoxyglucose (2-NBDG). Para el potencial redox citosólico se usó la sonda fluorescente RedoxSensor Red CC-1. Se muestran los resultados obtenidos para uno de los duplicados de cada condición. Después de la incubación con la sonda fluorescente se obtuvieron aproximadamente 100 imágenes por cada condición mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss), las cuales se analizaron usando el software ImageJ. La figura muestra el número de imágenes vs la intensidad de la señal fluorescente de cada sonda. NP: normoxia-proliferativas, NQ: Normoxia-quiescentes, HP: Hipoxia-proliferativas, HQ: Hipoxia-quiescentes (el número de imágenes en normoxia se muestra en verde y el de hipoxia en azul).

### **7.3.2. Efecto de N-acetilcisteína (NAC) y yoduro de sodio (NaI) en la Captación de glucosa y en el potencial redox citosólico**

Con el fin de corroborar los datos obtenidos del estado redox citosólico se decidió incorporar la N-acetilcisteína (NAC, N-acetil-L-cisteína) que es un aminoácido derivado que contiene un grupo tiol. NAC actúa como un inhibidor de radicales libres (scavenger) (164). Se adiciono peróxido de hidrógeno como control positivo que incrementa el estado redox de las células, solo a las células HT29NIS proliferativas en normoxia. También se adicionó el yoduro de sodio (NaI), con el fin de ver si tenía algún efecto en el estado redox de la célula, teniendo en cuenta que se ha reportado que el yoduro puede incrementar la producción de ROS (165). En la figura 13, se puede observar que las células HT29NIS proliferativas y quiescentes después de ser sometidas a normoxia e hipoxia, se les adiciona NAC, NaI y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como se indicó en la metodología (Figura 6), luego se incuban inmediatamente con las sondas fluorescentes, manteniendo las condiciones de hipoxia y normoxia iniciales. Después de la incubación con las sondas fluorescentes se toman las imágenes para cada condición (100 imágenes por pozo, con duplicado de cada condición). El análisis de las imágenes es mostrado en la figura 13, se puede ver que en células HT29NIS proliferantes en normoxia captan glucosa normalmente, presentan un estado redox citosólico aumentado, probablemente debido al metabolismo oxidativo que se da en estas células. La adición de NAC a estas células provoca un incremento apreciable en la captación de glucosa y un ligero incremento en el estado redox. La adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce incremento en la captación de glucosa sin efecto en el estado redox. El NaI provoca un incremento en la captación de glucosa y una ligera disminución del estado redox. En las células HT29NIS quiescentes en normoxia, con NAC y NaI se observa un gran incremento en el estado redox, sin modificación en la captación de glucosa. Para las células HT29NIS proliferantes en hipoxia se incrementa la captación de glucosa y se reduce levemente el estado redox. La adición de NAC a estas células provoca un fuerte incremento en la captación de glucosa y un leve incremento del estado redox. La adición de NaI no

modifica la captación de glucosa, pero aumenta levemente el estado redox. En células HT29NIS quiescentes en hipoxia, la captación de glucosa y el estado redox incrementan ligeramente, un aumento más notorio se observa cuando se adiciona NAC. El NaI incrementa levemente el estado redox sin alterar la captación de glucosa.



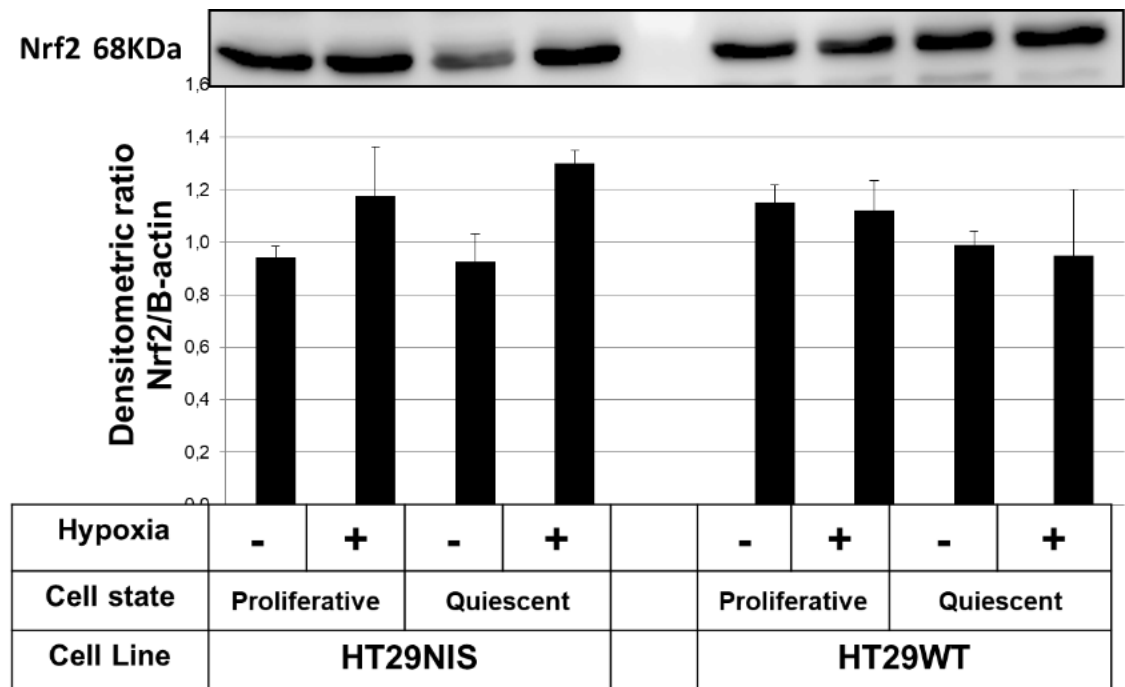
**Figura 13. Captación de glucosa y potencial redox citosólico de las células HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia en presencia de NAC, NaI y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** La determinación se realiza a través de imágenes de fluorescencia, para la captación de glucosa se usó la sonda 2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3diazol-4-ylamino-2-deoxyglucose (2-NBDG). Para el potencial redox citosólico se usó la sonda fluorescente RedoxSensor Red CC-1. Se adicionaron N-acetilcisteína (NAC), peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), yoduro de sodio (NaI) como se indica en la figura 1. Se muestran los resultados obtenidos para uno de los duplicados de cada condición. Después de la incubación con la sonda fluorescente se obtuvieron aproximadamente 100 imágenes por cada condición mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss), las cuales se analizaron usando el software ImageJ. La figura muestra el número de imágenes vs la intensidad de la señal fluorescente de cada sonda.

NP: normoxia-proliferativas, NQ: Normoxia-quiescentes, HP: Hipoxia-proliferativas, HQ: Hipoxia-quiescentes (el número de imágenes en normoxia se muestra en verde y el de hipoxia en rojo).

### **7.3.3. Expresión de Nrf2**

Este ensayo se hace con el fin de evaluar la respuesta antioxidante de las células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes sometidas a las condiciones de normoxia e hipoxia.

Se obtuvieron y cuantificaron extractos nucleares de células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes sometidas a hipoxia y normoxia, mediante western blot, se determinó la variación en la expresión de la proteína Nrf2. Estos ensayos fueron realizados por triplicado y las imágenes tomadas fueron analizadas usando ImageJ. En la figura 14 se muestra que para la proteína Nrf2 los cambios observados no son significativos. Se destaca de la figura un incremento en la expresión de Nrf2 en células HT29NIS proliferativas y quiescentes en hipoxia. Se sugiere que la condición de hipoxia aumenta la producción de ROS, en las células HT29NIS, situación que activa la respuesta antioxidante a través de la expresión de Nrf2.



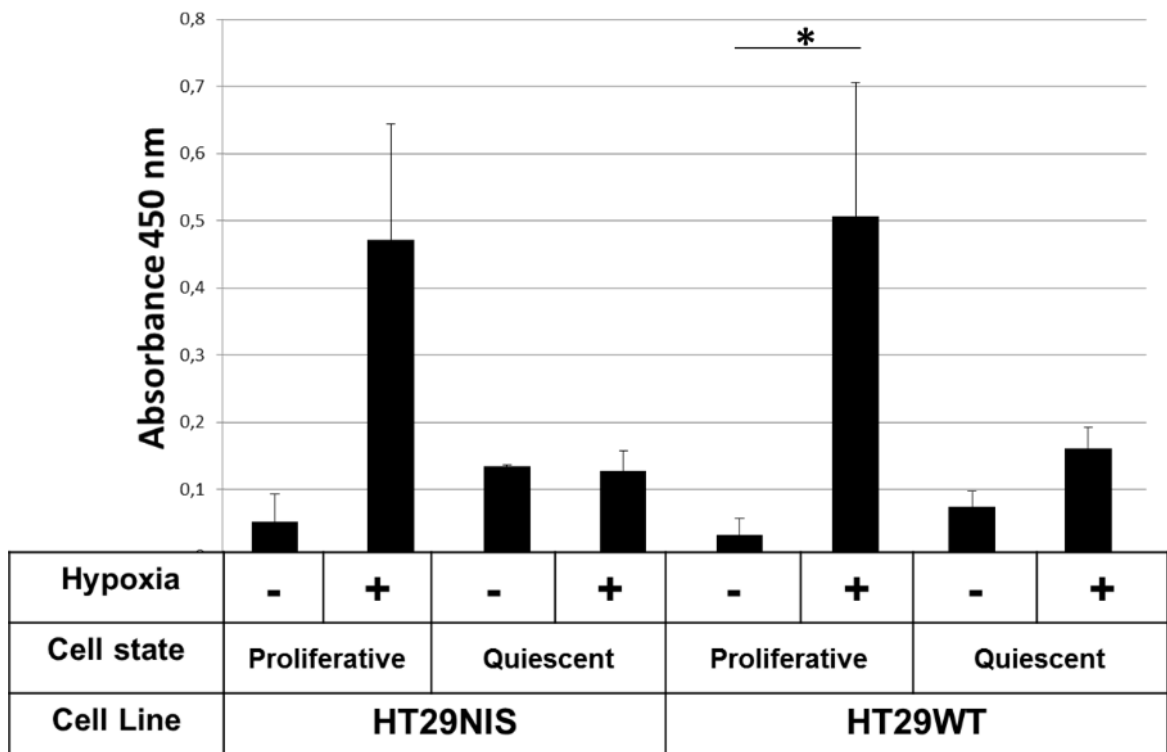
**Figura 14. Análisis de la expresión de Nrf2 en células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes sometidas a hipoxia y normoxia mediante western blot.** Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SD (n=3). No se encuentran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

#### **7.3.4. Activación de HIF-1 $\alpha$ en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en condiciones de normoxia e hipoxia**

Se hace la determinación del factor inducido por hipoxia 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ) con el fin de corroborar la condición de hipoxia en los ensayos y su relación con la captación de glucosa, el estado redox y la expresión de Nrf2 en las células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia.

La activación de HIF-1 $\alpha$ , el cual se sobreexpresa en condición de hipoxia y activa la expresión de varios genes incluyendo algunos claves de la vía glucolítica, y que

además está asociado con el incremento de ROS y la producción de Nrf2, fue detectada mediante el kit TransAM™ HIF-1 como se indica en la metodología. Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 15. En esta figura se observa aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en las células HT29NIS y HT29WT proliferativas en hipoxia, siendo solo estadísticamente significativo para las células HT29WT ( $p=0.032$ ), para las células HT29NIS  $p=0.068$ . Los resultados obtenidos corresponden con lo esperado, es decir el incremento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia. Para las demás condiciones no hay cambios significativos.



**Figura 15. Análisis de la Activación de HIF-1 $\alpha$  en células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia.** Para esta determinación se usó el kit TransAM™ HIF-1 como se indica en la metodología. La detección cuantitativa de HIF-1 $\alpha$  que se trasloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) se hace por medio de espectrofotometría (absorbancia a 540 nm). Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SD ( $n=2$ ). Las diferencias significativas observadas corresponden a un \*  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS

20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

Células y condición	Glc	ROS	Nrf2	HIF-1 $\alpha$	NIS
HT29NISNP	=	↑	=	=	=
HT29NISHP	↑	↓	↑	↑	↓
HT29NISNQ	=	↑	=	=	=
HT29NISHQ	=	↑	↑	=	↓

**Figura 16. Resumen de los resultados más sobresalientes del capítulo III relacionados con la expresión de NIS.** Glc (captación de glucosa), ROS (potencial redox celular), Nrf2 (expresión proteica de Nrf2), HIF-1 $\alpha$  (actividad de HIF-1 $\alpha$ ) y NIS (expresión proteica de NIS). ↑ Indica aumento significativo ↓ indica disminución significativa, ↑ indica ligero aumento no significativo. = Indica que no hay cambios significativos.

#### 7.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La reprogramación del metabolismo energético, propuesto por Otto Warburg (90, 91, 150), podría ser el resultado de la hipoxia crónica y/o acumulación de ROS que puede ser inducida por inflamación crónica o por mutaciones genéticas. En este estudio se induce la condición de hipoxia, reduciendo el oxígeno al 1%. Cuando sometemos las células HT29NIS proliferativas a hipoxia, detectamos un incremento en la captación de glucosa y reducción en el estado redox citosólico (Figuras 12 y

13), lo que indica el cambio del metabolismo oxidativo al metabolismo glucolítico. También en estas condiciones, detectamos un aumento en Nrf2 (Figura 14), que es un regulador de la resistencia celular a los oxidantes. Nrf2 controla la expresión basal e inducida de una serie de genes dependientes de elementos de respuesta antioxidante para regular los resultados fisiológicos y fisiopatológicos de la exposición a oxidantes (166). En nuestro caso se sugiere que este factor contribuye con la reducción del estado redox visto en células HT29NIS proliferativas en hipoxia. También para estas condiciones detectamos la expresión de HIF-1 $\alpha$ , y se ha reportado que en concentraciones bajas de oxígeno, HIF-1 $\alpha$  promueve el bajo consumo de oxígeno reduciendo la respiración celular (fosforilación oxidativa) e incrementando la glucólisis anaeróbica para producir ácido láctico en citoplasma (167). En nuestros ensayos detectamos un aumento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  lo que confirma los resultados mencionados anteriormente (Figura 15). En conclusión, la condición de hipoxia activa factores de transcripción como HIF-1 $\alpha$  y Nrf2, lo que conduce a una reprogramación metabólica favoreciendo el metabolismo glucolítico y reduciendo el estado redox citosólico, esto les confiere ventajas a las células tumorales para proliferar y sobrevivir en estas condiciones (figura 16). La expresión de la proteína NIS y su capacidad captadora de yoduro son reducidas bajo estas condiciones (Figuras 3 y 4), probablemente estos cambios metabólicos y del potencial redox estén asociados con estas alteraciones.

Para las células HT29NIS en estado quiescente, se encuentra que en normoxia el estado redox aumenta notoriamente, en hipoxia el estado redox esta ligeramente aumentado. La captación de glucosa no presenta cambios apreciables (Figuras 12 y 13). EL aumento de Nrf2 y HIF-1 $\alpha$  observado en células quiescentes, se relaciona con el aumento del estado redox de estas células. Para mantener el estado de quiescencia las células deben poseer bajos niveles de ROS como fue previamente reportado (168), lo que en nuestro caso explica el aumento del factor Nrf2 para controlar el incremento del estado redox observado. El aumento del estado redox y la captación de glucosa sin cambios nos permite sugerir que el metabolismo que

predomina en el estado de quiescencia es el oxidativo (figura 16), esto se corrobora más adelante en el análisis proteómico mostrado en la figura 20, donde se reporta el aumento de la expresión de las enzimas involucradas con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA, por su sigla en inglés) bajo estas condiciones. En estas condiciones como ya lo discutimos, se afecta la expresión y la actividad captadora de yodo de NIS (Figuras 3 y 4).

Con el fin de reducir el estado redox citosólico, y verificar los cambios observados, las células se incubaron con NAC un antioxidante que reduce ROS, los resultados obtenidos se muestran en la figura 13. Para las células HT29NIS-NP-NAC se detectó un incremento en la captación de glucosa y un ligero incremento en el estado redox. Se esperaba obtener una reducción del estado redox, pero, se ha reportado que la NAC incrementa el consumo de glucosa en individuos hiperglicémicos (169), y también se reportó que el incremento de glucosa aumenta la producción de ROS y disminuye la capacidad antioxidante en las células (163). Para las células HT29NIS-HP-NAC, se obtuvo un alto incremento en la captación de glucosa y un ligero incremento en el estado redox. En este caso, la condición de hipoxia exagera el efecto de la NAC, en cuanto al incremento en la captación de glucosa, pero probablemente se presente la reprogramación metabólica hacia el metabolismo glucolítico, lo que reduce la producción de ROS. Para las células HT29NIS-NQ-NAC el incremento en el estado redox fue mucho mayor y no tuvo efecto en la captación de glucosa. Se puede especular que el metabolismo que predomina en estas células es oxidativo y que la producción de ROS es muy alta, por lo tanto, el efecto antioxidante de NAC no se detecta. Para las células HT29NIS-HQ-NAC se tiene un ligero incremento en el estado redox y no se presenta cambio en la captación de glucosa. Para este ensayo es probable que las células tiendan hacia un metabolismo oxidativo y que NAC esté actuando como antioxidante neutralizando ROS. El uso de NAC podría ser útil teniendo en cuenta que este componente reduce ROS que pueden causar daños a las proteínas de la célula, dentro de ellas NIS, afectando su estructura y por ende su función. Se debe tener

en cuenta que los niveles de ROS están estrictamente regulados y no siempre son subproductos dañinos y que están involucrados en varias funciones fisiológicas importantes como vías de señalización, expresión de genes, proliferación celular, diferenciación y viabilidad (170).

En cuanto a la adición de NaI, se buscaba mirar el efecto del yoduro en el metabolismo y en el estado redox celular, teniendo en cuenta que las células HT29NIS lo captan, y se han reportado varias funciones del yoduro a nivel intracelular (171-173), que podrían afectar algunos resultados. En la figura 13 se presentan los efectos del yoduro en los ensayos de captación de glucosa y estado redox. En células HT29NIS-NP-NaI, el yoduro incrementa la captación de glucosa, como ha sido previamente reportado (173), y disminuye ligeramente el estado redox celular, en este caso actuaría como antioxidante, reduciendo ROS (171). En células HT29NIS-NQ-NaI, el yoduro no tiene efecto apreciable en ninguno de los dos ensayos. En condiciones de hipoxia para las células HT29NIS-HP-NaI y HT29NIS-HQ-NaI, el yoduro reduce ligeramente el estado redox celular, actuando probablemente como antioxidante (171), pero no afecta la captación de glucosa. Se requieren más análisis para definir el papel del yoduro en las condiciones de este estudio, y el efecto que puede tener en análisis de tipo metabólico, captación de glucosa y determinación de ROS.

El  $H_2O_2$  se usó con el fin de tener un control positivo del estado redox, pero los resultados mostrados en la figura 13, permiten ver que el estado redox no fue modificado por este componente, mientras que la captación de glucosa se incrementó. Se ha reportado que una corta exposición a ROS exógeno estimula la activación de Akt y la traslocación de GLUT1 a la membrana plasmática, lo que puede explicar el aumento en la captación de glucosa vista analizada aquí (174), en cuanto a la no modificación del estado redox se puede especular que el aumento de la captación de glucosa incrementa la vía de la pentosas fosfato, produciendo altos niveles de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (NADPH) y de glutatión

reducido (GSH), que reducen el  $H_2O_2$  a agua, evitando el aumento del estado redox celular (174).

Factores del microambiente tumoral como la quiescencia y la hipoxia, inducen cambios en el estado redox celular que están asociados con el metabolismo tanto glucolítico como oxidativo. Las células regulan de manera estricta y mediante diferentes mecanismos el estado redox celular con el fin de evitar el estrés oxidativo. Las células tumorales sacan ventajas de estas condiciones para proliferar, reducir la apoptosis e incrementar la supervivencia. En los ensayos de detección del estado redox celular se debe tener especial cuidado en el uso de componentes como NAC y  $H_2O_2$  para una adecuada interpretación de los resultados, teniendo en cuenta que sus efectos son múltiples y dependen de las condiciones del ensayo.

## **8. CAPÍTULO IV: CAMBIOS METABÓLICOS PRODUCIDOS EN LAS CÉLULAS HT29WT DESPUÉS DE LA TRANSFECCIÓN CON EL GEN DE LA PROTEÍNA NIS**

### **8.1. OBJETIVOS**

Identificar cambios en el comportamiento metabólico debidos a la transfección del gen de NIS en células HT29WT proliferantes y quiescentes en condiciones de normoxia e hipoxia.

### **8.2. METODOLOGÍA**

Se analizó el metabolismo glucolítico y oxidativo de las células tumorales antes y después de la transfección del gen de NIS, para este análisis se obtuvieron extractos

orgánicos y proteicos de células HT29WT y HT29NIS proliferantes y quiescentes sometidas a condiciones de normoxia e hipoxia, a partir de estos extractos se realizaron los análisis de metabolómica y proteómica mediante espectrometría de masas los cuales se detallan a continuación.

## **8.2.1. Análisis metabolómico y proteómico mediante espectrometría de masas**

### **8.2.1.1. Análisis metabolómico**

La extracción de metabolitos se realizó de acuerdo al procedimiento publicado por Lorenz MA y colaboradores con algunas modificaciones (175): después de terminada la incubación de células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia, las cajas de cultivo con las células se colocaron sobre hielo, se les aspiró el medio de cultivo completamente y se lavaron rápidamente rotando la caja con solución de sucrosa 250mM (2 segundos), se aspiró la solución de sucrosa y se adicionaron directamente sobre las células 15 mL de nitrógeno líquido. Aproximadamente pasan máximo 5 segundos entre la adición de la solución de sucrosa y el congelamiento por adición de nitrógeno. Las cajas con las células congeladas se almacenaron a -80°C para su posterior extracción de metabolitos. Para la extracción de los metabolitos, las cajas con células se colocaron sobre hielo e inmediatamente se adicionaron 0.7 mL del solvente de extracción frío metanol-cloroformo (9:1) (grado HPLC, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), las células se recuperaron por raspado y se resuspendieron en el solvente de extracción, se transfirieron a tubos de microcentrifuga (1.5 mL), se centrifugaron a 16100xg por 3 minutos a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes que contienen los metabolitos extraídos en tubos nuevos de 1.5 mL. Las muestras se secaron por centrifugación al vacío en el Speed Vac (SVC100H, SAVANT, Thermo Fisher Scientific, Illkirch, Francia). Se dejaron enfriar sobre hielo y luego se almacenaron a -20°C hasta su análisis por espectrometría de masas.

- **Espectrometría de masas metabolómica**

Las muestras obtenidas fueron resuspendidas en 50  $\mu$ L de una mezcla de acetonitrilo-H<sub>2</sub>O (20:80) (HPLC grade, Merck Millipore) y se analizó el perfil metabólico usando cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS por su sigla en inglés). Los análisis de cromatografía líquida se realizaron usando el sistema DIONEX Ultimate 300 HPLC (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Se inyectan 10  $\mu$ L de cada muestra a una columna Synergi 4  $\mu$ m Hydro-RP 80 A 250 x 3.0 mm (Phenomenex, Le Pecq, Francia). Las fases móviles comprenden ácido fórmico 0.1% (Thermo Fisher Scientific) en agua (A) y 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (B). El siguiente gradiente fue establecido, con una velocidad de flujo de 0.9 mL/min: 0% de fase móvil B de 0 a 5 minutos, 0-95% de B desde 5 a 21 minutos, manteniendo a 95% B hasta 21.5 minutos, 95-0% de B desde 21.5 a 22 minutos, y manteniendo a 0% de B hasta 25 minutos para equilibrar la columna. El análisis de espectrometría de masas se realizó sobre un espectrómetro de masas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) con una fuente de ionización electrospray calentada (HESI II) operando en modo positivo y negativo. La MS de exploración completa de masa precisa de alta resolución (HRAM) y los 5 espectros de MS/MS principales se recopilaron en modo dependiente de datos con poderes de resolución de 70000 y 35000, respectivamente. Se preparó una muestra de control de calidad (QC, quality control, por su sigla en inglés) a partir de una mezcla igual de todas las muestras recogidas. La muestra de QC se inyectó al comienzo de la corrida y después de cada 9 muestras para monitorear la estabilidad del funcionamiento del espectrómetro de masas. Los archivos de datos sin procesar Raw se convirtieron en archivos MZxml usando MSconvert (versión 2.1, ProteoWizard) (176). Los datos obtenidos de los modos de ionización positiva y negativa se analizaron por separado utilizando MZmine (versión 2.29)(177) . Se generaron cromatogramas aislados para cada masa, con un umbral de ruido de 105. Se utilizó un algoritmo de búsqueda mínimo

local para seleccionar los picos validados. Los picos se alinearon luego mediante un algoritmo de consenso de muestra aleatoria (RANSAC) con una tolerancia de 10 ppm para m/z y 1 min para el tiempo de retención (RT). Los valores faltantes se agregaron usando los mismos rangos m/z y RT observados en las muestras detectadas, cuando fue posible. Luego se identificaron los picos utilizando la base de datos del metaboloma humano (HMDB, versión 3.0) con una tolerancia de masa de 15 ppm (178). Solo los metabolitos identificados fueron retenidos para análisis adicionales de la ruta. Los resultados obtenidos con cada polaridad se combinaron, y para los metabolitos que se identificaron en ambos modos, conservamos los metabolitos con los valores de intensidad media más altos y observados en la mayoría de las muestras. Los metabolitos entre los grupos se consideraron significativamente diferentes cuando  $p \leq 0.05$ , sobre regulados cuando las veces de cambio fueron  $\geq 2$  y bajo regulados cuando las veces de cambio fueron  $\leq 0.5$ . El análisis de las vías metabólicas se realizó con MetaboAnalyst (179, 180) (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

#### **8.2.1.2. Análisis proteómico**

- **Obtención de los extractos proteicos con RIPA para análisis proteómico**

Después de terminada la incubación de células HT29NIS y HT29WT proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia como se describió arriba, las cajas de cultivo con las células se colocaron sobre hielo, se lavaron dos veces con PBS frío (5 mL c/u), luego, se adicionó RIPA + inhibidores de proteasas (04693124001 cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets suministrado en EASYpacks, una tableta para 10 mL de RIPA y PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, una tableta para 10 mL de RIPA, Roche): 100  $\mu$ L para las células proliferantes y 400  $\mu$ L para las células quiescentes.

Las células se recuperaron por raspado, se colocaron en un eppendorf (1,5mL), se incubaron sobre hielo por 20 minutos, se centrifugaron a 16000xg por un minuto a

4°C. Finalmente, el sobrenadante se colectó, cuantificó y se almacenó a -80°C, hasta la realización del análisis proteómico en el espectrómetro de masas.

- **Análisis proteómico**

100 µg del lisado celular se separaron en gel de electroforesis del 10% SDS-PAGE (corrido corto, 0,5 cm), luego, el gel se lavó 3 veces con agua desionizada (3x10 min) y se tiñó con 20 mL de solución de tinción de proteínas (InstantBlue Protein Stain, Expedeon Cat # ISB1L) con agitación suave por 15 minutos (hasta ver las bandas). Luego se lavó el gel por un minuto con agua desionizada. La banda que contiene el proteoma total se corta en pequeños cubos de 1mm<sup>3</sup> y se colocan en un ependorf de baja unión de 1,5 mL. Se destiñen con 200 µL de metanol:bicarbonato de amonio 50 mM (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) (1:1v/v) por un minuto con mezclado intermitente en vórtex. El sobrenadante se descartó. Este paso se repitió una vez. Los cubos de gel se deshidrataron por 5 minutos en 200µL de acetonitrilo (ACN): NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM)(1:1v/v) con mezclado intermitente en vórtex. El sobrenadante se descartó. Al remanente se le adicionaron 200µL de ACN 100%, se mezclaron e incubaron por 30 segundos. El sobrenadante se descartó. Las muestras se secaron por centrifugación al vacío en el Speed Vac por 5 minutos.

- **Reducción y alquilación**

Las muestras fueron rehidratadas en 100 µL de DTT 25mM recién preparado en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM incubadas por 20 minutos a 56°C. El sobrenadante se descartó. Luego, se adicionó yodoacetamina 55mM recién preparada en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM, se incubó en la oscuridad por 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó, y la muestra se lavó con 400µL de agua desionizada mezclando en vórtex brevemente. El sobrenadante se descartó. Este paso se repitió una vez. Las muestras se deshidrataron por 5 minutos con 200µL de ACN: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM)

(1:1v/v) mezclando de manera intermitente en vórtex. El sobrenadante se descartó. Se adicionaron 200µL de ACN 100%, se mezcló e incubó por 30 segundos. El sobrenadante se descartó. Las muestras se secaron por centrifugación al vacío en el Speed Vac por 5 minutos.

- **Digestión**

Las muestras fueron rehidratadas en 20µL de tripsina 10ng/µL (Trypsin Gold Cat.# V5280, Promega) en un potenciador de la tripsina llamado ProteaseMAX™ Surfactant 0.01% (Promega): NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM por 15 minutos. Se adicionan 30µL más de ProteaseMAX™ Surfactant 0.01%: NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM para cubrir las muestras y se mezcló suavemente por varios segundos. Se incubó por 4 horas a 37°C. Se colectó el condensado de las paredes del tubo centrifugando 12,000xg por 10 segundos. Se mezcló por unos pocos segundos, se transfirió la reacción de digestión con los péptidos extraídos a un nuevo tubo. Se adicionaron 5µL de ácido fórmico del 25% para obtener una concentración final de 5% para inactivar la tripsina. Las muestras se secaron por centrifugación al vacío en el Speed Vac por 5 minutos. Se dejan enfriar sobre hielo, se resuspenden en ACN-H<sub>2</sub>O (20:80) y se almacenan a -20°C hasta el análisis en el equipo de espectrometría de masas (LC-MS).

- **Espectrometría de masas proteómica**

Los péptidos resultantes (10 µL) fueron analizados usando un espectrómetro de masas ESI-Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) incorporando un analizador Orbitrap de alto campo y acoplado a un sistema de cromatografía líquida capilar (LC) Ultimate 3000 RSL (Thermo Fisher Scientific). El sistema se configuró para el modo de preconcentración utilizando una columna trampa de 300 µm x 5 mm en configuración de retrolavado a 40°C (N/P 6720.0315). Se conectó una columna EASY-Spray de 15 cm x 150 µm (P/ NES806) al sistema y se acopló al sistema con

una fuente EASY-Spray (P/N ES081) que funcionaba a 40°C. La velocidad de flujo fue de 1.2  $\mu\text{L}/\text{min}$  con un gradiente de 5-45% de solvente B (80% de acetonitrilo, 20% de agua, 0.1% de ácido fórmico) contra el solvente A (0.1% de ácido fórmico, 100% de agua) por 180 mn. Se usó un método dependiente de datos top15 para la adquisición del espectro MS/MS. Los espectros de masas de barrido completo se midieron de 350 a 1500 m/z con un objetivo de control de ganancia automático establecido en  $3 \times 10^6$  iones y se inició una resolución de 70,000 MS/MS por barrido a una resolución de 17,500 para iones con carga potencial de 2+, 3+ y 4+ con una exclusión dinámica de 20s. MS/MS se registraron con un valor de control automático de ganancia establecido en  $5 \times 10^4$  iones.

Todos los archivos de datos raw de MS fueron analizados por el software 2.1.1.21 de Proteome Discoverer (Thermo Fisher, Francia) utilizando el motor de búsqueda Sequest HT contra una base de datos de secuencias de proteínas (versión Uniprot2015\_2). X corr confianza se mantuvo superior a 0,7 para todos los parámetros. La tolerancia de masa del precursor se ajustó a 10 ppm y la tolerancia a fragmentos de iones fue de 0.02 Da con permiso de dos rompimientos perdidos en los digeridos de tripsina.

También se utilizó una estrategia de búsqueda en la base de datos decoy para estimar la tasa de descubrimiento falso (false discovery rate: FDR) para garantizar la fiabilidad de las proteínas identificadas: un valor límite de FDR del 1% como criterio estricto y un valor límite de FDR del 5% como criterio relajado utilizando Percolator y al menos dos péptidos fueron requerido para hacer coincidir la entrada de una proteína para su identificación. Se realizó el estricto principio de máxima parsimonia, y solo los espectros de péptidos con al menos una confianza media se consideraron para la agrupación de proteínas. La carbamidometilación en cisteína se estableció como modificaciones estáticas y la metionina oxidada como modificación dinámica. Para la cuantificación relativa, tanto los péptidos únicos como los de racero (péptidos encontrados en más de un grupo de proteínas) se consideraron una identificación altamente confiable y se usaron para la cuantificación. La abundancia de iones reporteros se corrigió para impurezas

isotópicas basado en las hojas de datos del fabricante. Los valores de señal a ruido (Signal-to-noise S/N) se usaron para representar la abundancia del ion reportero con un umbral de co-aislamiento del 75% y un umbral S/N reportero promedio de 10 y más requerido para los espectros de cuantificación que se utilizarán. Los valores S/N de los péptidos, que se sumaron a partir de los valores S/N de las coincidencias del espectro peptídico (peptide-spectrum match PSM), se sumaron para representar la abundancia de las proteínas. Las proporciones cuantitativas de proteínas se calcularon y normalizaron por la cantidad total de péptidos y se escalaron según el promedio del canal (channel) para cada muestra. Todos los experimentos se realizaron en cuatro réplicas. Las proteínas entre los grupos se consideraron significativamente diferentes cuando  $p \leq 0.05$ , sobre expresadas cuando las veces de cambio son  $\geq 2$  y de expresión disminuida cuando las veces de cambio son  $\leq 0.5$ . La herramienta IPA (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)) para analizar redes de proteínas expresadas diferencialmente.

- **Diagramas de Venn**

Con esta herramienta se pueden calcular las intersecciones de una la lista de elementos. Genera una salida de texto que indica qué elementos están en cada intersección o son exclusivos de una lista determinada y también produce una gráfica en forma de diagrama de Venn/Euler. El enlace que permite usar este software libre es <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Hasta el momento no hay una publicación que describa esta herramienta.

Con esta herramienta se obtuvo la distribución de proteínas claves del metabolismo glucolítico y oxidativo que cambian su expresión significativamente en las células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia.

### **8.3. RESULTADOS**

Para identificar posibles cambios en el comportamiento metabólico debidos a la transfección del gen NIS en células HT29WT. Se obtuvieron datos de espectrometría de masas de extractos proteicos que incluyen mínimo tres ensayos independientes de las dos líneas celulares proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia. Con el fin de analizar el efecto de la presencia del transportador NIS en las células HT29, se analizan las diferencias en la captación de glucosa y el potencial redox de las dos líneas celulares proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia en presencia de yoduro de sodio (NaI).

#### **8.3.1. Análisis proteómico del metabolismo glucolítico**

Se analizan los cambios en la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo glucolítico a partir de los datos de abundancia de las proteínas obtenidas por espectrometría de masas. En la figura 17 (A) se presenta reducción significativa en la expresión de varias enzimas claves del metabolismo glucolítico en las células HT29NIS al compararlas con las células HT29WT en todas las condiciones de estudio. Esta reducción significativa se observa en LDHA, PKM, PGK1, PFKP y en el transportador de glucosa SLC2A1. El número de proteínas del metabolismo glucolítico afectadas con una reducción significativa es mayor en condiciones de quiescencia e hipoxia. En la figura 17(B) se presentan los diagramas de Venn que muestran las intersecciones que se presentan de las proteínas claves del metabolismo glucolítico con cada una de las condiciones de estudio. Se puede observar que el transportador de glucosa (SCL2A1) se reduce de manera significativa en células HT29NIS proliferativas en normoxia e hipoxia y también en células HT29NIS quiescentes en hipoxia. En la misma figura se puede ver que PKM2 se reduce de manera significativa en células HT29NIS proliferativas en

normoxia y en células HT29NIS proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia. Con los resultados obtenidos, se puede sugerir una reducción significativa del metabolismo glucolítico en las células HT29NIS comparado con las HT29WT.

### **8.3.2. Análisis proteómico del metabolismo oxidativo (ciclo de los ácidos tricarboxílicos-TCA)**

En cuanto al metabolismo oxidativo se puede observar en la figura 17 (A) que varias de las proteínas involucradas en el metabolismo oxidativo (TCA) tienden a aumentar significativamente en las células HT29NIS en todas las condiciones de estudio. Las proteínas que tienen aumento significativo son PDHB, ME2, FH, SDHA, OGDH, IDH3 e IDHB. Las proteínas que mayor aumento significativo presentan son PDHA1 y IDH3B y se da en condición de quiescencia e hipoxia. En la figura 17 (C) se muestran los diagramas de Venn para las proteínas que aumentan de manera significativa en el metabolismo oxidativo. En células proliferantes y quiescentes en hipoxia se presenta el mayor número de proteínas que aumentan significativamente al comparar las células HT29NIS con HT29WT. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede sugerir que la transfección de NIS en las células HT29WT modifican su metabolismo, se reduce el metabolismo glucolítico y se incrementa el metabolismo oxidativo. Los cambios se observan en células en normoxia, pero los cambios son más relevantes cuando las células se encuentran en estado quiescente en condición de hipoxia.

### **8.3.3. Captación de glucosa y potencial redox citosólico**

En este ensayo las células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes después de ser sometidas a hipoxia y normoxia, se les adicionó el yoduro de sodio (NaI), con el fin de ver la influencia del transportador NIS en el estado redox y en la captación de glucosa de las células. Después de someter las células a los tratamientos indicados, se incuban inmediatamente con las sondas fluorescentes,

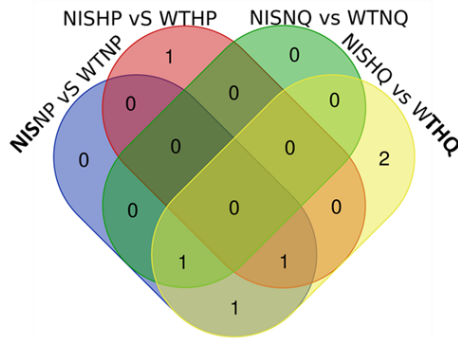
manteniendo las condiciones de hipoxia y normoxia iniciales, como se describe en la metodología. Después de la incubación con las sondas fluorescentes se toman las imágenes para cada condición (100 imágenes por pozo, con duplicado de cada condición). El análisis de las imágenes es mostrado en la figura 18, las diferencias más sobresalientes entre las dos líneas celulares se presentan en el estado redox de las células quiescentes en normoxia (QN), donde, para las células HT29NIS-NQ y HT29NISNQ-NaI se detecta un incremento comparado con las HT29WT-NQ y HT29WTNQ-NaI. Lo que nos permite sugerir que, para esta condición, las células HT29NIS son más susceptibles al estrés celular y la adición de yoduro a estas células no genera cambio del estado redox. En las células HT29WT-NQ-NaI la adición de yoduro genera un leve incremento del estado redox celular y en las células HT29WT-NP-NaI la adición de yoduro aumenta la captación de glucosa. Lo que sugiere que las células HT29WT también incorporan yoduro, pero en muy baja proporción, como se muestra en la figura 4.

Glycolysis	NP		HP		NQ		HQ		NISNP vs WTHP	NISHP vs WTHP	NISNQ vs WTHP	NISHQ vs WTHP
	MeanNISNP	MeanWTNP	MeanNISHP	MeanWTHP	MeanNISNQ	MeanWTNQ	MeanNISHQ	MeanWTHQ				
LDHA									0,34			0,13
PKM									0,52		0,75	0,61
ENO1												
PGAM1												
PGK1										0,70		
GAPDH												
TPI1												
ALDOA												
PFKP											2,18	0,46
HK2												
HK1												1,93
SLC2A1									0,21	0,33		0,41
TCA												
PDHB												
PDHA1												8,24
MDH1												
ME2									2,02		1,99	
MDH2												
FH									1,13	2,17		
SDHA									2,52			
OGDH									0,56			
OGDHL									0,48	2,46		1,48
IDH2												
IDH3A										2,03		
ACO2												
CS												
IDH3B												4,32

A

## Glycolysis down

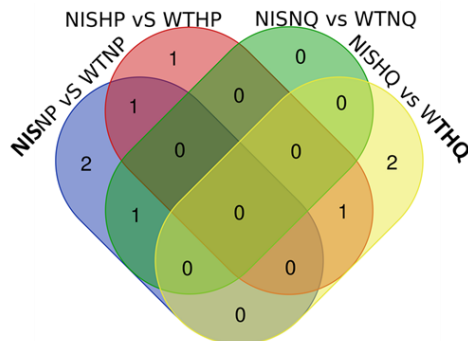
B



Glycolysis-down		
Names	Total	Elements
NISHP vs WTHP NISHP vs WTHP NISNP vs WTNP	1	SLC2A1
NISHQ vs WTHQ NISNP vs WTNP NISNQ vs WTNQ	1	PKM
NISHQ vs WTHQ NISNP vs WTNP	1	LDHA
NISHP vs WTHP	1	PGK1
NISHQ vs WTHQ	2	PFKP HK1

## TCA-up

C



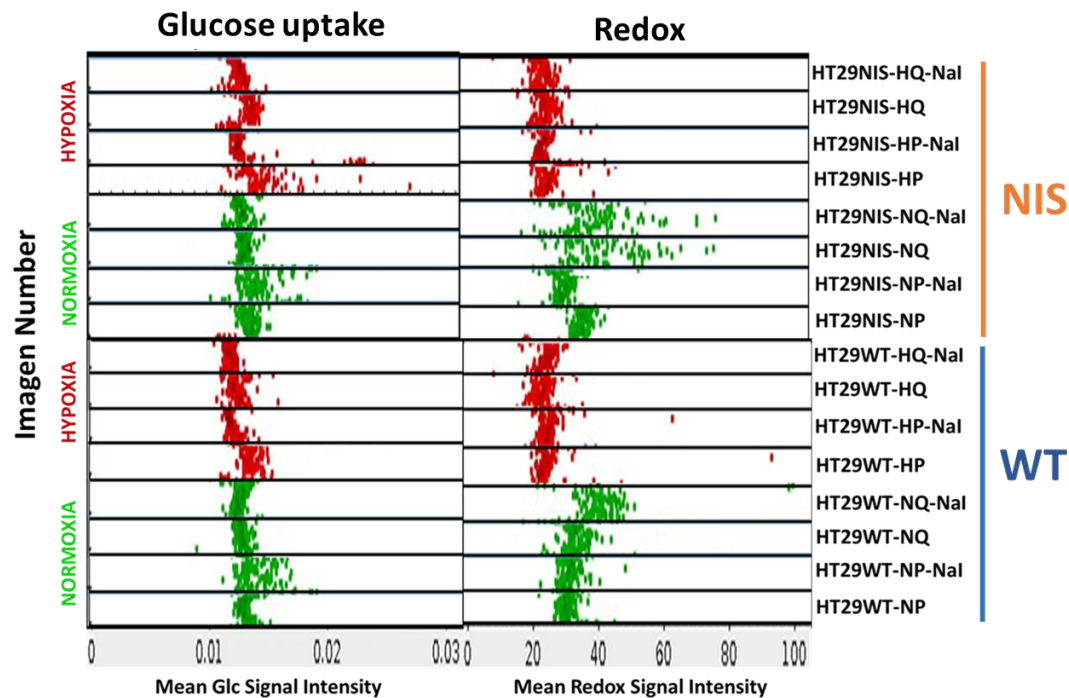
TCA-up		
Names	Total	Elements
NISHP vs WTHP NISNP vs WTNP	1	FH
NISNP vs WTNP NISNQ vs WTNQ	1	ME2
NISHP vs WTHP NISHQ vs WTHQ	1	OGDHL
NISNP vs WTNP	2	SDHA
NISHP vs WTHP	1	IDH3A
NISHQ vs WTHQ	2	PDHA1 IDH3B

Figura 17. Variación en los niveles de proteínas involucradas en el metabolismo glicolítico y oxidativo (TCA) entre las células HT29NIS y HT29WT proliferativas y

**quiescentes en normoxia e hipoxia. (A)** Mapa de calor de proteínas involucradas en las vías glucolítica y oxidativa (TCA). El color verde y rojo indican aumento y disminución en los niveles de expresión de las proteínas respectivamente. Los valores mostrados corresponden a incremento o disminución significativo de las proteínas indicadas. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró significativo. Proteínas de la vía glucolítica: L-lactato deshidrogenasa cadena A (LDHA), Piruvato quinase (PKM), Alfa-enolasa (ENO1), Fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1), Fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1), Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Triosafofosfato isomerasa (TPI1), Fructosa-bisfosfato aldolasa A (ALDOA), Fosfofructoquinasa dependiente de ATP, tipo plaquetas (PFKP), Hexoquinasa-1 (HK1), Hexoquinasa-2 (HK2) and miembro 2 de la familia transportadora de soluto (SLC2A1). Proteínas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA): Citrato sintasa mitocondrial (CS), Aconitato hidratasa mitocondrial (ACO2), Isocitrato deshidrogenasa 3 [NAD] subunidad beta mitocondrial (IDH3B), isocitrato deshidrogenasa 3 [NAD] subunidad alfa mitocondrial (IDH3A), isocitrato deshidrogenasa 2 (NADP+) mitocondrial (IDH2), 2-oxoglutarato deshidrogenasa mitocondrial (OGDH), similar a 2-oxoglutarato deshidrogenasa, mitocondrial (OGDHL), Succinato deshidrogenasa [ubiquinona] flavoproteína subunidad mitocondrial (SDHA), Fumarato hidratasa mitocondrial (FH), Malato deshidrogenasa mitocondrial (MDH2), enzima málica NAD dependiente mitocondrial (ME2), Piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad alfa, forma somática mitocondrial (PDHA1), Piruvato deshidrogenasa componente E1 subunidad beta mitocondrial (PDHB). **(B)** Diagramas de Venn de proteínas que muestran reducción significativa en el metabolismo glucolítico (Glycolysis down) y **(C)** Diagramas de Venn de proteínas que muestran aumento significativo en el metabolismo oxidativo (TCA-up). Células HT29NIS en normoxia (NISNP), células HT29WT silvestres (wild type) en normoxia (WTNP), células HT29NIS en hipoxia (NISHP), células HT29WT en hipoxia (WTHP), células HT29NIS en normoxia (NISQN), células HT29WT en normoxia (WTQN), células HT29NIS en hipoxia (NISHQ) y células HT29WT en hipoxia (WTHQ).

La figura 17 muestra cambios en los niveles en la expresión de las proteínas de la vía glucolítica y de la vía de TCA de las células HT29NIS con respecto a las células HT29WT. Para el análisis se usaron los datos de abundancia de las proteínas obtenidos por espectrometría de masas. Se realizaron 3 réplicas por cada condición. El color corresponde al promedio para cada condición y cada línea celular. Los valores numéricos de la derecha

corresponden a la relación de los promedios entre células HT29NIS/HT29WT. Los valores mayores que uno indican aumento de la expresión y los valores menores que uno indican disminución de la expresión de la respectiva proteína. Se toman como cambios representativos valores por encima de 2 que indican aumento y valores por debajo de 0,5 indican disminución de la expresión.



**Figura 18. Captación de glucosa y potencial redox citosólico de las células HT29NIS y HT29WT proliferativas y quiescentes en normoxia e hipoxia.** La determinación se realiza a través de imágenes de fluorescencia, para la captación de glucosa se usó la sonda 2-N-7-nitrobenz-2-oxa-1,3diazol-4-ylamino-2-deoxyglucose (2-NBDG). Para el potencial redox citosólico se usó la sonda fluorescente RedoxSensor Red CC-1. Se adicionó yoduro de sodio (NaI) como se indica en la figura 1. Se muestran los resultados obtenidos para uno de los duplicados de cada condición. Después de la incubación con la sonda fluorescente se obtuvieron aproximadamente 100 imágenes por cada condición mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss), las cuales se analizaron usando el software ImageJ. La figura muestra el número de imágenes vs la intensidad de la señal fluorescente de cada sonda. NP: normoxia-proliferativas, NQ: Normoxia-quiescentes, HP: Hipoxia-proliferativas, HQ:

Hipoxia-quiescentes (el número de imágenes en normoxia se muestra en verde y el de hipoxia en rojo).

#### **8.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

El metabolismo celular está finamente regulado, de tal manera que cualquier cambio dentro o fuera de la célula lo afecta directa o indirectamente. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se puede demostrar que la transfección de un gen modifica el metabolismo celular glucolítico y oxidativo. Las modificaciones que ocurren en el metabolismo dependen de la función del gen transfectado. La introducción del gen que codifica la proteína NIS en las células de adenocarcinoma de colon HT29WT reduce significativamente el metabolismo glucolítico y aumenta el metabolismo oxidativo. Estos cambios metabólicos están relacionados principalmente con la función de transporte de yoduro y sodio por la proteína codificada por el gen de NIS, como analizaremos más adelante.

Al analizar la viabilidad (Figura 2), la captación de glucosa y el estado redox (Figura 16) de las células HT29WT silvestres y las células transfectadas HT29NIS proliferativas en condiciones de normoxia (NP), se encuentra que no sufren cambios significativos después de la transfección. Cuando se analizaron las rutas metabólicas glucolíticas y oxidativas, se encontraron diferencias significativas en la expresión de varias de las enzimas involucradas en estos procesos (Figura 17). En la Figura 17A al igual que en las figuras 7, 8 y 10 se observó una reducción significativa de las proteínas LDHA, PKM, y SLC2A1 o GLUT1 para las células HT29NIS, lo que sugiere una reducción de la vía glucolítica en estas células. Vale la pena resaltar que en estas células la captación de glucosa no sufre cambios significativos (Figura 18). Se ha reportado que la reducción de la expresión de GLUT1 no es suficiente para suprimir la captación de glucosa, ya que puede haber un transporte positivo de glucosa mediado por amfiregulina (AREG). AREG es un miembro de la familia EGF que contribuye a la proliferación y progresión del cáncer. En este estudio se demostró que AREG está involucrado en la tumorigénesis y el

metabolismo de la glucosa y, por lo tanto, se válida como un objetivo prometedor para la terapia contra el cáncer colorrectal (CCR) (181). En la Figura 17A, se observa un aumento significativo de las enzimas ME2, FH y SDHA para las células HT29NIS, lo que sugiere un predominio de la vía oxidativa en estas células.

Una posible explicación para estos cambios es la probable inserción del gen de NIS junto al promotor o potenciador (enhancer) de enzimas involucradas en las rutas metabólicas glucolíticas y oxidativas, y una vez que la proteína se expresa, se une a estas regiones en el ADN y reprime o activa la transcripción de estos genes, reduciendo o aumentando así su expresión. Se requieren estudios adicionales para verificar esta hipótesis.

Otro de las diferencias entre las células HT29WT y HT29NIS es la capacidad captadora de yodo de las células HT29NIS transfectadas, como se observa en la figura 4. Es particular que el comportamiento observado en las dos líneas sea el mismo después de adicionar yoduro, tanto en la captación de glucosa como en el estado redox (Figura 3). Se ha predicho que  $I^-$  es uno de los antioxidantes terrestres más antiguos y las propiedades reductoras de  $I^-$  lo convierten en un importante reductor de especies reactivas de oxígeno (ROS) (171), adicionalmente, ha sido reportado que la oxidación de  $I^-$  a hipoyodito ( $IO^-$ ) lo convierte en un oxidante potente con una fuerte actividad bactericida (182, 183). Otro estudio indica que  $I^-$ , junto con  $SCN^-$ , con el que comparte transportadores y mecanismos oxidativos, puede participar como agente antibacteriano, antiviral y antifúngico (184, 185). Estudios recientes han demostrado los efectos antineoplásicos de  $I^-$  en el cáncer de mama (186) y también los efectos antiproliferativos y citotóxicos en las líneas celulares de carcinoma humano (187).

Green, y colaboradores en 1966 (188), reportaron cambios metabólicos inducidos por el yoduro inorgánico en cortes de tiroides de res. Ellos postularon que el yoduro 0.1 mM conduce a un aumento en las oxidaciones del ciclo de Krebs. Por ejemplo, a 50 mM de yoduro, se mostraron varios efectos inhibitorios: disminución del consumo de oxígeno; disminución de la oxidación de glucosa; disminución de la

glucólisis aerobia; y disminución de la oxidación de piruvato y acetato cuando el piruvato o acetato estaba presente en alta concentración (10 y 25 mM, respectivamente).

Teniendo en cuenta estas propiedades del yoduro, se puede sugerir que la captación de yoduro por las células HT29NIS proliferativas en normoxia induce importantes cambios metabólicos en las vías glucolíticas y oxidativas como se muestra en este estudio, aunque no se detecten cambios apreciables en la captación de glucosa y el estado redox celular.

Cuando las células proliferativas HT29NIS y HT29WT se compararon en hipoxia, se observa que la viabilidad (Figura 2), la captación de glucosa y el estado redox (Figura 18) no experimentan cambios significativos. El análisis del metabolismo glucolítico muestra reducción significativa de dos enzimas involucradas en esta vía PGK1 y SLC2A1 o GLUT1 (Figura 17), y en el metabolismo oxidativo se incrementan tres enzimas de manera significativa FH, OGDHL y IDH3A. Según la literatura, la eficiencia del transporte de electrones en condiciones hipóxicas se reduce, lo que conduce a una mayor producción de ROS mitocondriales (189). Un aumento dramático en los niveles de ROS resulta en la muerte celular en condiciones de hipoxia crónica (190). Por lo tanto, el cambio del metabolismo oxidativo al glucolítico representa una respuesta adaptativa para prevenir el exceso de oxidante y la deficiencia de energía. Los cambios mostrados por nosotros en las células HT29NIS-HP en la vía glucolítica y oxidativa pueden estar asociados con la captación de yoduro y sus propiedades antioxidantes, lo que resulta en una disminución de la producción de ROS que conduce a una reducción en la expresión de enzimas glucolíticas y aumento de las enzimas oxidativas. Cabe señalar que la expresión correcta de NIS en la membrana se ve afectada y la captación de yoduro en estas condiciones se reduce drásticamente (Figura 4), lo que podría reducir el efecto antioxidante del yoduro. También se debe tener en cuenta que se está comparando las células HT29NIS y HT29WT proliferativas en hipoxia y en estas condiciones predomina el metabolismo glucolítico, pero según los resultados

obtenidos, en las células HT29NIS está menos activo y en las células HT29WT presenta mayor actividad.

El análisis de las células quiescentes HT29NIS y HT29WT en normoxia muestra que la viabilidad (Figura 2) y la captación de glucosa (Figura 18) no experimentan cambios significativos; mientras que el estado redox en las células HT29NIS quiescentes en normoxia aumento y curiosamente la adición de yoduro no modifico este aumento. Con respecto al metabolismo glucolítico y oxidativo, se observaron algunos cambios significativos en algunas enzimas de estas vías (Figura 17), pero no se define una tendencia clara hacia una vía metabólica específica. En el análisis del estado redox, se encontró que las células HT29NIS presentaron un estado redox más alto que las células HT29WT, esto puede explicarse por la capacidad captadora de yodo de las HT29NIS. También en estas condiciones, se vio afectada la expresión y localización de NIS y se redujo la captación de yoduro (Figura 4), por lo tanto, se redujo el efecto antioxidante del yoduro. Las células HT29NIS son más sensibles al estrés celular que las células HT29WT. El metabolismo en este caso no tiene un predominio claro en las dos líneas celulares.

Bajo condiciones de hipoxia y quiescencia, se observaron cambios significativos en las células HT29NIS, tales como: reducción de la viabilidad celular (Figura 2) y reducción del metabolismo glucolítico (se disminuyen significativamente: LDHA, PKM, PFKP y SLCA2A1 o GLUT1) y aumentó del metabolismo oxidativo (se aumentan significativamente: PDHA1, OGHDL y IDH3B) (Figura 17). La captación de glucosa y el estado redox (Figura 18) no experimentan cambios significativos. En estas condiciones, encontramos cambios en la ubicación de la proteína NIS (Figura 5), reducción de su expresión (Figura 3) y, por lo tanto, una reducción dramática en la captación de yoduro (Figura 4), lo que podría estar relacionado con la disminución de su efecto antioxidante. Se puede sugerir que las células HT29NIS en estado quiescente aumentan la velocidad glucolítica, dada por el efecto antioxidante del yoduro, lo que resulta en una alta producción de ácido láctico que debe excretarse para mantener la homeostasis del pH y evitar la acidosis intracelular, por lo tanto, el

pH extracelular se reduce (Figura A en anexos). Se ha reportado que este pH bajo promueve el desprendimiento celular al estimular la secreción y/o activación de varias hidrolasas que degradan los componentes de la matriz extracelular (ECM) favoreciendo la migración e invasión de las células tumorales (191-193), también activa la apoptosis de células en la periferia del tumor (194). Esto podría explicar la reducción en la viabilidad celular observada en células quiescentes HT29NIS en hipoxia (Figura 2). En las células HT29WT, el metabolismo glucolítico no se ve afectado y, por lo tanto, no existe una producción exagerada de ácido láctico, lo que permite mantener la viabilidad celular. La condición de hipoxia a la que se someten estas células quiescentes después de 48 horas de incubación, podría ser el estímulo apropiado para que las células en estado quiescente se transformen en células proliferativas y, por lo tanto, reduzcan la glucólisis y aumenten el metabolismo oxidativo, como se observa en los resultados. La captación de yoduro por las células HT29NIS, aunque mínima, tendría un efecto que explicaría las diferencias observadas en la viabilidad y el metabolismo glucolítico y oxidativo con respecto a las células HT29WT.

La transfección del gen de NIS en las células HT29WT modifica su metabolismo glucolítico y oxidativo, este cambio modifica el comportamiento celular en condiciones de hipoxia y quiescencia, lo que conduce a la reducción de la viabilidad celular y cambio del pH extracelular. Estos cambios pueden atribuirse al efecto antioxidante y oxidante que se ha reportado para el yoduro (171). Estos cambios metabólicos deben tenerse en cuenta en los estudios realizados con estas células para interpretar adecuadamente los resultados obtenidos.

## **9. CAPÍTULO V: EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA QUIESCENCIA SOBRE EL PROTEOMA Y METABOLOMA DE LAS CÉLULAS HT29NIS**

### **9.1. METODOLOGÍA**

A partir del análisis de los datos de proteómica y metabolómica obtenidos en el numeral 8.2.1 para las células HT29NIS proliferantes y quiescentes en normoxia e hipoxia, se encuentran variaciones significativas a nivel del metabolismo celular, la señalización celular, el ciclo y el transporte celulares, que podrían explicar la retención intracelular de la proteína NIS inducida por la hipoxia y la quiescencia.

### **9.2 RESULTADOS**

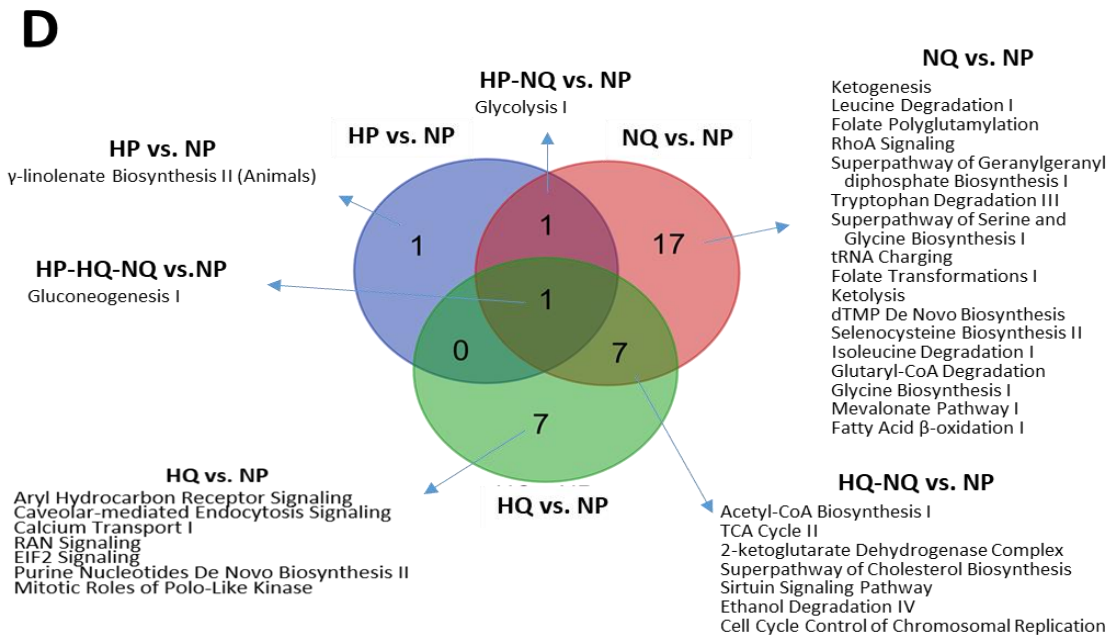
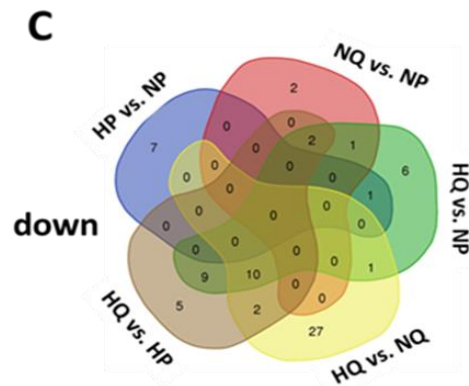
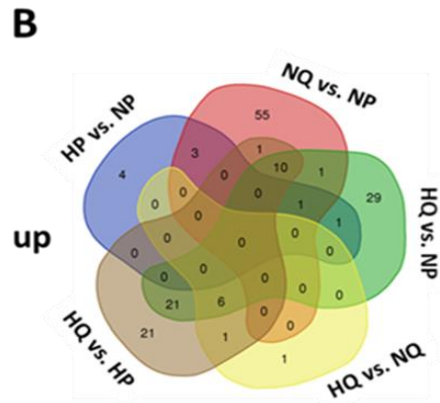
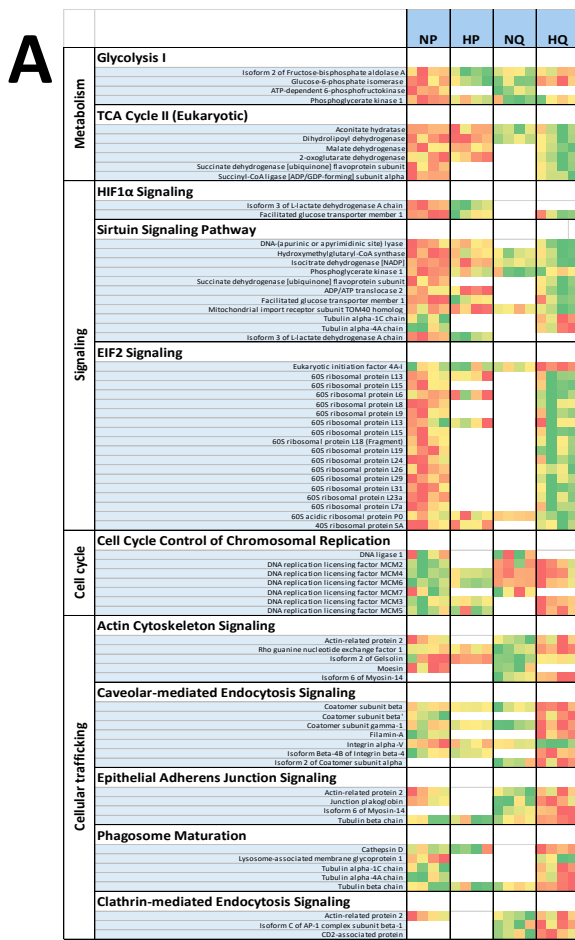
#### **9.2.1 Análisis de las variaciones encontradas en el proteoma y metaboloma de células HT29NIS que expliquen la retención intracelular de la proteína NIS inducida por hipoxia y quiescencia**

Para estudiar el mecanismo molecular fundamental de la retención de NIS inducida por quiescencia e hipoxia, se realizaron experimentos de proteómica y metabolómica para comparar las células HT29NIS proliferativas o quiescentes bajo condiciones de normoxia o hipoxia.

##### **9.2.1.1 Análisis proteómico**

Inicialmente se hizo un análisis de la variación de los niveles de expresión de las proteínas en las condiciones de estudio, durante el análisis se encuentran variaciones en el proteoma de algunas funciones relevantes de la célula como son el metabolismo celular, la señalización celular, el ciclo y el transporte celulares como

se muestra en el mapa de calor de la figura 19A. Los niveles de proteínas relacionadas con la glicólisis se incrementaron en células proliferativas en hipoxia y en células quiescentes en normoxia. Los niveles de proteínas relacionadas con el ciclo de Krebs (TCA-Cycle) se incrementaron en células quiescentes. Varias de las proteínas relacionadas con la señalización dada por HIF-1 $\alpha$ , sirtuina y EIF2, aumentan sus niveles en células quiescentes en hipoxia. Como se esperaba, se encuentran bajos niveles de proteínas relacionados con el ciclo celular asociados a la condición de quiescencia. Con respecto a la señalización del tráfico celular, se encontró un aumento en los niveles de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina en células quiescentes en normoxia. Pero las proteínas relacionadas con las vías de endocitosis mediada por caveolas, uniones epiteliales adherentes, maduración del fagosoma y endocitosis mediada por clatrina, mostraron una disminución en su expresión en células quiescentes en hipoxia. En la figura 19B y 19C, se muestran los diagramas de Venn que representan la relación existente entre las diferentes condiciones usadas en este estudio y el cambio significativo en los niveles de expresión de proteínas. En la figura 19B, se muestran los niveles de proteínas que aumentan significativamente (upregulated), las cuales se relacionaron con quiescencia, pero difieren de acuerdo con la condición de hipoxia o normoxia. En el diagrama de Venn de la figura 19C se muestran los niveles de proteínas que se reducen significativamente (downregulated) que fueron encontrados principalmente cuando las células quiescentes en hipoxia fueron comparadas con las células quiescentes en normoxia. En la figura 19D, se resumen todas las vías que cambian significativamente. Se requieren análisis adicionales para definir el mecanismo molecular fundamental de los efectos observados sobre la expresión y localización de la proteína NIS.



**Figure 19. Cambios significativos en los niveles de expresión de proteínas. Este análisis se realizó en células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP) e hipoxia (HP), y en células HT29NIS quiescentes en normoxia (NQ) e hipoxia (HQ). (A)** Mapa de calor de las proteínas que mostraron cambios significativos en los niveles de expresión en vías relevantes del funcionamiento celular. El color verde indica aumento en los niveles y el color rojo indica disminución en los niveles. **(B)** Diagrama de Venn de proteínas que aumentan su expresión (Upregulated). **(C)** Diagrama de Venn de proteínas que disminuyen su expresión (downregulated). **(D)** Diagrama de Venn de vías significativamente alteradas. Se muestran únicamente las vías significativamente alteradas comparadas con células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP). Se consideran significativos los valores con  $p < 0.05$ .

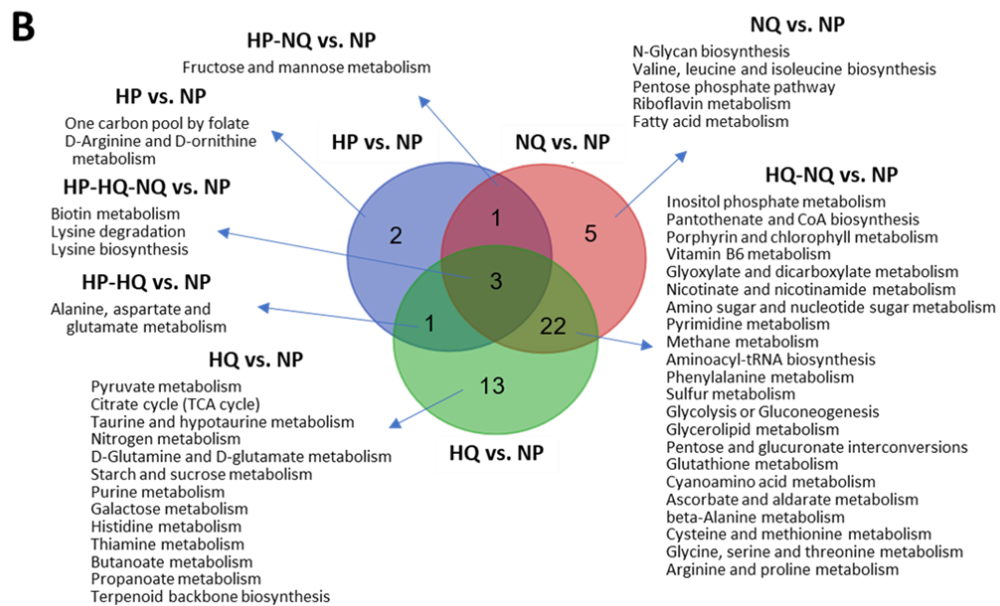
### 9.2.1.2. Análisis metabólico

El análisis metabólico realizado se hace con el fin de comparar el comportamiento metabólico de las dos líneas celulares en estudio en las condiciones establecidas. En este apartado se utilizan para estudiar el mecanismo molecular fundamental de la retención de NIS inducida por quiescencia e hipoxia, en células HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia. En la figura 20A se muestra el mapa de calor que reporta las variaciones de los metabolitos relacionados con las vías glicolítica y ciclo de Krebs. Los resultados mostraron que el ácido pirúvico se incrementó en células quiescentes en normoxia y disminuye en células quiescentes en hipoxia. El ácido láctico se incrementó en células quiescentes en hipoxia y normoxia. Varios metabolitos del ciclo de Krebs disminuyeron en células quiescentes en hipoxia. También en este mapa de calor se muestra el aumento de un metabolito conocido como uridina difosfato N-acetilglucosamina que interviene en el control del tráfico endocítico de proteínas, contribuyendo con la regulación de la glicosilación específica de proteínas (195) . La figura 20B muestra los diagramas de Venn de las vías alteradas significativamente en las diferentes condiciones comparado con células proliferativas en normoxia. En la figura 21 se hizo una representación esquemática con los perfiles de expresión de algunos metabolitos intermediarios y de algunas de

las enzimas detectadas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, para cada una de las condiciones de estudio. Se observa reducción de los metabolitos en condiciones de hipoxia tanto para células proliferativas como quiescentes. También se puede ver un aumento en los metabolitos en normoxia de células quiescentes. Las enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos prácticamente todas tienden a aumentar su expresión, siendo mayor su presencia en células quiescentes en hipoxia, excepto la aconitasa hidratasa que no cambia entre normoxia e hipoxia en células quiescentes. Es particularmente interesante que, en células quiescentes en hipoxia, donde se presenta mayor expresión de enzimas, es donde la presencia de metabolitos es más baja. Se puede especular que la actividad enzimática puede verse afectada en las condiciones mencionadas. Estos resultados de metabolómica suministran información preliminar sobre cambios en el metabolismo celular inducidos por las condiciones experimentales usadas en este estudio.

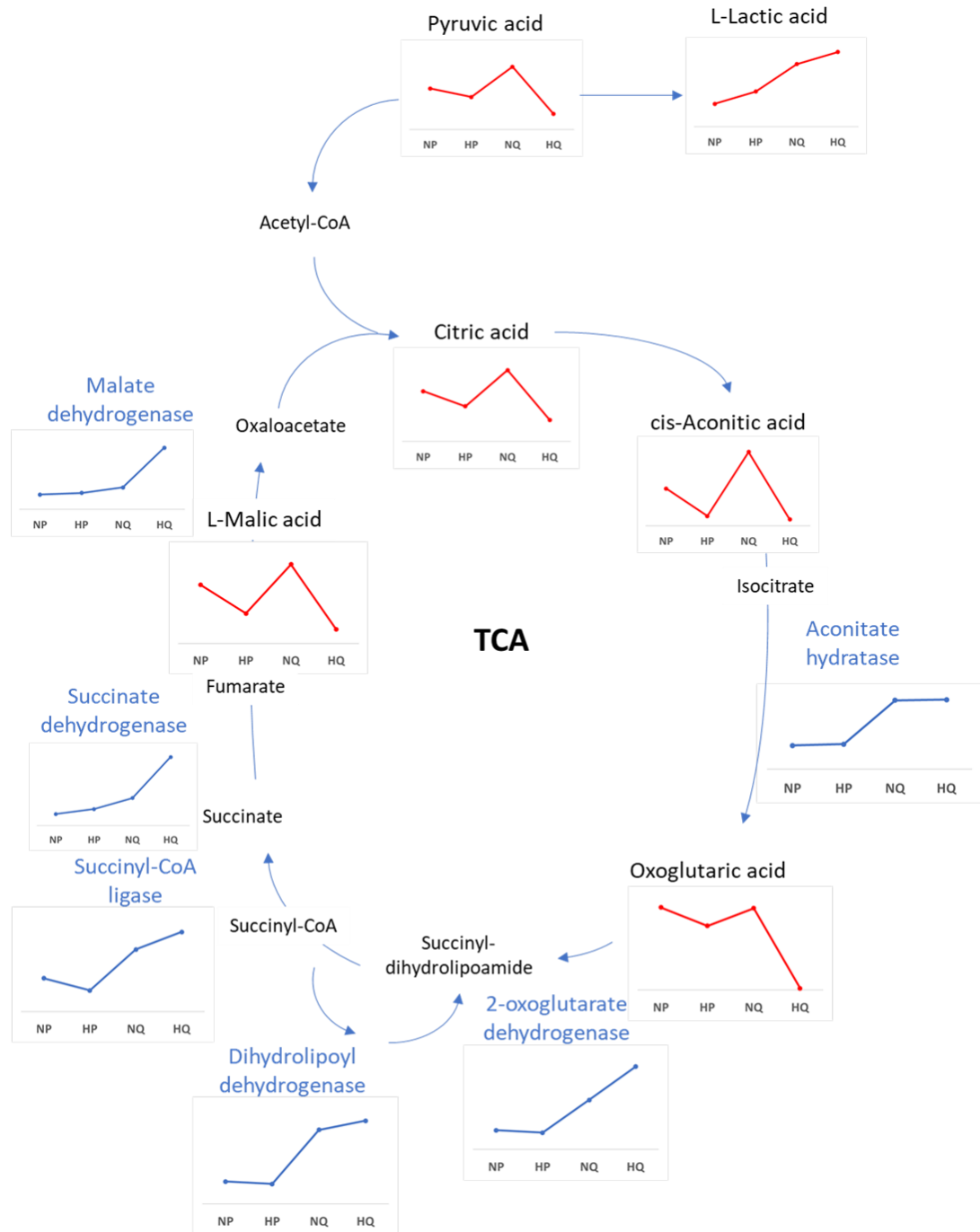
**A**

	NP	HP	NQ	HQ	HP vs. NP	NQ vs. NP	HQ vs. NP	HQ vs. NQ	HQ vs. HP
<b>Glycolysis or Gluconeogenesis</b>									
Glucose 6-phosphate	Yellow	Red	Green	Green	0.598	4.08	0.373	1.809	1.070
Pyruvic acid	Green	Yellow	Green	Red	0.29	1.53	0.38	0.25	0.48
L-Lactic acid	Red	Yellow	Green	Green		2.73	3.26		
<b>Citrate cycle (TCA cycle)</b>									
Oxoglutaric acid	Green	Yellow	Green	Red	0.298	0.50	0.02	0.02	0.03
L-Malic acid	Green	Yellow	Green	Red	0.113	1.30	0.24	0.18	0.49
cis-Aconitic acid	Green	Yellow	Green	Red	0.26	1.98	0.17	0.08	0.68
Citric acid	Green	Yellow	Green	Red	0.298	1.40	0.40	0.30	0.63
<b>Endocytosis membrane traffic</b>									
Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine	Yellow	Red	Green	Green	0.666	11.10	15.74	0.40	11.538



**Figura 20. Cambios significativos en los niveles de metabolitos. Este análisis se realizó en células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP) e hipoxia (HP), y en células HT29NIS quiescentes en normoxia (NQ) e hipoxia (HQ). (A) Mapa de calor de metabolitos que cambian significativamente y están relacionados con glicólisis, ciclo de Krebs (TCA tricarboxylic cycle acids por su sigla en inglés) y tráfico endocítico de proteínas. El color verde indica aumento de los niveles, el color rojo disminución de los niveles. Los valores mostrados corresponden a  $p < 0.05$ . (B) Diagramas de Venn para vías que se alteran**

significativamente comparadas con células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.



**Figura 21. Regulación del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) en células HT29NIS proliferativas en normoxia (NP) y en hipoxia (HP), en células HT29NIS quiescentes en**

**normoxia (NQ) y en hipoxia (HQ).** Representación esquemática con los perfiles de expresión de metabolitos y enzimas detectadas.

### **9.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Con el fin de estudiar el mecanismo fundamental de esta retención de NIS inducida por hipoxia y quiescencia, se realizaron experimentos de proteómica y metabolómica que son mostrados en las figuras 20 y 21. La quiescencia induce muchos cambios en el proteoma de las células HT29NIS (Figura 20). Especialmente, como se esperaba, los niveles más bajos de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular de la replicación cromosómica se reducen por quiescencia (Figura 20C), además, se modifican otras vías como el metabolismo, señalización y tráfico celular). Por el contrario, la hipoxia indujo pocas variaciones globales del proteoma en nuestras condiciones experimentales. Se encontraron cambios globales similares en las rutas metabólicas (Figura 21). Un enfoque en el ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) (Figura 21) mostró que las enzimas relacionadas son inducidas principalmente por la quiescencia, y para los metabolitos relacionados con el TCA y el ácido pirúvico, encontramos niveles ligeramente reducidos en células proliferativas en condiciones hipóxicas si se compara con la condición normóxica como se esperaba. Nuestros resultados también mostraron un mayor nivel de los mismos metabolitos en células quiescentes en condiciones normóxicas en comparación con las células proliferativas, este aumento podría estar relacionado con niveles más altos de las enzimas. Finalmente, los metabolitos relacionados con el TCA y los niveles de ácido pirúvico disminuyeron fuertemente en las células quiescentes en condición de hipoxia. Este efecto es más que cambios acumulativos y podría explicar la disminución de la viabilidad celular (Figura 3). Hasta donde sabemos, ningún otro estudio se realizó con condiciones experimentales similares. Sin embargo, Lee y sus colaboradores (196) estudiaron

la transición de la quiescencia a la proliferación de una línea celular de linfocitos pro-B murinos no malignos en respuesta a IL-3 utilizando proteómica y metabolómica. Cabe señalar que las condiciones experimentales y las líneas celulares estudiadas son diferentes. Por lo tanto, los resultados de esta otra publicación con los de este estudio no se pueden comparar fácilmente. Por ejemplo, los perfiles temporales de las enzimas del ciclo TCA en respuesta a IL-3 están regulados negativamente, al contrario de los resultados aquí mostrados.

En este estudio se muestra por primera vez que la captación de yoduro mediada por NIS está alterada por la quiescencia o la hipoxia, probablemente como consecuencia de diferentes mecanismos de localización errónea de la proteína en la membrana plasmática. Varias publicaciones reportaron la expresión intracelular de NIS en células tumorales a pesar de los primeros reportes que mostraron baja expresión de proteínas en estudios de inmunohistoquímica de tumores de tiroides (49-51). Tazebay y sus colaboradores observaron mediante técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos anti-NIS que el 80% de los tumores de seno exhibieron marcaje intracelular (11). Otra publicación del mismo grupo reportó el marcaje intracelular de NIS en tiroides, mama y otros carcinomas (197). Los autores propusieron que NIS se sobre expresa en estos tumores, pero en lugar de ubicarse en la membrana basolateral, NIS se localiza predominantemente a nivel intracelular (197). El grupo TIRO demostró que NIS no se sobre expresa en compartimentos intracelulares en los cánceres de tiroides y de mama (198) y que la fuerte tinción intracelular observada se debe principalmente a la unión inespecífica de los anticuerpos (198). Sin embargo, no podemos descartar que la localización alterada de NIS en las células de cáncer de tiroides pueda contribuir a disminuir su expresión en la membrana plasmática y reducir la captación de yoduro mediada por NIS. Varios estudios demostraron que la localización de NIS en la membrana plasmática está fuertemente regulada (9) y se propusieron varios motivos de clasificación (6, 9), pero los mecanismos moleculares subyacentes siguen siendo desconocidos.

Varios estudios sobre diferentes proteínas de membrana demostraron que la hipoxia modula la endocitosis de las integrinas y de la Na, K-ATPasa (199). Por ejemplo, en células epiteliales alveolares, Dada y colaboradores demostraron que la endocitosis de Na, K-ATPasa inducida por hipoxia está mediada por especies reactivas de oxígeno mitocondriales, PKC-zeta (200) y activación de RhoA (201). Por otro lado, Kiang y colaboradores también informaron que la hipoxia indujo PKC (202), por lo tanto, se podría hipotetizar que los sitios de fosforilación de NIS podrían estar involucrados. Vadysirisack y colaboradores estudiaron cinco sitios de fosforilación de NIS, pero ninguno de ellos parece estar involucrado en la regulación de la proteína en la membrana plasmática (203) . Lo anterior sugiere que se requieren más estudios sobre otros sitios de fosforilación putativos.

Además de los supuestos sitios de fosforilación involucrados, Chung y colaboradores demostraron que la localización en la membrana de hNIS y su función de captación de yodo dependen de la glicosilación (204). Existen evidencias de que metabolitos pueden controlar directamente el tráfico endocítico de las proteínas (195), como la regulación de la glicosilación de proteínas específicas limitando los niveles de uridina difosfato N-acetilglucosamina. Nosotros encontramos que este compuesto aumenta significativamente en las células quiescentes (Figura 20A), lo que sugiere que la quiescencia podría inducir endocitosis de NIS y contribuir a reducir la localización de NIS en la membrana plasmática y reducir la captación de yoduro mediada por NIS. Para determinar si la retención intracelular de la proteína NIS se debe a alteraciones en el transporte celular en las condiciones de estudio, se analizaron varias de las proteínas implicadas en el transporte subcelular, a partir de los datos de abundancia de proteínas obtenidos del análisis proteómico de extractos proteicos obtenidos mediante espectrometría de masas (Figura 19A).

Para este análisis se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones: las células tumorales se adaptan a la hipoxia modulando la producción y utilización de

la energía; la endocitosis es un proceso que consume energía y que es suprimido durante la hipoxia (205). Todas las proteínas secretadas sintetizadas *de novo* destinadas a los sistemas secretorio y endolisosomal son transportadas desde el retículo endoplásmico (ER) al aparato de Golgi (AG) antes de ser liberadas a su destino final. Las proteínas secretadas son sintetizadas en el ER, salen del ER a ERES (sitio de salida del ER) en vesículas cubiertas con la proteína COPII, la cual es un coatómero, un complejo de proteínas de cubierta vesicular, responsable del transporte vesicular desde el retículo endoplasmático rugoso (RER) hasta el AG. Las vesículas con COPII son transportadas a un compartimiento intermediario de ER al AG (ERGIC). Las proteínas se clasifican en ERGIC en portadores anterógrados que las trasladan a Golgi. Después de pasar a través del AG, las proteínas son seleccionadas en la red del trans-Golgi (TGN) para ser liberadas a la membrana plasmática (PM), endosomas tempranos y tardíos (EE, LE) y en algunas células a gránulos secretorios. Una vía de reciclaje mediada por COPI recupera proteínas del AG y ERGIC y las devuelve al ER (206). La capa de proteínas COPI está compuesta por complejos heptaméricos llamados coátameros. Las vesículas COPI pueden transitar el camino de ida y vuelta al ER o pueden transportar proteínas a los compartimientos más proximales ( desde trans a Golgi medio, desde medio a cis-Golgi, desde cis-Golgi a ERGIC, y desde ERGIC a ER) (206). Sar1, Sec23/24, y Sec13/31 son los mínimos componentes requeridos para generar vesículas COPII *in vitro* (207). p115 es una proteína periférica de membrana presente en el compartimiento intermediario y vesículas del cis-Golgi que funcionan en el transporte del ER a AG (208). La clatrina está involucrada en cubiertas de membranas que son endocitadas desde la membrana plasmática y aquellas que se mueven entre la TGN y endosomas. Cuando cubre membranas, la clatrina no se une directamente a la membrana, sino que se asocia a través de proteínas adaptadoras, AP-2 y AP-1 que median la endocitosis en la membrana plasmática y el transporte mediado por clatrina desde la TGN a endosomas, respectivamente (209). La proteína naciente es traslocada al lumen del ER y a medida que una

proteína sintetizada *de novo* emerge, esta es secuencialmente modificada por una variedad de enzimas, en particular la adición de carbohidratos a través de enlaces N-glicosídicos y la formación de enlaces disulfuro, los cuales incrementan la solubilidad y estabilidad de la proteína, así como también chaperonas que promueven el plegamiento evitando la agregación de intermediarios. Muchos estudios que analizan la actividad transportadora de portadores de solutos (SLC) tras la eliminación de la N-glicosilación de SLC han reportado una función de transporte reducida, la cual, en la mayoría de los casos podría explicarse en parte por una reducida localización en la membrana (210). La proteína NIS tiene tres sitios de N-glicosilación (Asn485, Asn497, y Asn225 en el caso de NIS de rata) (2). Una proteína de membrana es generalmente producida en el ER, y luego se mueve hacia la membrana celular a través del AG, este proceso de localización en la membrana requiere modificaciones postraduccionales adecuadas de la proteína incluyendo fosforilación y glicosilación (211). Levi y colaboradores observaron que NIS es altamente glicosilada en membranas (212) y que la glicosilación está relacionada de algún modo con la maduración funcional de una proteína de membrana, al igual que el transporte y localización en la membrana plasmática (213). Sin embargo, los mismos autores reportaron que una triple mutante de NIS completamente no glicosilado fue altamente activa, y su afinidad por el yoduro y su tiempo de vida media son similares a los de la proteína NIS Silvestre (214). En otro estudio más reciente, publicado por Chun y colaboradores, midieron los cambios mediados por la glicosilación en la localización subcelular de hNIS y su función captadora de yoduro, demostraron que la glicosilación juega un papel crítico en la traslocación a la membrana de hNIS y esto da como resultado aumento en la captación de yoduro (204). Teniendo en cuenta la importancia del transporte celular en la localización correcta de las proteínas de membrana, nosotros analizamos cambios en la expresión de varias proteínas involucradas en este proceso (Figura 17A). En este análisis se evidencia una reducción significativa en hipoxia de proteínas asociadas con vesículas COP II de transporte anterógrado, vesículas

COP I de transporte retrogrado y endocitosis dependiente de clatrina como lo muestra la figura 19A. La reducción en la expresión de proteínas involucradas en vías de transporte celular analizadas en este estudio, alteran los procesos de transporte desde ER a AG y desde AG a la membrana plasmática. La proteína NIS sintetizada *de novo* es transportada desde ER a AG donde bajo condiciones normales esta es plegada y glicosilada y posteriormente transferida desde AG a la membrana plasmática para ejercer su actividad captadora de yoduro. De acuerdo al análisis realizado en este trabajo, se sugiere que la hipoxia reduce la expresión de proteínas claves en el transporte celular de proteínas de membrana, lo cual podría afectar el correcto plegamiento y glicosilación de la proteína NIS, favoreciendo su agregación y retención en vesículas intracelulares, reduciendo su correcta localización en la membrana celular y por consiguiente reduciendo significativamente su actividad captadora de yoduro, por lo tanto se reduce la eficacia de los tratamientos antitumorales basados en la proteína NIS. Una publicación reciente confirma nuestras observaciones, en esta publicación se identifica una secuencia motivo basada en monoleucina altamente conservada localizada en la parte carboxi terminal intracelular de NIS que es requerida para su localización basolateral. Simulaciones en computador sugieren que la subunidad  $\sigma 1$  de la proteína adaptadora AP-1B que se asocia con clatrina reconoce el motivo de monoleucina en el carboxi terminal de NIS y que células deficientes en AP-1B, comprometen la localización de NIS en la membrana plasmática basolateral, causando que la proteína sea expresada en la membrana plasmática apical (9)

Los resultados de proteómica indican que el efecto más fuerte sobre las vías de transporte celular (es decir, la señalización de endocitosis mediada por caveolas o la maduración de fagosomas) son observadas para las células quiescentes en hipoxia (Figura 19 (163)). Curiosamente, estudios recientes demostraron que la autofagia mediada por HMGB1 regula la degradación de la proteína NIS (215) y se propuso que la actividad de autofagia se asocia con la expresión de NIS en la membrana plasmática en los cánceres de tiroides (216). Teniendo en cuenta la

interconexión entre la hipoxia y la autofagia mediada por HIF-1 $\alpha$  y NF- $\kappa$ B (217), nuestros resultados sugieren que dicho mecanismo podría disminuir la expresión de NIS en la membrana plasmática en las células en condiciones hipóxicas.

Adicionalmente, nuestros resultados indican que la hipoxia y la quiescencia asociadas probablemente al microambiente tumoral podrían afectar fuertemente la expresión de NIS en la membrana plasmática y la captación de yoduro mediada por NIS, lo que permite sugerir que dicho mecanismo podría ocurrir en las células tumorales tiroideas durante la terapia radioactiva. Carcinomas de tiroides pobremente diferenciados se caracterizan por ser agresivos y presentan muy baja captación de yoduro. A pesar del muy bajo ARN mensajero codificante de NIS (218), la regulación postranscripcional de NIS por hipoxia y quiescencia que ocurre en las células tumorales tiroideas no puede excluirse y contribuye a la carencia total de captación de yoduro. En carcinomas de tiroides bien diferenciados (carcinoma papilar o carcinoma folicular), se reportó una disminución variable del ARN que codifica la proteína NIS (218). Según los estudios de metabolómica sobre cáncer de tiroides que muestran que las células tumorales aumentan la actividad glucolítica y disminuyen los productos del TCA relacionados con el efecto Warburg y la hipoxia (219), postulamos que la orientación de NIS a la membrana plasmática podría verse afectada en tumores de tiroides bien diferenciados por mecanismos moleculares similares a los descritos en este estudio. Entonces, el microambiente tumoral podría promover una menor captación de yoduro mediada por NIS en tumores de tiroides bien diferenciados y metástasis.

Una limitación de la terapia génica mediada por NIS es que, en la mayoría de los estudios preclínicos, la radioterapia eficiente requiere dosis radiactivas proporcionalmente más altas que las utilizadas actualmente para humanos y que son consideradas seguras. Para la mayoría de los estudios preclínicos reportados, se utilizaron xenoinjertos derivados de líneas celulares tumorales. La mayoría de estos modelos celulares crecen rápidamente y es probable que el xenoinjerto sea

similar a los descritos en este estudio utilizando células HT29NIS. La quiescencia y la hipoxia también deberían conducir a una menor expresión exógena de NIS en tales xenoinjertos. Como se esperaba de la rápida tasa de crecimiento de estas líneas de células tumorales, la expresión de NIS en xenoinjerto debería variar fuertemente en áreas diferente del xenoinjerto. Usando imágenes SPECT, el grupo TIRO observó una captación similar de yoduro limitada en el borde de los xenoinjertos usando líneas celulares que expresan NIS diferentes de HT29NIS. Nosotros podemos sugerir que la quiescencia y la hipoxia son más altas en tales xenoinjertos que en el tumor y, por lo tanto, contribuyen a subestimar los efectos radioterapéuticos utilizando modelos preclínicos basados en líneas celulares tumorales en estudios de radioterapia génica basada en NIS.

Nuestro estudio muestra por primera vez que la hipoxia y la quiescencia afectan fuertemente la captación de yoduro mediada por NIS. Se sugiere que este efecto esta dado por mecanismos postransduccionales que alteran principalmente la localización de la proteína NIS en la membrana plasmática. Los análisis de proteómica y metabolómica no dirigidos suministran las primeras ideas sobre los mecanismos moleculares fundamentales. Además, aquí se revela que la inhibición de la captación de yoduro mediada por NIS inducida por la quiescencia y la hipoxia debe tenerse en cuenta en la radioterapia de las células tumorales que expresan NIS.

## 10. CONCLUSIONES

- Se demuestra por primera vez que factores del microambiente tumoral como la hipoxia y la quiescencia afectan fuertemente la captación de yoduro mediada por NIS. Se sugiere que este efecto está dado por mecanismos postransduccionales que alteran principalmente la localización de la proteína NIS en la membrana plasmática, promoviendo su retención y agregación en áreas intracelulares.
- La hipoxia, pero no la quiescencia induce una disminución de la expresión de la proteína NIS en células HT29NIS.
- La transfección del gen de NIS en las células HT29WT modifica su metabolismo glucolítico y oxidativo, este cambio modifica el comportamiento celular en condiciones de hipoxia y quiescencia, lo que conduce a cambios en el pH extracelular y reducción de la viabilidad celular.
- El estado de quiescencia no modifica el metabolismo glucolítico de las células HT29NIS y HT29WT.
- Factores del microambiente tumoral como la quiescencia y la hipoxia, inducen cambios en el estado redox celular que están asociados con el metabolismo glucolítico y oxidativo.
- Se establece un modelo *in vitro* que permite ajustar las condiciones que ocurren en el microambiente tumoral *in vivo* reduciendo la complejidad del microambiente tumoral y facilitando el control de los factores que se desean analizar.

## 11. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

- . El modelo *in vitro* propuesto puede ser usado en el análisis de otros factores del microambiente tumoral como cambios en el pH, disponibilidad de nutrientes, estrés oxidativo, entre otros y sus implicaciones en la resistencia a tratamientos antitumorales basados en la proteína NIS.
- . Se sugiere realizar estudios donde se analicen cambios en la glicosilación de la proteína NIS en condiciones de quiescencia e hipoxia y su incidencia en la localización intracelular de esta proteína.
- . Mediante análisis proteómico se podrían hacer análisis de posibles cambios postraduccionales que sufre la proteína NIS en condiciones de quiescencia e hipoxia y su incidencia en el transporte celular de la proteína.
- . Cambios en el metabolismo glucolítico y oxidativo celular de las células HT29 transfectadas con el gen de NIS deben tenerse en cuenta en los estudios realizados con estas células para interpretar adecuadamente los resultados obtenidos.
- . Se sugieren estudios adicionales para definir la sensibilidad del promotor de CMV en condiciones de estrés celular tales como la hipoxia y el estado quiescente de las células.
- . En los ensayos de detección del estado redox celular se debe tener especial cuidado en el uso de componentes como NAC y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para una adecuada interpretación de los resultados, teniendo en cuenta que sus efectos son múltiples y dependen de las condiciones del ensayo.
- . Nuestro estudio revela que la inhibición de la captación de yoduro mediada por NIS inducida por la quiescencia y la hipoxia debe tenerse en cuenta en los estudios preclínicos que emplean la radioterapia en células tumorales que expresan NIS.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na(+)/I(-) symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(6):2697-700. Epub 2001/06/09.
2. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*. 1996;379(6564):458-60. Epub 1996/02/01.
3. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, et al. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;226(2):339-45. Epub 1996/09/13.
4. Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T. Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *The Journal of endocrinology*. 2001;170(1):185-96. Epub 2001/06/30.
5. Ravera S, Reyna-Neyra A, Ferrandino G, Amzel LM, Carrasco N. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular Physiology and Preclinical and Clinical Applications. *Annual review of physiology*. 2017;79:261-89. Epub 2017/02/14.
6. Darrouzet E, Lindenthal S, Marcellin D, Pellequer JL, Pourcher T. The sodium/iodide symporter: state of the art of its molecular characterization. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838(1 Pt B):244-53. Epub 2013/08/31.
7. Portulano C, Paroder-Belenitsky M, Carrasco N. The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS): mechanism and medical impact. *Endocrine reviews*. 2014;35(1):106-49. Epub 2013/12/07.
8. Choudhury PS, Gupta M. Differentiated thyroid cancer theranostics: radioiodine and beyond. *The British journal of radiology*. 2018;91(1091):20180136. Epub 2018/09/28.
9. Martin M, Modenutti CP, Peyret V, Geysels RC, Darrouzet E, Pourcher T, et al. A Carboxy-Terminal Monoleucine-Based Motif Participates in the Basolateral Targeting of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter. *Endocrinology*. 2019;160(1):156-68. Epub 2018/11/30.
10. Yin HY, Zhou X, Wu HF, Li B, Zhang YF. Baculovirus vector-mediated transfer of NIS gene into colon tumor cells for radionuclide therapy. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(42):5367-74. Epub 2010/11/13.
11. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH, et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nature medicine*. 2000;6(8):871-8. Epub 2000/08/10.
12. Honour AJ, Myant NB, Rowlands EN. Secretion of radioiodine in digestive juices and milk in man. *Clinical science*. 1952;11(4):449-62. Epub 1952/11/01.
13. Kilbane MT, Ajjan RA, Weetman AP, Dwyer R, McDermott EW, O'Higgins NJ, et al. Tissue iodine content and serum-mediated <sup>125</sup>I uptake-blocking activity in breast cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(3):1245-50. Epub 2000/03/17.
14. Cho JY, Leveille R, Kao R, Rousset B, Parlow AF, Burak WE, Jr., et al. Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter expression

- in mammary glands. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2000;85(8):2936-43. Epub 2000/08/18.
15. Dong L, Lu J, Zhao B, Wang W, Zhao Y. Review of the possible association between thyroid and breast carcinoma. *World journal of surgical oncology*. 2018;16(1):130. Epub 2018/07/07.
  16. Poole VL, McCabe CJ. Iodide transport and breast cancer. *The Journal of endocrinology*. 2015;227(1):R1-R12. Epub 2015/08/20.
  17. Elliyanti A, Putra AE, Sribudiani Y, Noormartany N, Masjhur JS, Achmad TH, et al. Epidermal Growth Factor and Adenosine Triphosphate Induce Natrium Iodide Symporter Expression in Breast Cancer Cell Lines. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2019;7(13):2088-92. Epub 2019/08/29.
  18. Carvalho DP, Ferreira AC. The importance of sodium/iodide symporter (NIS) for thyroid cancer management. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2007;51(5):672-82. Epub 2007/09/25.
  19. Dohan O, Carrasco N. Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Molecular and cellular endocrinology*. 2003;213(1):59-70. Epub 2004/04/06.
  20. Kim SH, Chung HK, Kang JH, Kim KI, Jeon YH, Jin YN, et al. Tumor-targeted radionuclide imaging and therapy based on human sodium iodide symporter gene driven by a modified telomerase reverse transcriptase promoter. *Human gene therapy*. 2008;19(9):951-7. Epub 2008/09/24.
  21. Liu RS, Hsieh YJ, Ke CC, Chen FD, Hwu L, Wang FH, et al. Specific activation of sodium iodide symporter gene in hepatoma using alpha-fetoprotein promoter combined with hepatitis B virus enhancer (EIIAPA). *Anticancer research*. 2009;29(1):211-21. Epub 2009/04/01.
  22. Barton KN, Stricker H, Brown SL, Elshaikh M, Aref I, Lu M, et al. Phase I study of noninvasive imaging of adenovirus-mediated gene expression in the human prostate. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16(10):1761-9. Epub 2008/08/21.
  23. Hart IR. Tissue specific promoters in targeting systemically delivered gene therapy. *Seminars in oncology*. 1996;23(1):154-8. Epub 1996/02/01.
  24. Lindencrona U, Nilsson M, Forssell-Aronsson E. Similarities and differences between free <sup>211</sup>At and <sup>125</sup>I- transport in porcine thyroid epithelial cells cultured in bicameral chambers. *Nuclear medicine and biology*. 2001;28(1):41-50. Epub 2001/02/22.
  25. Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, et al. Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology*. 2003;144(1):247-52. Epub 2002/12/19.
  26. Dadachova E, Bouzahzah B, Zuckier LS, Pestell RG. Rhenium-188 as an alternative to Iodine-131 for treatment of breast tumors expressing the sodium/iodide symporter (NIS). *Nuclear medicine and biology*. 2002;29(1):13-8. Epub 2002/01/12.
  27. Hingorani M, Spitzweg C, Vassaux G, Newbold K, Melcher A, Pandha H, et al. The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery. *Current cancer drug targets*. 2010;10(2):242-67. Epub 2010/03/06.

28. Son SH, Gangadaran P, Ahn BC. A novel strategy of transferring NIS protein to cells using extracellular vesicles leads to increase in iodine uptake and cytotoxicity. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:1779-87. Epub 2019/03/19.
29. Collier HA, Sang L, Roberts JM. A new description of cellular quiescence. *PLoS biology*. 2006;4(3):e83. Epub 2006/03/03.
30. Kyle AH, Baker JH, Minchinton AI. Targeting quiescent tumor cells via oxygen and IGF-I supplementation. *Cancer research*. 2012;72(3):801-9. Epub 2011/12/14.
31. Cheung TH, Rando TA. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14(6):329-40. Epub 2013/05/24.
32. Zhang X, de Milito A, Olofsson MH, Gullbo J, D'Arcy P, Linder S. Targeting Mitochondrial Function to Treat Quiescent Tumor Cells in Solid Tumors. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(11):27313-26. Epub 2015/11/19.
33. Brown J. Extra-thyroidal iodide metabolism in the rat. *Endocrinology*. 1956;58(1):68-78. Epub 1956/01/01.
34. Deneff JF, Bjorkman U, Ekholm R. Structural and functional characteristics of isolated thyroid follicles. *Journal of ultrastructure research*. 1980;71(2):185-202. Epub 1980/05/01.
35. Utiger RD. Therapy of hypothyroidism--when are changes needed? *The New England journal of medicine*. 1990;323(2):126-7. Epub 1990/07/12.
36. Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(43):27230-8. Epub 1997/10/27.
37. Watabe T, Kaneda-Nakashima K, Liu Y, Shirakami Y, Ooe K, Toyoshima A, et al. Enhancement of (211)At Uptake via the Sodium Iodide Symporter by the Addition of Ascorbic Acid in Targeted alpha-Therapy of Thyroid Cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2019;60(9):1301-7. Epub 2019/02/24.
38. <http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment>. National Cancer Institute; 2015 [cited 2016 March 2016].
39. Barton MB, Frommer M, Shafiq J. Role of radiotherapy in cancer control in low-income and middle-income countries. *The Lancet Oncology*. 2006;7(7):584-95. Epub 2006/07/04.
40. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2011;61(2):69-90. Epub 2011/02/08.
41. Bonnema SJ, Hegedus L. Radioiodine therapy in benign thyroid diseases: effects, side effects, and factors affecting therapeutic outcome. *Endocrine reviews*. 2012;33(6):920-80. Epub 2012/09/11.
42. Reiners C, Hanscheid H, Luster M, Lassmann M, Verburg FA. Radioiodine for remnant ablation and therapy of metastatic disease. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(10):589-95. Epub 2011/08/10.
43. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):292-306. Epub 2006/03/25.

44. Chung JK, Cheon GJ. Radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer: the first targeted therapy in oncology. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2014;29(3):233-9. Epub 2014/10/14.
45. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(3):184-99. Epub 2013/02/23.
46. Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(8):2892-9. Epub 2006/05/11.
47. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(4):1447-63. Epub 2001/04/12.
48. Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors. *Cancer*. 2005;103(7):1330-5. Epub 2005/03/02.
49. Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, et al. Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83(11):4102-6. Epub 1998/11/14.
50. Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, McGaughy VR, et al. An immunohistochemical study of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology*. 1998;139(10):4416-9. Epub 1998/09/29.
51. Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Roche PC, Ziesmer SC, Jhiang SM, et al. Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer. *The Journal of endocrinology*. 1999;163(3):495-504. Epub 1999/12/10.
52. Jung MY, Offord CP, Ennis MK, Kemler I, Neuhauser C, Dingli D. In Vivo Estimation of Oncolytic Virus Populations within Tumors. *Cancer research*. 2018;78(20):5992-6000. Epub 2018/08/18.
53. Warner SG, Kim SI, Chaurasiya S, O'Leary MP, Lu J, Sivanandam V, et al. A Novel Chimeric Poxvirus Encoding hNIS Is Tumor-Tropic, Imageable, and Synergistic with Radioiodine to Sustain Colon Cancer Regression. *Molecular therapy oncolytics*. 2019;13:82-92. Epub 2019/05/08.
54. Msaouel P, Opyrchal M, Dispenzieri A, Peng KW, Federspiel MJ, Russell SJ, et al. Clinical Trials with Oncolytic Measles Virus: Current Status and Future Prospects. *Current cancer drug targets*. 2018;18(2):177-87. Epub 2017/02/24.
55. Schlumberger M, Lacroix L, Russo D, Filetti S, Bidart JM. Defects in iodide metabolism in thyroid cancer and implications for the follow-up and treatment of patients. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2007;3(3):260-9. Epub 2007/02/23.
56. Kim YH, Youn H, Na J, Hong KJ, Kang KW, Lee DS, et al. Codon-optimized human sodium iodide symporter (opt-hNIS) as a sensitive reporter and efficient therapeutic gene. *Theranostics*. 2015;5(1):86-96. Epub 2015/01/02.

57. Kogai T, Brent GA. The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*. 2012;135(3):355-70. Epub 2012/07/04.
58. Liu J, Liu Y, Lin Y, Liang J. Radioactive Iodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer and Redifferentiation Therapy. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2019;34(3):215-25. Epub 2019/10/01.
59. Aashiq M, Silverman DA, Na'ara S, Takahashi H, Amit M. Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer: Molecular Basis of Redifferentiation Therapies, Management, and Novel Therapies. *Cancers*. 2019;11(9). Epub 2019/09/20.
60. Russo D, Damante G, Puxeddu E, Durante C, Filetti S. Epigenetics of thyroid cancer and novel therapeutic targets. *Journal of molecular endocrinology*. 2011;46(3):R73-81. Epub 2011/02/18.
61. Smith VE, Sharma N, Watkins RJ, Read ML, Ryan GA, Kwan PP, et al. Manipulation of PBF/PTTG1IP phosphorylation status; a potential new therapeutic strategy for improving radioiodine uptake in thyroid and other tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(7):2876-86. Epub 2013/05/17.
62. Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, et al. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368(7):623-32. Epub 2013/02/15.
63. Feng F, Yehia L, Ni Y, Chang YS, Jhiang SM, Eng C. A Nonpump Function of Sodium Iodide Symporter in Thyroid Cancer via Cross-talk with PTEN Signaling. *Cancer research*. 2018;78(21):6121-33. Epub 2018/09/16.
64. Feng F, Yehia L, Eng C. Pro-tumorigenic non-pump function of sodium iodide symporter: A reimaged Trojan horse? *Oncotarget*. 2019;10(7):688-9. Epub 2019/02/19.
65. Ribeiro Franco PI, Rodrigues AP, de Menezes LB, Pacheco Miguel M. Tumor microenvironment components: Allies of cancer progression. *Pathology, research and practice*. 2020;216(1):152729. Epub 2019/11/19.
66. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine*. 2011;17(11):1359-70. Epub 2011/11/09.
67. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(1):24-37. Epub 2006/01/07.
68. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(5):392-401. Epub 2006/03/31.
69. Ohlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisse M, et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *The Journal of experimental medicine*. 2017;214(3):579-96. Epub 2017/02/25.
70. Jena MK, Janjanam J. Role of extracellular matrix in breast cancer development: a brief update. *F1000Research*. 2018;7:274. Epub 2018/07/12.
71. Correa LH, Correa R, Farinasso CM, de Sant'Ana Dourado LP, Magalhaes KG. Adipocytes and Macrophages Interplay in the Orchestration of Tumor Microenvironment: New Implications in Cancer Progression. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1129. Epub 2017/10/04.

72. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *The Journal of cell biology*. 2012;196(4):395-406. Epub 2012/02/22.
73. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annual review of cell and developmental biology*. 2007;23:675-99. Epub 2007/07/25.
74. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(7):3983-8. Epub 2003/03/12.
75. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*. 2010;29(34):4741-51. Epub 2010/06/10.
76. Aponte PM, Caicedo A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem cells international*. 2017;2017:5619472. Epub 2017/05/06.
77. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(33):13820-5. Epub 2009/08/12.
78. Cheung TH, Quach NL, Charville GW, Liu L, Park L, Edalati A, et al. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature*. 2012;482(7386):524-8. Epub 2012/02/24.
79. Arnold CP, Tan R, Zhou B, Yue SB, Schaffert S, Biggs JR, et al. MicroRNA programs in normal and aberrant stem and progenitor cells. *Genome research*. 2011;21(5):798-810. Epub 2011/04/01.
80. La T, Liu GZ, Farrelly M, Cole N, Feng YC, Zhang YY, et al. A p53-Responsive miRNA Network Promotes Cancer Cell Quiescence. *Cancer research*. 2018;78(23):6666-79. Epub 2018/10/12.
81. Zalatnai A. Molecular aspects of stromal-parenchymal interactions in malignant neoplasms. *Current molecular medicine*. 2006;6(6):685-93. Epub 2006/10/07.
82. Laconi E. The evolving concept of tumor microenvironments. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2007;29(8):738-44. Epub 2007/07/11.
83. Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer research*. 2012;72(19):4875-82. Epub 2012/09/25.
84. Justus CR, Sanderlin EJ, Yang LV. Molecular Connections between Cancer Cell Metabolism and the Tumor Microenvironment. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(5):11055-86. Epub 2015/05/20.
85. Huang Y, Lin D, Taniguchi CM. Hypoxia inducible factor (HIF) in the tumor microenvironment: friend or foe? *Science China Life sciences*. 2017;60(10):1114-24. Epub 2017/10/19.
86. Paolicchi E, Gemignani F, Krstic-Demonacos M, Dedhar S, Mutti L, Landi S. Targeting hypoxic response for cancer therapy. *Oncotarget*. 2016;7(12):13464-78. Epub 2016/02/10.

87. Lendahl U, Lee KL, Yang H, Poellinger L. Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(12):821-32. Epub 2009/11/04.
88. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews Cancer*. 2004;4(11):891-9. Epub 2004/11/02.
89. Silva-Filho AF, Sena WLB, Lima LRA, Carvalho LVN, Pereira MC, Santos LGS, et al. Glycobiology Modifications in Intratumoral Hypoxia: The Breathless Side of Glycans Interaction. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2017;41(5):1801-29. Epub 2017/04/05.
90. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956;124(3215):269-70. Epub 1956/08/10.
91. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14. Epub 1956/02/24.
92. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes & development*. 2009;23(5):537-48. Epub 2009/03/10.
93. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*. 2008;7(1):11-20. Epub 2008/01/08.
94. Kennedy KM, Dewhirst MW. Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol*. 2010;6(1):127-48. Epub 2009/12/22.
95. Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2009;92(3):329-33. Epub 2009/07/17.
96. Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(12):3835-7. Epub 2008/11/27.
97. Hardee ME, Dewhirst MW, Agarwal N, Sorg BS. Novel imaging provides new insights into mechanisms of oxygen transport in tumors. *Current molecular medicine*. 2009;9(4):435-41. Epub 2009/06/13.
98. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. pH control mechanisms of tumor survival and growth. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(2):299-308. Epub 2010/09/22.
99. Odunewu A, Fliegel L. Acidosis-mediated regulation of the NHE1 isoform of the Na(+)/H(+) exchanger in renal cells. *American journal of physiology Renal physiology*. 2013;305(3):F370-81. Epub 2013/05/17.
100. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(14):9030-7. Epub 2006/02/03.
101. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Frontiers in physiology*. 2014;4:400. Epub 2014/01/11.

102. Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E, Bremer E, Wiersma VR. The multifaceted role of autophagy in cancer and the microenvironment. *Medicinal research reviews*. 2019;39(2):517-60. Epub 2018/10/12.
103. Cho RW, Clarke MF. Recent advances in cancer stem cells. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):48-53. Epub 2008/03/22.
104. Kumari S, Badana AK, G MM, G S, Malla R. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomarker insights*. 2018;13:1177271918755391. Epub 2018/02/17.
105. Weinberg F, Ramnath N, Nagrath D. Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment: An Overview. *Cancers*. 2019;11(8). Epub 2019/08/21.
106. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Advances in enzyme regulation*. 2006;46:113-40. Epub 2006/08/05.
107. Lin W, Shen G, Yuan X, Jain MR, Yu S, Zhang A, et al. Regulation of Nrf2 transactivation domain activity by p160 RAC3/SRC3 and other nuclear co-regulators. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 2006;39(3):304-10. Epub 2006/06/08.
108. Copple I.M. GCE, Kitteringham N.R., Park B.K. *Keap1-Nrf2 Cellular Defense Pathway: Mechanisms of Regulation and Role in Protection Against Drug-Induced Toxicity*. Berlin, Heidelberg Springer; 2010.
109. McMahan M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(34):24756-68. Epub 2006/06/23.
110. Tong KI, Kobayashi A, Katsuoka F, Yamamoto M. Two-site substrate recognition model for the Keap1-Nrf2 system: a hinge and latch mechanism. *Biological chemistry*. 2006;387(10-11):1311-20. Epub 2006/11/04.
111. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;236(2):313-22. Epub 1997/07/18.
112. Hagiya Y, Adachi T, Ogura S, An R, Tamura A, Nakagawa H, et al. Nrf2-dependent induction of human ABC transporter ABCG2 and heme oxygenase-1 in HepG2 cells by photoactivation of porphyrins: biochemical implications for cancer cell response to photodynamic therapy. *Journal of experimental therapeutics & oncology*. 2008;7(2):153-67. Epub 2008/09/06.
113. Chanas SA, Jiang Q, McMahan M, McWalter GK, McLellan LI, Elcombe CR, et al. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase *Gsta1*, *Gsta2*, *Gstm1*, *Gstm2*, *Gstm3* and *Gstm4* genes in the livers of male and female mice. *The Biochemical journal*. 2002;365(Pt 2):405-16. Epub 2002/05/07.
114. Sajadimajd S, Khazaei M. Oxidative Stress and Cancer: The Role of Nrf2. *Current cancer drug targets*. 2018;18(6):538-57. Epub 2017/10/04.

115. Romero R, Sayin VI, Davidson SM, Bauer MR, Singh SX, LeBoeuf SE, et al. Keap1 loss promotes Kras-driven lung cancer and results in dependence on glutaminolysis. *Nature medicine*. 2017;23(11):1362-8. Epub 2017/10/03.
116. Lignitto L, LeBoeuf SE, Homer H, Jiang S, Askenazi M, Karakousi TR, et al. Nrf2 Activation Promotes Lung Cancer Metastasis by Inhibiting the Degradation of Bach1. *Cell*. 2019;178(2):316-29 e18. Epub 2019/07/02.
117. Jeong Y, Hellyer JA, Stehr H, Hoang NT, Niu X, Das M, et al. Role of KEAP1/NFE2L2 Mutations in the Chemotherapeutic Response of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2020;26(1):274-81. Epub 2019/09/25.
118. Arbour KC, Jordan E, Kim HR, Dienstag J, Yu HA, Sanchez-Vega F, et al. Effects of Co-occurring Genomic Alterations on Outcomes in Patients with KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2018;24(2):334-40. Epub 2017/11/02.
119. Kitamura H, Onodera Y, Murakami S, Suzuki T, Motohashi H. IL-11 contribution to tumorigenesis in an NRF2 addiction cancer model. *Oncogene*. 2017;36(45):6315-24. Epub 2017/07/18.
120. Kitamura H, Motohashi H. NRF2 addiction in cancer cells. *Cancer science*. 2018;109(4):900-11. Epub 2018/02/17.
121. Stacy DR, Ely K, Massion PP, Yarbrough WG, Hallahan DE, Sekhar KR, et al. Increased expression of nuclear factor E2 p45-related factor 2 (NRF2) in head and neck squamous cell carcinomas. *Head & neck*. 2006;28(9):813-8. Epub 2006/04/26.
122. Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, Ojima H, Ohta T, Yamamoto M, et al. Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1358-68, 68 e1-4. Epub 2008/08/12.
123. Shibata T, Ohta T, Tong KI, Kokubu A, Odogawa R, Tsuta K, et al. Cancer related mutations in NRF2 impair its recognition by Keap1-Cul3 E3 ligase and promote malignancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(36):13568-73. Epub 2008/09/02.
124. Lister A, Nedjadi T, Kitteringham NR, Campbell F, Costello E, Lloyd B, et al. Nrf2 is overexpressed in pancreatic cancer: implications for cell proliferation and therapy. *Molecular cancer*. 2011;10:37. Epub 2011/04/15.
125. Rodriguez AE, Ducker GS, Billingham LK, Martinez CA, Mainolfi N, Suri V, et al. Serine Metabolism Supports Macrophage IL-1beta Production. *Cell metabolism*. 2019;29(4):1003-11 e4. Epub 2019/02/19.
126. Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer cell*. 2012;22(1):66-79. Epub 2012/07/14.
127. McDonald JT, Kim K, Norris AJ, Vlashi E, Phillips TM, Lagadec C, et al. Ionizing radiation activates the Nrf2 antioxidant response. *Cancer research*. 2010;70(21):8886-95. Epub 2010/10/14.

128. Tsukimoto M, Tamaishi N, Homma T, Kojima S. Low-dose gamma-ray irradiation induces translocation of Nrf2 into nuclear in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Journal of radiation research*. 2010;51(3):349-53. Epub 2010/04/23.
129. Lau A, Villeneuve NF, Sun Z, Wong PK, Zhang DD. Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacological research*. 2008;58(5-6):262-70. Epub 2008/10/08.
130. Richard-Fiardo P, Franken PR, Lamit A, Marsault R, Guglielmi J, Cambien B, et al. Normalisation to blood activity is required for the accurate quantification of Na/I symporter ectopic expression by SPECT/CT in individual subjects. *PloS one*. 2012;7(3):e34086. Epub 2012/04/04.
131. Gengenbacher N, Singhal M, Augustin HG. Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nature reviews Cancer*. 2017;17(12):751-65. Epub 2017/10/28.
132. Sabit H, Samy MB, Said OA, El-Zawahri MM. Procaine Induces Epigenetic Changes in HCT116 Colon Cancer Cells. *Genetics research international*. 2016;2016:8348450. Epub 2016/11/16.
133. Dayem M, Basquin C, Navarro V, Carrier P, Marsault R, Chang P, et al. Comparison of expressed human and mouse sodium/iodide symporters reveals differences in transport properties and subcellular localization. *The Journal of endocrinology*. 2008;197(1):95-109. Epub 2008/03/29.
134. Kim KI, Kang JH, Chung JK, Lee YJ, Jeong JM, Lee DS, et al. Doxorubicin enhances the expression of transgene under control of the CMV promoter in anaplastic thyroid carcinoma cells. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2007;48(9):1553-61. Epub 2007/08/21.
135. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *The FEBS journal*. 2016;283(3):413-24. Epub 2015/10/30.
136. Wendland K, Thielke M, Meisel A, Mergenthaler P. Intrinsic hypoxia sensitivity of the cytomegalovirus promoter. *Cell death & disease*. 2015;6:e1905. Epub 2015/10/16.
137. Leung CO, Wong CC, Fan DN, Kai AK, Tung EK, Xu IM, et al. PIM1 regulates glycolysis and promotes tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015;6(13):10880-92. Epub 2015/04/03.
138. Li XF, Ma Y, Sun X, Humm JL, Ling CC, O'Donoghue JA. High 18F-FDG uptake in microscopic peritoneal tumors requires physiologic hypoxia. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2010;51(4):632-8. Epub 2010/03/31.
139. Bedessem B, Stephanou A. A mathematical model of HiF-1alpha-mediated response to hypoxia on the G1/S transition. *Mathematical biosciences*. 2014;248:31-9. Epub 2013/12/19.
140. Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British journal of cancer*. 1999;80(12):1892-7. Epub 1999/09/02.
141. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development*. 2010;20(1):51-6. Epub 2009/11/28.

142. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *The Journal of endocrinology*. 2004;183(1):145-54. Epub 2004/11/05.
143. Denko NC. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(9):705-13. Epub 2009/01/15.
144. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(19):7555-9. Epub 1990/10/01.
145. Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, et al. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature communications*. 2013;4:2935. Epub 2013/12/18.
146. Filetti S, Vetri M, Damante G, Belfiore A. Thyroid autoregulation: effect of iodine on glucose transport in cultured thyroid cells. *Endocrinology*. 1986;118(4):1395-400. Epub 1986/04/01.
147. Rehab El nour Omer, Omer Musa Izz eldin and Reem Hassan Ahmed Rehab. Effect of potassium iodide on glucose, cholesterol and triglycerides levels in glucose loaded rats. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2015;5:96-9.
148. Zhang Z, Deng X, Liu Y, Sun L, Chen F. PKM2, function and expression and regulation. *Cell & bioscience*. 2019;9:52. Epub 2019/08/09.
149. Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator within the tumour metabolome and a tool for metabolic profiling of tumours. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings*. 2007(4):99-124. Epub 2008/09/25.
150. Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in the Body. *The Journal of general physiology*. 1927;8(6):519-30. Epub 1927/03/07.
151. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(46):43407-12. Epub 2001/09/15.
152. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33. Epub 2009/05/23.
153. Chesnelong C, Chaumeil MM, Blough MD, Al-Najjar M, Stechishin OD, Chan JA, et al. Lactate dehydrogenase A silencing in IDH mutant gliomas. *Neuro-oncology*. 2014;16(5):686-95. Epub 2013/12/25.
154. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(51):32529-37. Epub 1996/12/20.
155. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Panteliadou M, Pouliliou SE, Chondrou PS, Mavropoulou S, et al. Lactate dehydrogenase 5 isoenzyme overexpression defines resistance of prostate cancer to radiotherapy. *British journal of cancer*. 2014;110(9):2217-23. Epub 2014/04/10.

156. Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(2):155-71. Epub 2015/06/24.
157. Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J, et al. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS genetics*. 2008;4(12):e1000293. Epub 2008/12/06.
158. Xie J, Wu H, Dai C, Pan Q, Ding Z, Hu D, et al. Beyond Warburg effect--dual metabolic nature of cancer cells. *Scientific reports*. 2014;4:4927. Epub 2014/05/14.
159. Feine U, Lietzenmayer R, Hanke JP, Held J, Wohrle H, Muller-Schauenburg W. Fluorine-18-FDG and iodine-131-iodide uptake in thyroid cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1996;37(9):1468-72. Epub 1996/09/01.
160. Matsuzu K, Segade F, Matsuzu U, Carter A, Bowden DW, Perrier ND. Differential expression of glucose transporters in normal and pathologic thyroid tissue. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2004;14(10):806-12. Epub 2004/12/14.
161. Matsuzu K, Segade F, Wong M, Clark OH, Perrier ND, Bowden DW. Glucose transporters in the thyroid. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2005;15(6):545-50. Epub 2005/07/21.
162. Ruan M, Liu M, Dong Q, Chen L. Iodide- and glucose-handling gene expression regulated by sorafenib or cabozantinib in papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(5):1771-9. Epub 2015/03/15.
163. Rizwan H, Pal S, Sabnam S, Pal A. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes. *Life sciences*. 2020;241:117148. Epub 2019/12/13.
164. Holynska-Iwan I, Wroblewski M, Olszewska-Slonina D, Tyrakowski T. [The application of N-acetylcysteine in optimization of specific pharmacological therapies]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 2017;43(255):140-4. Epub 2017/10/08. Zastosowanie N-acetylocysteiny do optymalizacji specyficznych terapii farmakologicznych.
165. Serrano-Nascimento C, da Silva Teixeira S, Nicola JP, Nachbar RT, Masini-Repiso AM, Nunes MT. The acute inhibitory effect of iodide excess on sodium/iodide symporter expression and activity involves the PI3K/Akt signaling pathway. *Endocrinology*. 2014;155(3):1145-56. Epub 2014/01/16.
166. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2013;53:401-26. Epub 2013/01/09.
167. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, et al. Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(10):3436-44. Epub 2001/04/21.
168. Shi X, Zhang Y, Zheng J, Pan J. Reactive oxygen species in cancer stem cells. *Antioxidants & redox signaling*. 2012;16(11):1215-28. Epub 2012/02/10.
169. Ammon HP, Muller PH, Eggstein M, Wintermantel C, Aigner B, Safayhi H, et al. Increase in glucose consumption by acetylcysteine during hyperglycemic clamp.

A study with healthy volunteers. *Arzneimittel-Forschung*. 1992;42(5):642-5. Epub 1992/05/01.

170. Falach-Malik A, Rozenfeld H, Chetboun M, Rozenberg K, Elyasiyan U, Sampson SR, et al. N-Acetyl-L-Cysteine inhibits the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in diabetes-prone mice. *American journal of translational research*. 2016;8(9):3744-56. Epub 2016/10/12.

171. De la Vieja A, Santisteban P. Role of iodide metabolism in physiology and cancer. *Endocrine-related cancer*. 2018;25(4):R225-R45. Epub 2018/02/14.

172. Zhang L, Sharma S, Zhu LX, Kogai T, Hershman JM, Brent GA, et al. Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer research*. 2003;63(16):5065-72. Epub 2003/08/28.

173. Sarkar D, Chakraborty A, Saha A, Chandra AK. Iodine in excess in the alterations of carbohydrate and lipid metabolic pattern as well as histomorphometric changes in associated organs. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 2018;29(6):631-43. Epub 2018/08/02.

174. Liemburg-Apers DC, Willems PH, Koopman WJ, Grefte S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. *Archives of toxicology*. 2015;89(8):1209-26. Epub 2015/06/07.

175. Lorenz MA, Burant CF, Kennedy RT. Reducing time and increasing sensitivity in sample preparation for adherent mammalian cell metabolomics. *Analytical chemistry*. 2011;83(9):3406-14. Epub 2011/04/05.

176. Holman JD, Tabb DL, Mallick P. Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. *Current protocols in bioinformatics*. 2014;46:13 24 1-9. Epub 2014/06/19.

177. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*. 2010;11:395. Epub 2010/07/24.

178. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic acids research*. 2013;41(Database issue):D801-7. Epub 2012/11/20.

179. Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic acids research*. 2018;46(W1):W486-W94. Epub 2018/05/16.

180. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Current protocols in bioinformatics*. 2019;68(1):e86. Epub 2019/11/23.

181. Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K, Fukagawa S, Yamada H, Kuroki M, et al. Warburg effect regulated by amphiregulin in the development of colorectal cancer. *Cancer medicine*. 2015;4(4):575-87. Epub 2015/02/04.

182. Bosch EH, van Doorne H, de Vries S. The lactoperoxidase system: the influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months. *Journal of applied microbiology*. 2000;89(2):215-24. Epub 2000/09/06.

183. Huang YY, Choi H, Kushida Y, Bhayana B, Wang Y, Hamblin MR. Broad-Spectrum Antimicrobial Effects of Photocatalysis Using Titanium Dioxide

- Nanoparticles Are Strongly Potentiated by Addition of Potassium Iodide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(9):5445-53. Epub 2016/07/07.
184. Ihalin R, Loimaranta V, Tenovuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2006;445(2):261-8. Epub 2005/08/23.
185. Fischer AJ, Lennemann NJ, Krishnamurthy S, Pocza P, Durairaj L, Launspach JL, et al. Enhancement of respiratory mucosal antiviral defenses by the oxidation of iodide. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;45(4):874-81. Epub 2011/03/29.
186. Soriano O, Delgado G, Anguiano B, Petrosyan P, Molina-Servin ED, Gonsebatt ME, et al. Antineoplastic effect of iodine and iodide in dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumors: association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocrine-related cancer*. 2011;18(4):529-39. Epub 2011/06/22.
187. Rosner H, Moller W, Groebner S, Torremante P. Antiproliferative/cytotoxic effects of molecular iodine, povidone-iodine and Lugol's solution in different human carcinoma cell lines. *Oncology letters*. 2016;12(3):2159-62. Epub 2016/09/08.
188. Green WL. Further studies of the effects of inorganic iodide on thyroidal intermediary metabolism in vitro. *Endocrinology*. 1966;79(1):1-9. Epub 1966/07/01.
189. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental physiology*. 2006;91(5):807-19. Epub 2006/07/22.
190. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*. 2006;3(3):177-85. Epub 2006/03/07.
191. Maciewicz RA, Wotton SF, Etherington DJ, Duance VC. Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS letters*. 1990;269(1):189-93. Epub 1990/08/20.
192. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF. Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *The Biochemical journal*. 1992;282 ( Pt 1):273-8. Epub 1992/02/15.
193. Ostad M, Weiss R, Droller M, Liu B. Ha-ras oncogene induction of invasion and metastasis is associated with the activation and redistribution of protease(s) in rat-kidney cells. *International journal of oncology*. 1992;1(7):765-71. Epub 1992/12/01.
194. Park HJ, Makepeace CM, Lyons JC, Song CW. Effect of intracellular acidity and ionomycin on apoptosis in HL-60 cells. *Eur J Cancer*. 1996;32A(3):540-6. Epub 1996/03/01.
195. Rahmani S, Defferrari MS, Wakarchuk WW, Antonescu CN. Energetic adaptations: Metabolic control of endocytic membrane traffic. *Traffic*. 2019;20(12):912-31. Epub 2019/10/18.
196. Lee HJ, Jedrychowski MP, Vinayagam A, Wu N, Shyh-Chang N, Hu Y, et al. Proteomic and Metabolomic Characterization of a Mammalian Cellular Transition from Quiescence to Proliferation. *Cell reports*. 2017;20(3):721-36. Epub 2017/07/21.

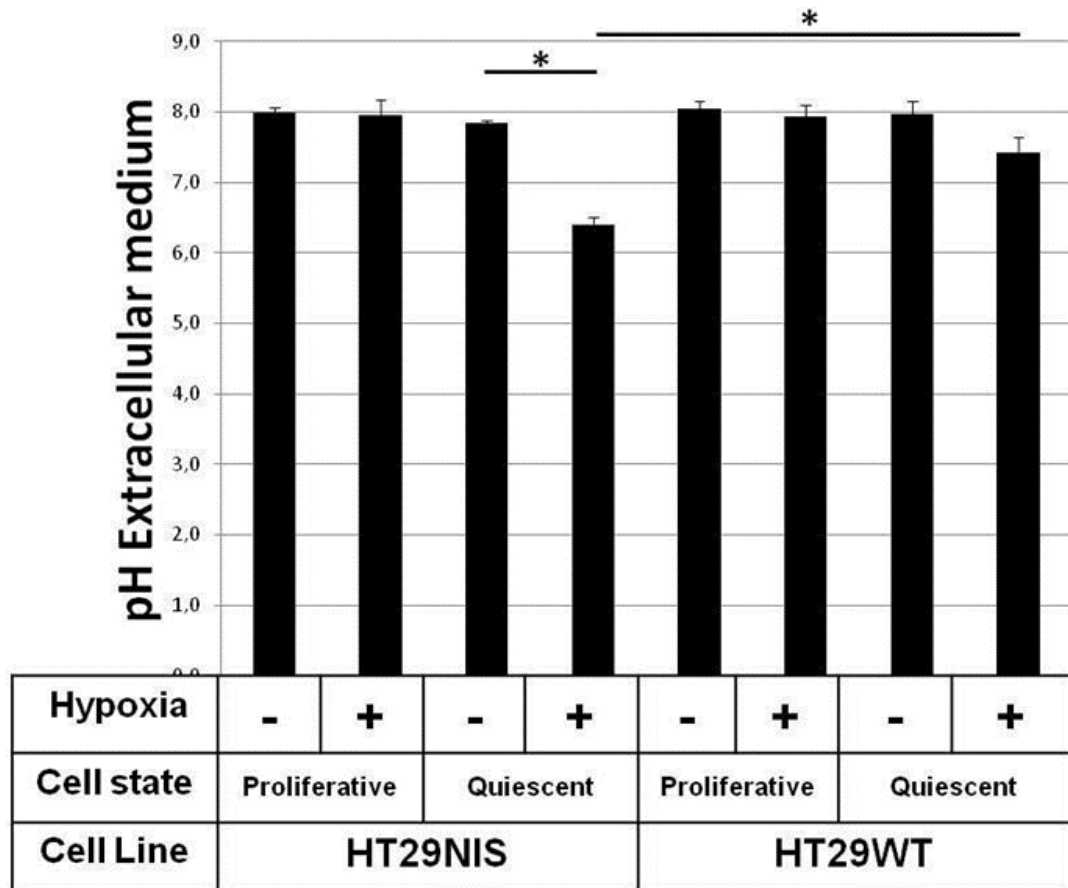
197. Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, et al. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(4):1880-8. Epub 2003/04/08.
198. Peyrottes I, Navarro V, Ondo-Mendez A, Marcellin D, Bellanger L, Marsault R, et al. Immunoanalysis indicates that the sodium iodide symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers. *European journal of endocrinology*. 2009;160(2):215-25. Epub 2008/11/26.
199. Wang Y, Ohh M. Oxygen-mediated endocytosis in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(3):496-503. Epub 2010/01/20.
200. Dada LA, Chandel NS, Ridge KM, Pedemonte C, Bertorello AM, Sznajder JI. Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(7):1057-64. Epub 2003/04/03.
201. Dada LA, Novoa E, Lecuona E, Sun H, Sznajder JI. Role of the small GTPase RhoA in the hypoxia-induced decrease of plasma membrane Na,K-ATPase in A549 cells. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 13):2214-22. Epub 2007/06/07.
202. Kiang JG, Wang XD, Ding XZ, Gist ID, Smallridge RC. Heat shock inhibits the hypoxia-induced effects on iodide uptake and signal transduction and enhances cell survival in rat thyroid FRTL-5 cells. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1996;6(5):475-83. Epub 1996/10/01.
203. Vadysirisack DD, Chen ES, Zhang Z, Tsai MD, Chang GD, Jhiang SM. Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(51):36820-8. Epub 2007/10/05.
204. Chung T, Youn H, Yeom CJ, Kang KW, Chung JK. Glycosylation of Sodium/Iodide Symporter (NIS) Regulates Its Membrane Translocation and Radioiodine Uptake. *PloS one*. 2015;10(11):e0142984. Epub 2015/11/26.
205. Wang Y, Roche O, Yan MS, Finak G, Evans AJ, Metcalf JL, et al. Regulation of endocytosis via the oxygen-sensing pathway. *Nature medicine*. 2009;15(3):319-24. Epub 2009/03/03.
206. Szul T, Sztul E. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)*. 2011;26(5):348-64. Epub 2011/10/21.
207. Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, et al. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 1998;93(2):263-75. Epub 1998/05/06.
208. Barroso M, Nelson DS, Sztul E. Transcytosis-associated protein (TAP)/p115 is a general fusion factor required for binding of vesicles to acceptor membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(2):527-31. Epub 1995/01/17.
209. Royle SJ. The cellular functions of clathrin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006;63(16):1823-32. Epub 2006/05/16.

210. Pedersen NB, Carlsson MC, Pedersen SF. Glycosylation of solute carriers: mechanisms and functional consequences. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2016;468(2):159-76. Epub 2015/09/19.
211. Huet G, Gouyer V, Delacour D, Richet C, Zanetta JP, Delannoy P, et al. Involvement of glycosylation in the intracellular trafficking of glycoproteins in polarized epithelial cells. *Biochimie*. 2003;85(3-4):323-30. Epub 2003/05/29.
212. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, et al. Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(11):5568-73. Epub 1997/05/27.
213. Zhou F, Xu W, Hong M, Pan Z, Sinko PJ, Ma J, et al. The role of N-linked glycosylation in protein folding, membrane targeting, and substrate binding of human organic anion transporter hOAT4. *Molecular pharmacology*. 2005;67(3):868-76. Epub 2004/12/04.
214. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(35):22657-63. Epub 1998/08/26.
215. Chai W, Ye F, Zeng L, Li Y, Yang L. HMGB1-mediated autophagy regulates sodium/iodide symporter protein degradation in thyroid cancer cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2019;38(1):325. Epub 2019/07/25.
216. Plantinga TS, Tesselaar MH, Morreau H, Corssmit EP, Willemsen BK, Kusters B, et al. Autophagy activity is associated with membranous sodium iodide symporter expression and clinical response to radioiodine therapy in non-medullary thyroid cancer. *Autophagy*. 2016;12(7):1195-205. Epub 2016/04/23.
217. Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life sciences*. 2017;188:53-67. Epub 2017/09/04.
218. Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Filetti S, et al. Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(9):3228-34. Epub 1999/09/16.
219. Xu XD, Shao SX, Jiang HP, Cao YW, Wang YH, Yang XC, et al. Warburg effect or reverse Warburg effect? A review of cancer metabolism. *Oncology research and treatment*. 2015;38(3):117-22. Epub 2015/03/21.

## ANEXOS

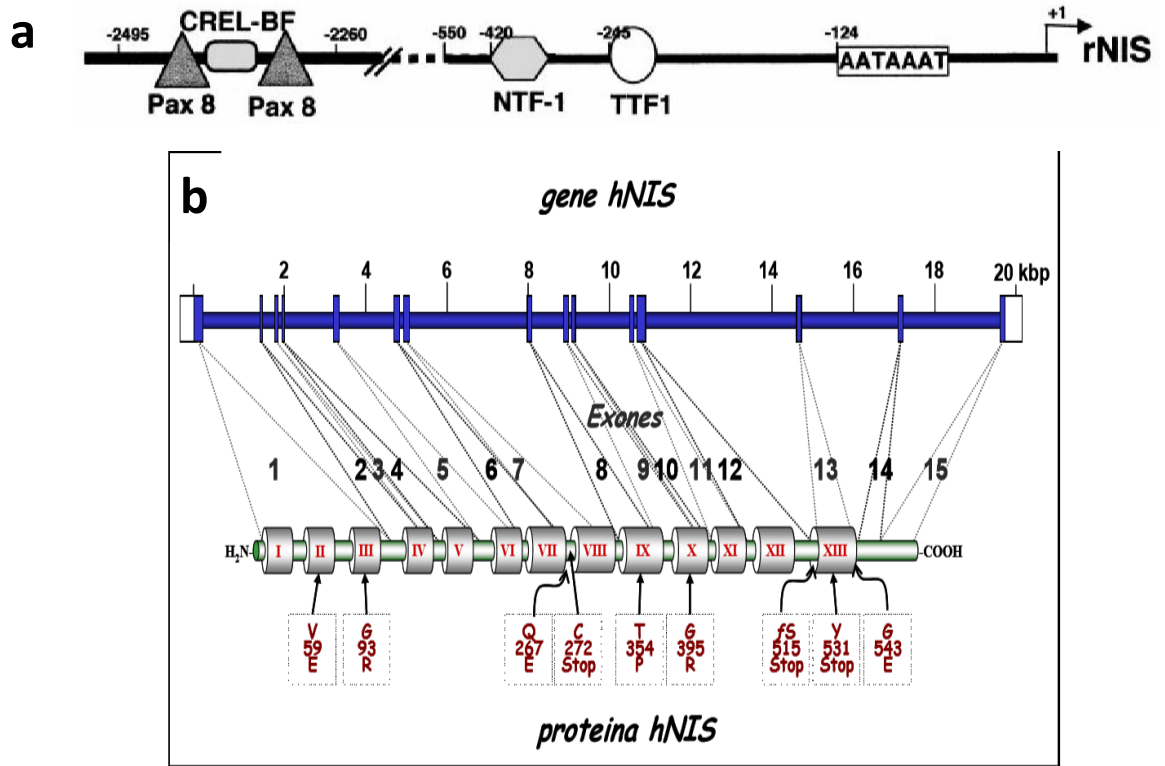
### A. Cambio de pH extracelular en células HT29NIS y HT29WT en condiciones de normoxia e hipoxia

Se evaluó el cambio de pH del medio de cultivo después de someter las células a las condiciones previamente indicadas. El pH del medio se midió mediante potenciómetro (Hanna Instruments USA Woonscket RI). Los resultados obtenidos son mostrados en la figura A. En este caso se observa una reducción significativa del pH del medio de cultivo de células HT29NIS quiescentes en hipoxia (pH=6.41). Es de resaltar que las células HT29WT quiescentes en hipoxia presentan una reducción del pH (pH=7.42) pero no tan marcada como la vista para las células HT29NIS en las mismas condiciones.

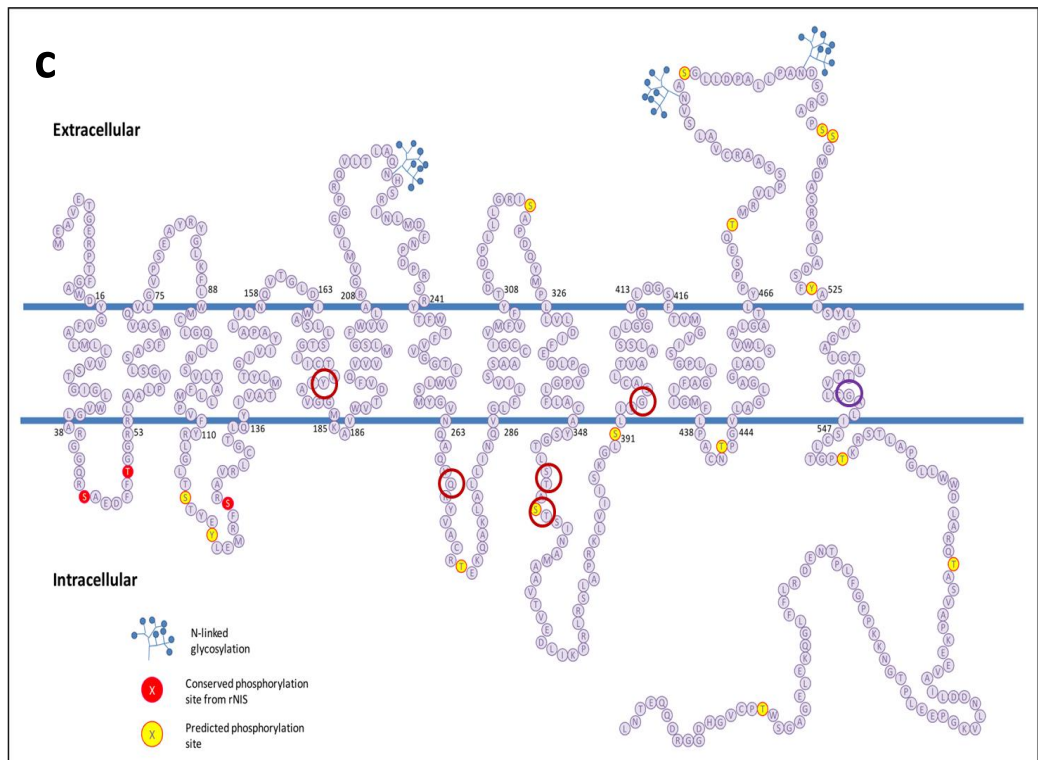


**Figura A. pH del medio de cultivo de células HT29WT y HT29NIS proliferativas y quiescentes bajo normoxia e hipoxia.** Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  SD (n=3). Las diferencias significativas corresponden a un \* p <0.05. El análisis estadístico fue realizado usando el programa SPSS 20 mediante ANOVA de un factor seguido por el método Posthoc-Bonferroni de comparación múltiple de medias.

## B. Estructura del gen y la proteína NIS.



De La Vieja, A, Dohan, O, Levy, O, and Carrasco, N. *Physiol Rev* 80: 1083–1105, 2000



Poole VL, McCabe CJ. *J Endocrinol.* 2015; 227(1):R1-R12.

**Figura B. Estructural del gen y la proteína NIS.** **a)** Representación esquemática de la estructura del promotor del gen de rNIS (NIS de rata). Los símbolos se refieren a sitios de unión mapeados por huella de DNAsa I. Los números indican las distancias desde los sitios de inicio de la transcripción correspondientes. Esta figura del promotor de NIS muestra dos regiones importantes 1) un promotor proximal, específico de tiroides aún cuestionable, se ha reportado que es regulado por TSH/cAMP por una secuencia de unión TRE, mediada por una nueva proteína NTF-1. 2) El promotor de NIS también tiene un potenciador (enhancer) que es específico de tiroides, con factores de unión similares a Pax8 y CRE. Parece probable que ambas regiones en el promotor actúen sinérgicamente para lograr alto nivel y completa transcripción. **b)** Correlación de la organización estructural del gen de NIS humano (hNIS) con la proteína. Los exones del gen de hNIS son representados con cuadros sombreados; las regiones no traducidas 5' y 3' son representadas por cuadros abiertos; Los 13 segmentos putativos transmembranales en la proteína son representados con cilindros. Los exones están conectados a las regiones de aminoácidos correspondientes de la proteína por líneas punteadas. Las 12 mutaciones que causan alteraciones en el transporte están indicadas abajo del esquema de la proteína hNIS. **c)** Modelo de estructura secundaria de NIS basado en la predicción realizada utilizando Uniprot. La estructura de NIS cuenta con 13 dominios transmembranales, el amino terminal está localizado hacia la parte extracelular, cuenta con tres sitios de glicosilación, y varios sitios de fosforilación coloreados de amarillo determinados por Netphos. En la región carboxi terminal localizada en el citosol, en NIS de rata se identificaron tres sitios de fosforilación coloreados con rojo, y otros sitios de posible fosforilación mostrados en amarillo. Por análisis de secuencia se detectan sitios regulatorios putativos PDZ, SH2, SH3, dileucinas, diácidas y dibásicas involucrados en la regulación del transporte de la proteína en la membrana. Mediante análisis de mutaciones se han identificado varios aminoácidos claves en la función captadora de yoduro los cuales corresponden a los resaltados en los círculos rojos. La glicina resaltada en azul se identificó como un aminoácido clave en la localización de NIS en la membrana.