



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación de la respuesta al tratamiento con radiaciones ionizantes en células de carcinoma de colon modificadas con el transportador NIS (HT29-NIS)**

**Daniel Fernando López Becerra**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Unidad de Bioquímica  
Bogotá, Colombia  
2017



# **Evaluación de la respuesta al tratamiento con radiaciones ionizantes en células de carcinoma de colon modificadas con el transportador NIS (HT29-NIS)**

**Daniel Fernando López Becerra**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Bioquímica**

**Director:**

Alejandro Oyono Ondo Méndez, Ph D.

**Codirectora:**

Yuly Edith Sánchez Mendoza, Ph D.

**Línea de Investigación:**

Mecanismos Bioquímicos y Moleculares de la respuesta celular a Estrés

**Grupo de Investigación:**

Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio) de la Universidad del Rosario

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Ciencias Fisiológicas  
Unidad de Bioquímica  
Bogotá, Colombia

2017



“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía. En la investigación científica siempre existe materia para nuevos descubrimientos y nuevas maravillas”

***Frankenstein. Mary Shelley***

***1818***



# Agradecimientos

Agradezco a mi familia en especial a mi Mamá, mi hermana y mis abuelos quienes siempre han estado conmigo apoyándome y exaltando lo que siempre hago.

A la siempre gloriosa Universidad Nacional de Colombia en donde he crecido como profesional y persona.

Al excelente programa de Maestría en Bioquímica de la Facultad de Medicina con unos excelentes docentes como Carlos Guerrero, Luis Alberto Gómez y Orlando Acosta; quienes imparten un seminario de investigación de incalculable valor académico.

A la universidad del Rosario por permitirme la realización este trabajo en conjunto con la Universidad de Niza y el Centro de Control del Cáncer Ltda.

Al profesor Alejandro Ondo por ser el mejor tutor y consejero, por su sabiduría, compromiso y orientación para poder culminar este trabajo de investigación.

A cada uno de los integrantes del grupo de investigación de Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio) de la Universidad del Rosario: Martha Pinzón, Fabio Castillo, Lilia del Riego, Luisa Mateus, Juan Carlos Alarcón y en especial a su Directora Ruth Garzón por acogerme como estudiante y permitir la realización del trabajo de investigación. En el grupo de investigación no solo se aprende a ser científico sino también a aplicar esos conocimientos en la vida académica y en general.

A la unidad TIRO en Niza Francia por facilitar el estudio en una de las áreas poco investigadas en Colombia: la Radiobiología, ciencia de la cual me enamore y que quiero comprender más.

A Colciencias por permitir la financiación de este trabajo por la convocatoria de Jóvenes Investigadores.

A Paulo Quintero, Físico Médico del Centro de Control del Cáncer, por su colaboración y asesoría en todo lo relacionado con radiación, sin él este trabajo no habría podido ser posible.

Al departamento de Estadística de la Universidad Nacional de Colombia y en especial a su servicio de Consultoría Estadística grupo conformado por Juan, Andrés y Cristian quienes realizaron parte del análisis estadístico que permitió dar significancia y valor estadístico a la investigación.

Al programa de Movilidad Académica Internacional, eje fundamental que permitió la internacionalización y presentación del trabajo tanto a nivel de Latinoamérica como en Europa.

A mis compañeros de laboratorio y maestría Yenith, Diego, Carolina y en especial a Lorena González por resolver mis dudas y darme ánimos a terminar la investigación.

A mi compañera de aventuras y mi amor Ibeth, cuyo apoyo y entendimiento fue fundamental para dar lo mejor de mí y culminar esta investigación.

A todos aquellos que de una forma u otra estuvieron involucrados en este proceso





## RESUMEN

La utilización de radioisótopos de yodo en medicina nuclear es una herramienta muy efectiva para el diagnóstico y tratamiento del cáncer tiroideo, basada en la actividad del co-transportador sodio/yodo (NIS) que cataliza el transporte activo de yodo. Recientemente se ha planteado la utilización de este transportador en terapia génica, para inducir su expresión en tejidos tumorales que normalmente no la producen y tratarlos con radioterapia metabólica ( $^{131}\text{I}$ ) y radioterapia de fuente externa como terapia combinada. Hallazgos *in-vivo* demostraron distribución heterogénea en captación de yodo y expresión del transportador en un modelo de tumor generado en ratones desnudos, sugiriendo una posible relación con las características heterogéneas del tumor. Sobre esta base, la presente investigación se enfocó en la evaluación del efecto de la expresión del transportador NIS en la respuesta al tratamiento con radiaciones ionizantes de fuente externa, y si dicho posible efecto permanece o se modifica al cambiar del estado proliferativo a quiescente, simulando una condición del microambiente tumoral. Todo lo anterior se realizó con miras a que esta alternativa sea utilizada como parte de un tratamiento combinado (terapia génica, radioterapia de haz externo y radioterapia metabólica) superando los problemas relacionados con la expresión heterogénea del transportador NIS.

Con este propósito, partiendo de un modelo celular parental (HT29-WT) y un modelo establemente transfectado con el transportador (HT29-NIS) en condiciones de cultivo que simulan la heterogeneidad tumoral en cuanto a grados de proliferación se refiere (proliferación y quiescencia) se evaluaron los siguientes aspectos: inicialmente la supervivencia celular posterior a la exposición con radiaciones ionizantes mediante ensayos clonogénicos, posteriormente se analizó de manera más detallada el efecto biológico de la radiación, evaluando tanto la medición del daño y reparación del ADN,

mediante ensayo cometa y determinación de la activación de sistemas de reparación del ADN por medio de la aparición de focos de la histona  $\gamma$ H2AX; finalmente, se evaluó la alteración del estrés oxidativo mediante la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) y evaluación de los niveles de expresión de proteína Nrf-2. Entre los resultados se destaca la mayor radiosensibilidad de las células que expresan el transportador comparada con la línea parental, y la mayor radiosensibilidad de las células en condición de quiescencia, soportado no solamente por los resultados obtenidos en las curvas de supervivencia sino también en la evaluación del daño y reparación del ADN y respuesta al estrés oxidativo celular. En resumen, la terapia génica puede ser aprovechada para obtener un mejor resultado en el tratamiento de tumores sólidos mediante la combinación de radioterapia metabólica y de haz externo.

**Palabras clave: Radiaciones ionizantes, Microambiente tumoral, Terapia génica, Quiescencia.**

## ABSTRACT

Using iodine radioisotopes in nuclear medicine is an effective tool in the diagnosis and treatment of thyroid cancer; this therapy is based in the activity of the sodium/iodide symporter (NIS) which catalyzes the active flow of iodine. Recently, the usage of this transporter in gene therapy has been proposed, this by inducing its expression in tumoral tissues that do not normally express it and subsequently treat it them with metabolic radiotherapy ( $^{131}\text{I}$ ) and external beam radiotherapy as a combined treatment. Findings in *in vivo*- studies using a naked mice tumor model have shown a heterogeneous distribution in the iodine uptake and expression of NIS protein, suggesting a relationship with the heterogeneous characteristics of the tumor, on this basis the present study was focused on the evaluation of the effect of NIS expression in external beam radiotherapy cell response, furthermore, was evaluated if this plausible effect remains or changes in proliferative and a quiescent state, simulating one condition of tumor microenvironment, this with a view to establish this therapy as an alternative of combined treatment (gene therapy, external beam radiotherapy and metabolic therapy) and therefore overcoming problems related to the heterogeneous distribution of the expression of NIS transporter.

Cell models, wild-type (HT29-WT) and the transporter based model (HT29-NIS) in culture conditions that simulated tumor heterogeneity referring to proliferative and quiescent conditions were used to evaluate: initially cell survival after the exposure to ionizing radiation with clonogenic assays, subsequently the biological effect of radiation evaluating DNA damage and activation of repairing systems with  $\gamma\text{H2AX}$  foci and comet assay, finally the oxidative stress was evaluated through the measuring of ROS and expression levels of Nrf-2. Among the most relevant results it raises special attention the increased radiosensitivity of cells expressing the transporter compared to the wild type cell line and the radiosensitivity of cells in quiescent conditions this supported by the results obtained in

the survival curves and in the DNA damage response and oxidative stress response, in conclusion gene therapy could be used to obtain better results in the treatment of solid tumors by means of combining metabolic therapy and external beam therapy.

**Keywords: Ionizing Radiation, Tumor Microenvironment, Gene Therapy, Quiescence.**



# TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XII
TABLA DE CONTENIDO .....	1
LISTA DE FIGURAS .....	3
LISTA DE ECUACIONES .....	5
LISTA DE TABLAS .....	6
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN .....	11
JUSTIFICACIÓN.....	15
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
1.1 Heterogeneidad tumoral.....	19
1.1.1 Modelos de Heterogeneidad Tumoral.....	19
1.1.2 Microambiente tumoral (TME).....	19
1.1.3 TME y Radioterapia .....	21
1.1.4 Quiescencia y Proliferación .....	21
1.1.5 Radiosensibilidad y tasa de proliferación .....	23
1.2 Principios de Terapia con Radiaciones.....	23
1.2.1 Radiaciones Ionizantes.....	23
1.2.2 Efectos Biológicos de la Radiación .....	24
1.3 Respuesta al daño en el ADN (DDR) .....	26
1.3.1 Fuentes de daño en el ADN.....	26
1.3.2 Daño en el ADN por IR .....	27
1.3.3 Sistemas de reparación del ADN .....	28
1.4 Estrés Oxidativo .....	30
1.4.1 IR y Estrés Oxidativo .....	30
1.4.2 Mecanismos de Defensa Antioxidante .....	30
1.4.3 Factores de Transcripción .....	31
1.5 Terapia Génica y NIS .....	32
<b>2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>35</b>

<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>39</b>
4.1 Metodología General .....	39
4.1.1 Mantenimiento del Cultivo Celular .....	39
4.1.2 Establecimiento de condiciones de proliferación y quiescencia .....	40
4.1.3 Irradiación Celular .....	40
4.2 Estrategia Experimental para lograr el primer objetivo .....	41
4.2.1 Ensayos Clonogénicos .....	41
4.2.2 Digitalización de Imágenes y Conteo de Colonias .....	41
4.2.3 Ajuste al modelo y realización de la curva .....	41
4.3 Estrategia Experimental para lograr el segundo objetivo.....	42
4.3.1 Electroforesis de células individuales (Ensayo Cometa).....	42
4.3.2 Inmunocitoquímica (ICC) de $\gamma$ -H2AX.....	43
4.4 Estrategia Experimental para lograr el tercer objetivo .....	44
4.4.1 Producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS) .....	44
4.4.2 Expresión de Proteínas en las células modificadas .....	45
4.5 Análisis Estadístico .....	49
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
5.1 ¿Cuál es la supervivencia de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes tratadas con radiaciones ionizantes? .....	52
5.2 ¿Cuál es el grado de daño en el ADN de las células HT29-WT y NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes posterior a la irradiación celular?...	55
5.3 ¿Cuál es la respuesta al daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes posterior a la irradiación celular? .....	61
5.4 ¿Cuáles son los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) posterior a la irradiación celular en las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes? .....	64
5.5 ¿Cuál es el estado de la vía de activación Nrf-2 por respuesta a estrés oxidativo en las líneas celulares posterior a la irradiación? .....	66
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>71</b>
6.1 Supervivencia celular .....	71
6.2 Daño en el ADN .....	73
6.3 Activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR).....	73
6.4 Estrés Oxidativo.....	75
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>81</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>84</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tumor subcutáneo inducido en ratones con células de cáncer de colon.....	16
<b>Figura 2.</b> Orígenes e influencia de la heterogeneidad tumoral. ....	20
<b>Figura 3.</b> Quiescencia celular. ....	22
<b>Figura 4.</b> Escala de tiempo de los efectos de exposición de la radiación en sistemas biológicos. ....	25
<b>Figura 5.</b> Daño del ADN por la radiación.....	27
<b>Figura 6.</b> Daño en el ADN y mecanismos de reparación.....	28
<b>Figura 7.</b> Figura ilustrativa densitometría Western Blot.....	47
<b>Figura 8.</b> Diagrama diseño de parcelas divididas.....	50
<b>Figura 9.</b> ¿Cuál es la supervivencia de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes tratadas con radiaciones ionizantes?	54
<b>Figura 10.</b> ¿Cuál es el grado de daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes posterior a la irradiación celular?	57
<b>Figura 11.</b> ¿Cuál es el grado de daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes? .....	59
<b>Figura 12.</b> ¿Cuál es la respuesta al daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes posterior a la irradiación celular?.....	62
<b>Figura 13.</b> ¿Cuál es la respuesta al daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo quiescentes posterior a la irradiación celular? .....	63
<b>Figura 14.</b> ¿Cuáles son los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) posterior a la irradiación celular en las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes? .....	65

**Figura 15.** ¿Cuál es el estado de la vía de activación Nrf-2 por respuesta a estrés oxidativo en las líneas celulares posterior a la irradiación en condiciones proliferantes? ..... 67

**Figura 16.** ¿Cuál es el estado de la vía de activación Nrf-2 por respuesta a estrés oxidativo celular en las células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones quiescentes? ..... 69

## LISTA DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Reacción de Fenton.....	30
<b>Ecuación 2.</b> Reacción de Haber-Weiss .....	30
<b>Ecuación 3.</b> Eficiencia de Sembrado .....	41
<b>Ecuación 4.</b> Ecuación de Fracción de Supervivencia .....	42
<b>Ecuación 5.</b> Inversión de la densidad del pixel. ....	48
<b>Ecuación 6.</b> Valor neto densitometría .....	48
<b>Ecuación 7.</b> Niveles de expresión de proteína de interés. ....	49

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño ejemplo para el primer bloque (HT29-NIS).....	50
--	----

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
Alt-EJ	Vía alternativa a NHEJ (Alternative end-joining)
ANOVA	Análisis de Varianza
ARE	Elementos de respuesta a antioxidantes (Antioxidant Response Elements)
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada (Ataxia-telangiectasia mutated)
ATR	Ataxia-telangiectasia mutada y Rad3 relacionada (Ataxia telangiectasia mutated and Rad3 Related)
BCA	Ácido bicinconínico (Bicinchoninic acid)
B-NHEJ	Vía de respaldo de la recombinación no homóloga (Back-up Non Homologous End Joining)
BER	Reparación por escisión de bases (Base Excision Repair)
BRCA1	Cáncer de mama 1 (Breast Cancer 1)
BSA	Albumina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)
CAF	Fibroblastos asociados a cáncer (Cancer Associated Fibroblasts)
CAT	Catalasa (Catalase)
CSC	Célula madre cancerosa (Cancer Stem Cells)
DCs	Células dendríticas (Dendritic cells)
DDR	Respuesta al daño en el ADN (DNA Damage Response)
DMEM	Medio eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
ADN	Acido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
D-NEHJ	Recombinación no homóloga dependiente de DNA-PK (DNA-PK-dependent Non-Homologous End Joining)
DNA-PKcs	Protein kinasa dependiente de ADN (DNA-dependent protein kinase)
DSBs	Quiebres de doble hebra (Double Strand Breaks)
EBRT	Radioterapia de haz externo (External Beam Radiotherapy)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraácetico (Ethylenediaminetetraacetic acid)
GCL	Glutamato cistein ligasa (Glutamate Cysteine Ligase)

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
GST	Glutacion transferasa (Glutathione S-transferase)
GTPx	Glutación peroxidasa (Glutathione peroxidase)
H <sub>2</sub> DFFDA	Marcador fluorogénico diacetato de 5(6)-carboxi2,7-difluorodihidrofluoresceína (5-(and-6)-carboxy-2',7'-dihydrofluorescein diacetate)
HO-1	Hemo-oxigenasa-1 (Heme oxygenase 1)
HR	Recombinación homóloga (Homologous Recombination)
HRP	Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase)
HT29-NIS	Células HT29 con el transportador NIS
HT29-WT	Células HT29 de tipo silvestre (wild-type)
ICC	Inmunocitoquímica (Immunocytochemistry)
IR	Radiaciones ionizantes (Ionizing Radiation)
IRT	Radioterapia interna (Internal Radiotherapy)
Keap-1	Proteína asociada a ECH tipo Kelch (Kelch-like ECH-associated protein)
LET	Transferencia Linear de Energía (Linear Energy Transfer)
MDC-1	Mediador del punto de control 1 del daño al ADN (Mediator Of DNA Damage Checkpoint 1)
MDSC	Células supresoras derivadas mieloides (Myeloid Derived Suppressor Cells)
MMR	Reparación Mismatch (Mismatch Repair)
MRN	Complejo MRN (MRN Complex)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
ND	No determinado
NER	Reparación por escisión de nucleótidos (Nucleotide Excision Repair)
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NHEJ	Recombinación no homóloga (Non Homologous End Joining)
NIS	Transportador de Sodio y Yodo (Sodium Iodide Symporter)
NK	Asesinas Naturales (Natural Killer)
NQO1	Quinona oxidoreductasa 1 (NAD(P)H dehydrogenase (quinone 1)
Nrf2	Factor relacionado al factor nuclear eritroide-2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)
PBS	Buffer fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)
PFA	Paraformaldehído (Paraformaldehyde)
PRX	Peroxiredoxina (Peroxiredoxin)
PVDF	Fluoruro de polivinilideno (Polyvinylidene Fluoride)
RIPA	Buffer para ensayo de radioinmunoprecipitación (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
RIS	Especies reactivas de yodo (Reactive Iodine Species)
RIT	Terapia de radioisótopos sistémica (Systemic radioisotope therapy)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno (Reactive Nitrogen Species)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
RPM	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)
SITIOS AP	Sitios abasicos o sitios AP (apurinicos/apirimidinicos)
SOD	Superoxido Dismutasa (Superoxide dismutase)
SPECT	Tomografía computarizada de emisión monofotónica (Single-photon emission computed tomography)
SSBs	Quiebres de hebra sencilla (Single Strand Breaks)
TAM	Macrofagos asociados al tumor (Tumor Associated Macrophages)
TAN	Neutrofilos asociados al tumor (Tumor Associated Neutrophiles)
TIRO	Transporteurs, Imagerie et Radiothérapie en Oncologie
TM	Momento de la cola (Tail Moment)
TME	Microambiente tumoral (Tumor Microenvironment)
TRX	Tioredoxina reductasa (Thioredoxin)
WB	Western Blot
WT	Tipo silvestre (Wild Type)
$\gamma$ H2AX	Gamma histona H2AX





## INTRODUCCIÓN

El cáncer se ha convertido en una enfermedad casi pandémica que ha puesto en alerta a varios entes gubernamentales a nivel mundial, por lo que su tratamiento se hace indispensable para el control de la salud de la población. (Cleary, Gelband, and Wagner 2015). Esta enfermedad es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial causando en el 2012 aproximadamente 8.2 millones de fallecimientos (Ferlay et al. 2015). Desde el 2008 se estima que la incidencia de cáncer ha incrementado en más del 20%, mientras que la mortalidad ha aumentado en un 14%. La incidencia es mayor en regiones más desarrolladas, pero la mortalidad es mayor en países menos desarrollados debido a la carencia de detección temprana y a las pocas facilidades de acceso a los tratamientos. (Bray et al. 2013).

Las alternativas terapéuticas para el tratamiento del cáncer son bien conocidas: cirugía, quimioterapia y radioterapia entre las más comunes, sin dejar de lado la inmunoterapia, terapia hormonal y terapia dirigida. Sin embargo, a pesar de las diversas opciones terapéuticas, en pocos casos se logra el control de la enfermedad en un 100%, dando lugar a reaparición de la enfermedad en otro sitio distinto al tumor original. A esto se le suma la gran cantidad de comorbilidades y efectos adversos al tratamiento que dificulta el uso de cualquier terapia. (Siegel et al. 2013).

La radioterapia metabólica, en la cual se irradian blancos terapéuticos mediante el uso de fármacos radioactivos (radiofármacos) basados en radionúclidos que emiten radiación  $\beta$  y que en la mayoría de los casos promueven la muerte celular (Vuillez 2005), es una de las técnicas que está cobrando fuerza en los últimos años ya que puede ser depositada

selectivamente tanto en tumores primarios y metástasis grandes como también en aquellos que son muy pequeños, facilitando su visualización, identificación y tratamiento, y contribuyendo ya sea a su diagnóstico en estadios tempranos de la enfermedad y/o permitiendo su posterior intervención con una terapia combinada por cirugía o radioterapia externa. Se considera por lo tanto que la radioterapia en general constituye un componente esencial en el manejo multidisciplinario de tumores malignos, dada su efectividad, la seguridad en cuanto a su administración y su relación costo beneficio. (Barton, Frommer, and Shafiq 2006).

A pesar del avance en los tratamientos tradicionales contra el cáncer, el pronóstico de los pacientes no ha mejorado significativamente. (Pellegriti et al. 2013). Estudios en la patogénesis molecular del cáncer han evidenciado la existencia de dianas moleculares con potencial terapéutico que permiten trasladar los conocimientos de la investigación básica a la clínica implementando nuevas terapias para el beneficio del paciente. (Fröhlich, Brossart, and Wahl 2009). El transportador de sodio y yodo (NIS por sus siglas en inglés) es una proteína expresada en niveles altos en órganos especializados en el metabolismo del yodo, tal como la tiroides y la glándula mamaria lactante, que por sus propiedades se ha convertido en una herramienta terapéutica que expresada en células cancerosas es de gran ayuda tanto en el ámbito diagnóstico como terapéutico puesto que el transportador posee sustratos radiactivos como yoduro ( $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ , y  $^{131}\text{I}$ ) y pertecnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ). (Wapnir et al. 2003). Debido al éxito de la radioterapia metabólica con yoduro para cáncer tiroideo, el gen de NIS ha sido introducido en otros tipos de cáncer para lograr la suficiente acumulación de  $^{131}\text{I}$  para la ablación de tumores extratiroideos. (Kogai and Brent 2013).

La terapia génica es una alternativa terapéutica que surge a partir de las enfermedades de origen genético en las cuales la patología es causada por la aparición de un gen defectuoso y por lo tanto una proteína defectuosa la mayoría de veces no funcional o con funciones aberrantes; mediante el uso de esta terapia se busca introducir un gen que ya no sea defectuoso y que exprese una proteína funcional permitiendo la mejoría del paciente. (Rodríguez, Josefa A., Lina M. Martínez 2014; Yunta 2003).

Teniendo en cuenta antecedentes en donde se evidencian que al realizar tratamiento con yodo radiactivo no se presenta una captación homogénea en un tumor subcutáneo inducido con células de cáncer de colon HT29-mNIS en ratones desnudos NOD SCID (Comunicación personal Dr. Thierry Poucher), con este estudio se pretende evaluar en primera instancia el efecto de la expresión de la proteína NIS sobre la respuesta de las células tumorales a la radioterapia de haz externo y posteriormente la posible alteración de esta respuesta en condiciones de proliferación y quiescencia.

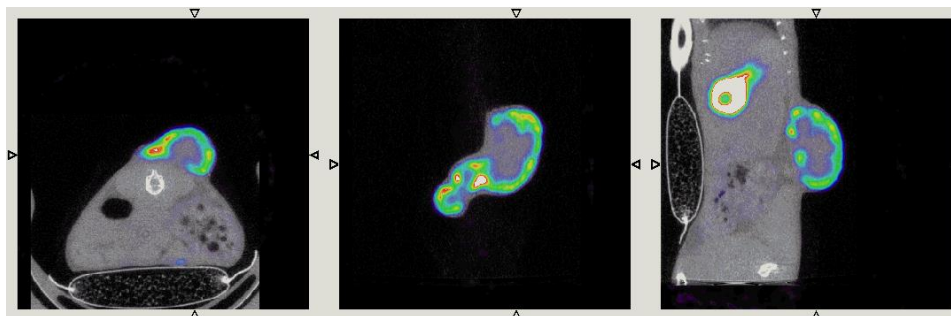
Este trabajo se realizó en dos fases. La primera se centró en la comparación de la radioresistencia entre la línea parental y la línea con el transportador NIS. Basados en las diferencias de supervivencia que se hallaron entre las líneas celulares, se desarrolló una segunda fase en la cual se analizó de manera más detallada el efecto biológico de la radiación: evaluándose el grado de daño en el ADN celular mediante el ensayo de electroforesis de células individuales o ensayo cometa y se determinó la activación de sistemas de reparación del ADN por medio de la aparición de focos de la fosforilación de la histona  $\gamma$ H2AX; finalmente se evaluó la alteración del metabolismo oxidativo mediante la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) y evaluación de los niveles de expresión de Nrf-2. Todo lo anterior se realizó inicialmente en condiciones de proliferación y posteriormente en condiciones de quiescencia para evaluar una condición del microambiente tumoral.



## JUSTIFICACIÓN

Por su relación costo-beneficio, uno de los tratamientos más comunes en la práctica médica para el tratamiento del cáncer es la radioterapia (Barton, Frommer, and Shafiq 2006). Sin embargo, el estudio escaso en el campo de la radiobiología en el país conlleva a una comprensión limitada de los procesos moleculares y bioquímicos implicados en este tipo de tratamiento. Conscientes del impacto que tiene el cáncer en la sociedad, y adicionalmente a que más de la mitad de todos los pacientes en tratamiento contra el cáncer recibirán radioterapia en algún punto durante su tratamiento (Joiner 2009), el grupo BIO-BIO ha creado alianzas con el grupo TIRO (Transporteurs, Imagerie et Radiothérapie en Oncologie) de la Universidad de Niza y el Centro de Control de Cáncer Ltda., con el objetivo de desarrollar investigación conjunta para la generación de conocimiento en la bioquímica del cáncer y la respuesta de la célula al daño por radiación: radiobiología, y más específicamente en el uso de la radioterapia metabólica basada en el transportador NIS, generando de esta manera herramientas que permitan optimizar la eficacia de dichos tratamientos.

En un modelo *in vivo* realizado en la universidad de Niza por el grupo TIRO se obtuvieron imágenes SPECT que evidencian la existencia de zonas heterogéneas en la incorporación de los radioisótopos de yodo en tumores inducidos. Observándose en la parte externa del tumor una mayor captación del yodo y una alta expresión de la proteína NIS, mientras que en la parte interna se observó una menor o nula captación del mismo sugiriendo una disminución de la expresión de NIS en esta región del tumor (Figura 1).



**Figura 1.** 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. 27 días pos-i. (Comunicación personal Dr. Thierry Poucher).

El establecimiento de modelos *in vitro* que permiten simular las condiciones *in vivo* en los tumores, es el inicio para comprender los componentes e interacciones que se presentan a nivel del microambiente tumoral, de esta manera se contribuye en gran medida a razonar sobre la complejidad del cáncer, lo que a su vez es la base en el diseño racional de nuevas estrategias para el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad. La reducción en la capacidad de captar yodo en las regiones externas de los tumores generados en ratones, es el punto de partida de la investigación y es el modelo que se trasladara al ámbito *in vitro* con el objetivo de identificar dificultades en el uso de la radioterapia metabólica basada en NIS y plantear soluciones basadas en la respuesta de las líneas celulares a la radiación de haz externo.

El grupo de investigación de bioquímica y biotecnología (Bio-Bio) de la Universidad del Rosario, con su línea de investigación en mecanismos bioquímicos y moleculares de la respuesta celular activada por estrés tiene un gran interés en simular algunas condiciones del microambiente tumoral y estudiar en este contexto el efecto de la introducción de una proteína en específico, el transportador de sodio y yodo (NIS) en una línea celular de cáncer de colon que no lo expresa de manera constitutiva; de esta forma y basados en las propiedades de transporte de radionúclidos que posee la proteína, los tumores genéticamente modificados con el transportador podrían ser destruidos utilizando herramientas de la medicina nuclear como el yodo radioactivo ( $^{131}\text{I}$ ). (Darrouzet et al. 2014). Los avances que se logren en el desarrollo de nuevas terapias, la optimización de la aplicación de la radioterapia génica (terapia génica + radioterapia) y los avances que se

hagan en sistemas de liberación que faciliten la expresión de genes específicos a nivel terapéutico sin producir citotoxicidad en las células normales, contribuirán en el control del cáncer, reduciendo la metástasis y la supervivencia de células tumorales en los pacientes afectados con esta enfermedad. El eje principal para lograr conseguir estos avances, es la generación de conocimiento desde las ciencias básicas tal como lo son la bioquímica y la radiobiología, este trabajo contribuye a la comprensión de aspectos básicos sobre la respuesta de células cancerígenas a la radioterapia de haz externo (EBRT por sus siglas en inglés), específicamente en una línea celular que no expresa el transportador de manera constitutiva y que es sometida a condiciones típicas del microambiente tumoral como la proliferación y la quiescencia.





# **1.MARCO TEÓRICO**

## **1.1 Heterogeneidad tumoral**

### **1.1.1 Modelos de Heterogeneidad Tumoral**

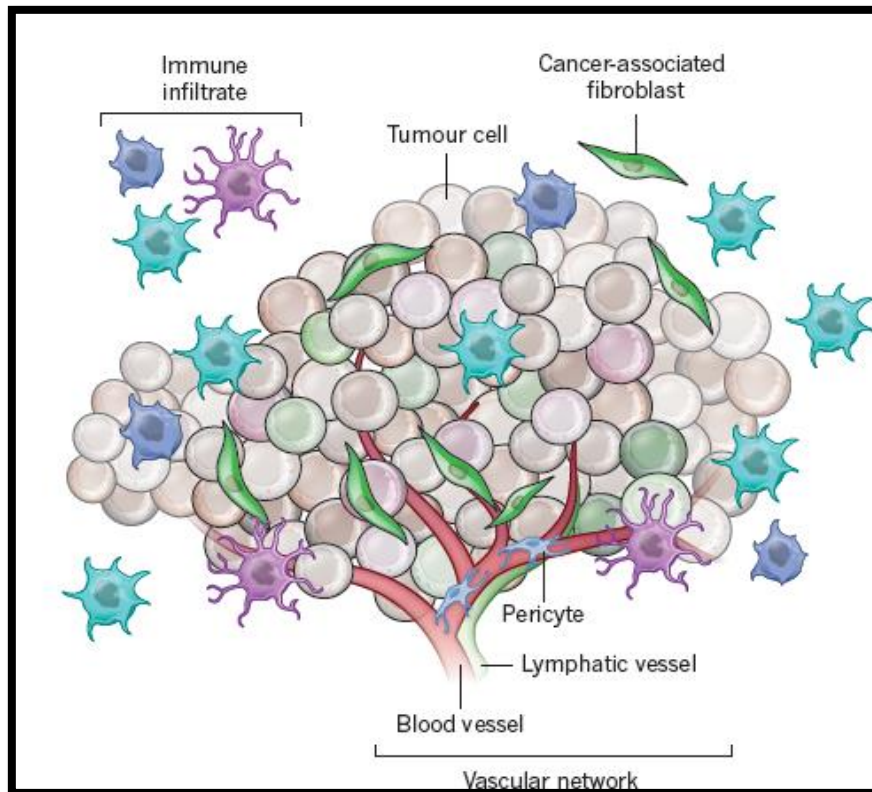
El cáncer ha sido tradicionalmente clasificado como un proceso progresivo de mutaciones genéticas y epigenéticas que definen la base de un modelo de progresión tumoral donde las células se transforman desde un estado normal (sano) y adquieren un fenotipo pre-maligno, maligno y migratorio. Este concepto de heterogeneidad tumoral se encuentra enmarcado en el principio básico Darwiniano de la selección natural, lo que conduce a distintas generaciones de expansión clonal, resultando en subclones con distintas capacidades de proliferación, migración e invasión. (Zellmer and Zhang 2014). De manera alterna se propone que los tumores se encuentran organizados “jerárquicamente”, señalando como células iniciadoras a aquellas con la capacidad de auto-renovarse y generar células más diferenciadas que forman la masa del tumor, células denominadas cáncer stem cells (CSC) (Brooks, Burness, and Wicha 2015).

De esta manera se describen dos modelos de heterogeneidad tumoral: el basado en las mutaciones genéticas y epigenéticas denominado evolución clonal, y el basado en las células cancerígenas con características de células stem. Los modelos no son mutuamente excluyentes, y se cree que ambos contribuyen a la heterogeneidad en cantidades variables en los tipos de tumores diferentes (Shackleton et al. 2009).

### **1.1.2 Microambiente tumoral (TME)**

La formación del tumor no solo involucra la co-evolución de las células neoplásicas sino también la matriz extracelular, el endotelio vascular y estromal y las células inmunes. Es así que el nicho tumoral se define como una topografía física dinámica en la cual el soporte

estructural, acceso a factores de crecimiento, suministro vascular e interacciones de células inmunes pueden variar drásticamente aun entre la misma lesión (Junttila and de Sauvage 2013).



**Figura 2.** Orígenes e influencia de la heterogeneidad tumoral.

Tomado de, Junttila & de Sauvage, "Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response". *Nature*, Vol 501, 2013, 346-354.

La heterogeneidad tumoral comprende entonces el concepto de microambiente tumoral (TME, por sus siglas en inglés) en donde es posible distinguir varios tipos celulares; se destacan células del sistema inmune como Natural Killers (NK), linfocitos T y B, macrófagos asociados al tumor (TAM), células supresoras derivadas mieloides (MDSC), células dendríticas (DC), neutrófilos asociados al tumor (TAN), fibroblastos asociados a cáncer (CAF), adipocitos y pericitos (Balkwill, Capasso, and Hagemann 2012), así como también factores adicionales como la acidez y la hipoxia que influyen drásticamente en la supervivencia y repoblación de células cancerígenas que eventualmente originan una heterogeneidad tumoral y por lo tanto dificultades en el tratamiento de la enfermedad (Chen et al. 2015).

### 1.1.3 TME y Radioterapia

El tratamiento del cáncer no tiene una efectividad del 100% en parte debido a la heterogeneidad de las poblaciones celulares de los tumores y las condiciones del microambiente tumoral, dado que un tratamiento puede ser efectivo en cierta subpoblación del tumor pero no en las otras, e incluso puede que otro paciente no presente la subpoblación susceptible al tratamiento aplicado (Mohanty, Datta, and Venkatraj 2014).

Las radiaciones ionizantes han sido empleadas para el tratamiento del cáncer por más de un siglo debido a sus efectos citotóxicos en las células cancerígenas. Se han desarrollado diversos estudios con el objetivo de comprender la señalización celular que da a lugar a la citotoxicidad posterior a la exposición a la radiación ionizante, encontrando diferencias entre los resultados provenientes de modelos *in vitro* y modelos *in vivo*. Esas discrepancias son probablemente debidas a la compleja interrelación entre las células tumorales y su microambiente, debido a que los ensayos *in vitro* no toman en cuenta interacciones entre las células y el estroma, ni condiciones como la hipoxia. El microambiente tumoral funciona entonces como un componente extrínseco que influencia la radiosensibilidad (Ivan and Huang 2014).

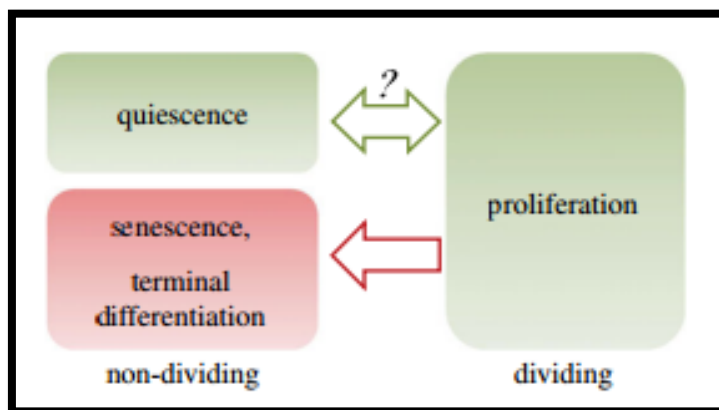
Como componente esencial de este trabajo se simuló la condición de microambiente tumoral relacionada con la tasa de proliferación, definiéndose condiciones apropiadas para células proliferantes y células en estado de quiescencia. Es por ello que es importante conocer los antecedentes relacionados con la respuesta al tratamiento con radiaciones ionizantes influenciados directamente por las diferencias de tasas proliferativas comúnmente encontradas en el microambiente tumoral.

### 1.1.4 Quiescencia y Proliferación

Aunque la quiescencia es un estado celular común para muchas células somáticas, incluyendo células madre, se conoce muy poco acerca de la regulación de la quiescencia celular. De hecho, es más fácil reconocer a una célula quiescente por aquello que no está especializada para hacer (síntesis de ADN, generación de husos mitóticos). Debido a este

desconocimiento, establecer las condiciones a nivel de investigación *in vitro* ha sido laborioso (Venezia et al. 2004). En la actualidad son usadas señales que permitan el arresto en el crecimiento y división celular tales como la privación de mitógenos, el crecimiento a alta densidad (“inhibición por contacto”) y la disrupción de las adhesiones célula-sustrato (“perdida de la adhesión”). (Coller, Sang, and Roberts 2006).

Una definición comúnmente aceptada de quiescencia es: “una ausencia reversible de proliferación”, de esta manera una célula que no se pueda dividir es considerada como una célula quiescente genuina. Sin embargo, la definición es vaga y probablemente pueda cubrir varias situaciones celulares, de aquí la importancia de diferenciarla de un estado senescente o apoptótico en donde la posibilidad de reversibilidad no existe y el único camino que tiene la célula es la muerte. (B Daignan-Fornier and Sagot 2011); (Bertrand Daignan-Fornier and Sagot 2011).



**Figura 3.** Quiescencia celular.

Tomado de, G. Yao, “Modelling mammalian cellular quiescence” Interface Focus 4: 2013.

En el presente estudio las condiciones que son utilizadas para simular un estado quiescente son la privación de suero fetal bovino (SFB), con el objetivo de retirar la mayoría de factores de crecimiento y por lo tanto señales mitogénicas, y la inhibición por contacto; ambos métodos comúnmente utilizados por otros autores. (Yao 2014), (Rutherford and Ross 1976), (Kues et al. 2000).

### **1.1.5 Radiosensibilidad y tasa de proliferación**

En el año 1906 Bergonié y Tribondeau explicaron el link entre proliferación y radiosensibilidad y para ello formularon una ley:

“Los rayos X actúan más eficientemente en células que poseen una gran actividad reproductiva; la efectividad es mayor en aquellas células que poseen un ciclo de vida más largo, por lo tanto, más fases de división, y en aquellas células cuya morfología y función se encuentran bien definidas”. Se concluye entonces que la radiación destruye tumores sin afectar tejidos sanos (Bergonié and Tribondeau 1959).

Pocos años después de ser propuesta esta ley varios contradictores, y dentro de ellos el más importante Regaud, ponen en duda este postulado alegando una generalización de los conceptos en una única línea celular. Actualmente se consideran los siguientes principios por los cuales la ley de Bergonie y Tribondeau no es general:

- Los tumores no son necesariamente más radiosensibles que los tejidos normales.
- La tasa de proliferación no se encuentra necesariamente correlacionada con la muerte celular posterior a la irradiación.
- La radiosensibilidad y la susceptibilidad del cáncer después de la irradiación son dos nociones diferentes.
- Las líneas celulares tumorales exhiben un pequeño incremento en la variabilidad de la radiosensibilidad comparadas con líneas celulares “normales”. (Vogin and Foray 2013).

Debido a la gran cantidad de contradictores y contraejemplos ante la autodenominada ley de la radiosensibilidad celular, hoy en día este concepto es más considerado como un punto de vista que una verdadera ley científica. (Haber and Rothstein 1969).

## **1.2 Principios de Terapia con Radiaciones**

### **1.2.1 Radiaciones Ionizantes**

La radiación es un agente físico que es utilizado para destruir células cancerosas. El tipo de radiación principalmente utilizada es la radiación ionizante la cual deposita energía y

forma iones en las células de los tejidos que atraviesa. Esta energía depositada es la que puede destruir las células cancerosas o causar cambios genéticos que finalmente provocan la muerte celular. Actualmente se describen tres formas para lograr que la radiación actúe en el sitio donde se encuentra el tumor:

- Radioterapia de haz externo (EBRT) o teleterapia es entregada desde afuera del organismo por rayos de alta energía (fotones, protones o partículas de radiación).
- Radioterapia interna (IRT) o braquiterapia, entregada desde dentro del organismo por fuentes radioactivas, selladas en catéteres o sembradas directamente en el sitio del tumor. (Baskar et al. 2012).
- Terapia con radioisótopos (RIT) o terapia de radioisótopos sistémica, entregada a través de las propiedades químicas de radionúclidos que pueden ser ingeridos o inyectados. En esta se aprovechan la radiación emitida por el radionúclido para destruir las células cancerosas. (Buscombe and Navalkissoor 2012).

Los 2 tipos de radiaciones ionizantes empleadas en clínica son: radiación de fotones (rayos-x y rayos- $\gamma$ ) y radiación de partículas (electrones, protones, neutrones, iones carbono, partículas alfa y beta). Algunos tipos de radiación ionizante tienen mayor energía que otros y esto define a que tanta profundidad la radiación puede penetrar en los tejidos, esta propiedad de la radiación es denominada como LET (Linear Energy Transfer) y permite clasificar las radiaciones ionizantes de acuerdo a la cantidad de energía que estas pueden ceder por unidad de longitud para facilitar la ionización de componentes celulares. (Therapy and Cdks 2014).

De esta manera se clasifican a los rayos de protones y las partículas  $\alpha$  (alpha) como radiaciones de alta LET y los rayos X,  $\gamma$  (gamma) y partículas como los electrones y  $\beta$  (beta) se clasifican como de baja LET.

### **1.2.2 Efectos Biológicos de la Radiación**

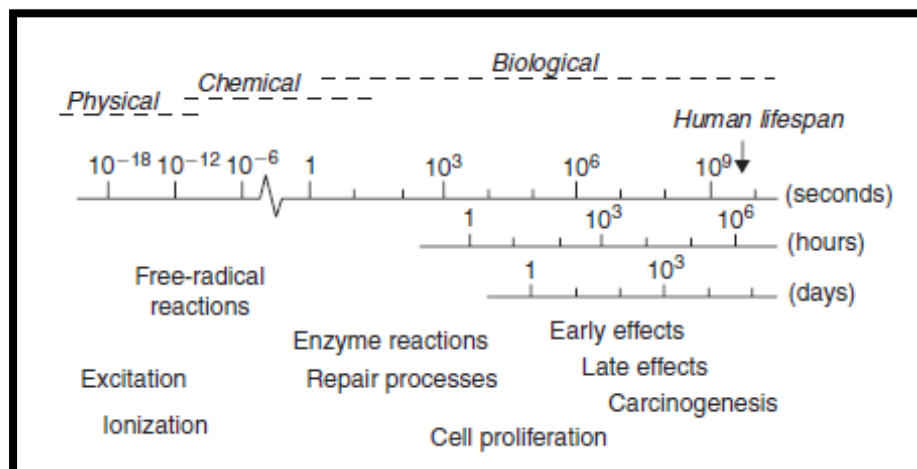
La irradiación de cualquier sistema biológico genera una sucesión de procesos que difieren en escala de tiempo: las fases que se describen son física, química y biológica.

- La fase física ocurre inmediatamente después de la irradiación en un orden de  $10^{-18}$  a  $10^{-12}$  segundos. En esta fase se produce la excitación e ionización de las biomoléculas.

- En la fase química, la cual se encuentra en un orden de  $10^{-6}$  a 1 segundo, como consecuencia de la ionización anteriormente mencionada se observa la liberación de radicales libres, en su mayoría especies reactivas de oxígeno (ROS) lo cual suscita un estrés oxidativo en la célula. (Selzer and Hebar 2012).

Esta fase se origina por los efectos de los iones producidos sobre el ADN y otras biomoléculas. Se conoce como efecto directo de la radiación al efecto que se produce sobre el material genético celular lo que en la mayoría de los casos lleva a la activación de procesos de muerte; cuando la biomolécula directamente atacada es el H<sub>2</sub>O produciendo ionización de esta y liberación de ROS y como consecuencia de esto daño en el ADN se habla de efecto indirecto, este se presenta dos veces más frecuentemente que el efecto directo.

- Finalmente, en la fase biológica (horas y meses post-irradiación) hay alteración de reacciones enzimáticas, procesos de reparación y proliferación celular lo cual lleva consigo la aparición de efectos tempranos y tardíos. (Riley 2009).



**Figura 4.** Escala de tiempo de los efectos de exposición de la radiación en sistemas biológicos.

Tomado de Joiner M, "Basic Clinical Radiobiology", 4ª Edición.

Otra posible clasificación de los efectos biológicos de la radiación se da de acuerdo a la probabilidad de aparición de ellos, de esta manera se habla de efectos determinísticos, los cuales son los efectos agudos y muy probables posterior a la irradiación, y los efectos

estocásticos que muestra los efectos crónicos, a largo plazo y que tienen una probabilidad baja de que ocurran. (Wagner, Eifel, and Geise 1994).

## 1.3 Respuesta al daño en el ADN (DDR)

### 1.3.1 Fuentes de daño en el ADN

El ADN, como cualquier otra molécula, puede estar involucrada en reacciones químicas, y como resultado de estas mismas es posible que se produzcan daños. El daño en el ADN puede producirse tanto por agentes intrínsecos como extrínsecos. En general, la gran mayoría de modificaciones en el ADN son endógenas originalmente, una forma muy simple de daño endógeno es la hidrólisis espontánea, lo que produce sitios abasicos o sitios AP (apurinicos/apirimidinicos). Se estima que los sitios AP ocurren en una tasa de aproximadamente 10000 por células por día, siendo estos lábiles a sufrir eliminación- $\beta$  que pueden resultar en la escisión de la hebra de ADN. Otra reacción común que involucra la hidrólisis es la deaminación de las bases de ADN que conlleva a la formación de grupos amino exocíclicos. (Sugiyama et al. 1994; Yonekura et al. 2009).

El ADN también es susceptible a la modificación química por moléculas reactivas que se originan durante el metabolismo celular normal. Las más importantes de estas moléculas son las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales incluye  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $\cdot OH$ . Las ROS generan cerca de cien aductos oxidativos distintos con el ADN tal como la modificación de bases, oxidación de la deoxiribosa, daños de hebra simple o doble hebra y entrecruzamientos ADN-proteína. (Cadet et al. 1997). Las especies reactivas de nitrógeno (RNS), principalmente óxido nítrico y sus productos, pueden producir similares aductos oxidativos. (Burney et al. 1999).

El daño endógeno genómico también puede ser resultado de errores inevitables durante las reacciones de procesamiento fisiológico del ADN; inclusive los procesos de reparación del ADN por si mismos pueden ser también susceptibles de error e introducir un daño suplementario. (Bridges 2005).

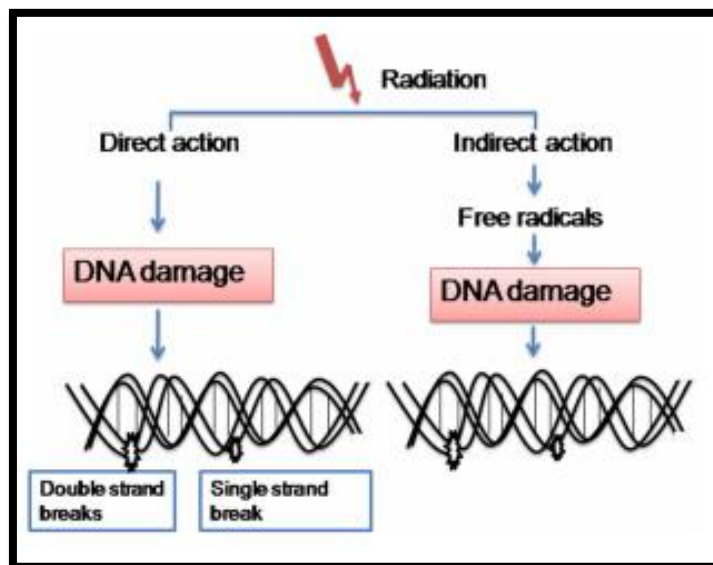
Adicional a las numerosas fuentes endógenas de daño de ADN, este se encuentra también bajo constante “ataque” de agentes exógenos o ambientales que también pueden producir



daño. Dentro de ellas se incluyen la luz ultravioleta, la exposición a agentes genotóxicos tales como los quimioterapéuticos y la radiación ionizante. (Matt and Hofmann 2016).

### 1.3.2 Daño en el ADN por IR

Como ya se ha discutido anteriormente el principal target de la radiación ionizante, y de la radioterapia, es el ADN de las células cancerígenas. Las partículas cargadas ya sean electrones o iones pueden pasar a través de las membranas celulares e ionizar el ADN directamente o mediante la ionización de las moléculas de agua incrementar el ambiente oxidativo y producir un daño letal en el ADN. (Herskind 1988).



**Figura 5.** Daño del ADN por la radiación.

Tomado de Baskar R, Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences*. 2014, Volume 1, Article 24.

La acción directa domina en radiación de alta-LET mientras que la relación entre el efecto indirecto y directo es de 3:1 para radiaciones de baja LET, como los rayos X, en el cual aproximadamente mil electrones se depositan en el núcleo por una unidad de dosis de 1Gy (unidad del sistema internacional referida como dosis absorbida de un julio de energía ionizante por kilogramo de material irradiado). Como resultado en el ADN pueden encontrarse quiebres de una sola hebra (SSBs, por sus siglas en inglés), quiebres de doble hebra (DSBs, por sus siglas en inglés) o entrecruzamiento del ADN. Aproximadamente

3000 bases dañadas, 1000 SSBs y 40DSBs son inducidos en una célula por una dosis de rayos X de 1Gy. (Baskar et al. 2014). Sin embargo, el daño de bases y los SSBs son de menor relevancia para la supervivencia celular puesto que estas lesiones son esencialmente reparadas por el sistema de reparación por escisión de bases (BER). (Prasad et al. 2011). Aún la mayoría de los DSBs son también reparados, sin embargo, una pequeña fracción no se pueden reparar por su complejidad y constituyen el daño severo del ADN que posteriormente lleva a la célula a la muerte, senescencia, inestabilidad genómica o mutaciones. (Maier et al. 2016).

### 1.3.3 Sistemas de reparación del ADN

Para compensar los muchos tipos de daño de ADN que pueden ocurrir, las células han desarrollado múltiples mecanismos de reparación cada uno de los cuales corrige un subset distinto de lesiones. Se resaltan 5 mecanismos principales de reparación en las células mamíferas: reparación por escisión de bases (BER), reparación mismatch (MMR), reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación de daños en doble hebra los cuales incluye: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ o D-NHEJ). (Altieri et al. 2008). De manera adicional se ha definido una forma alternativa a NHEJ (alt-EJ o B-NHEJ), referida como una vía back-up a la vía aún no descrita con claridad y con algunos de sus componentes parcialmente descritos. (Mladenov and Iliakis 2011).

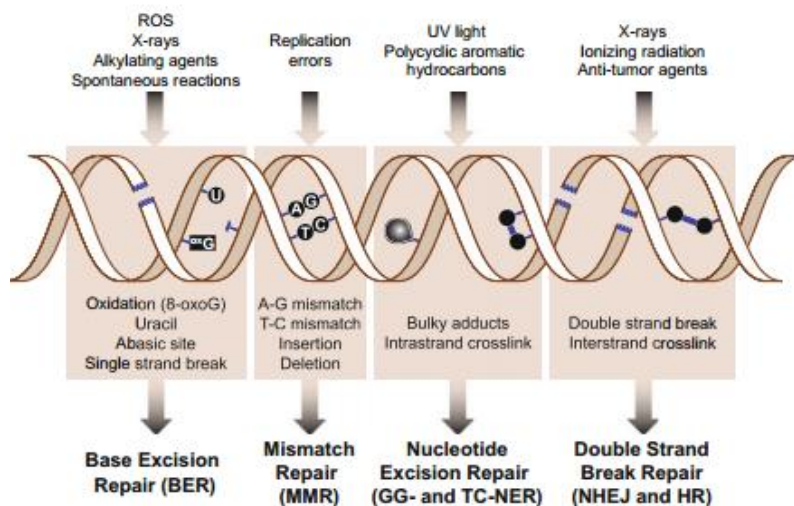


Figura 6. Daño en el ADN y mecanismos de reparación.

Tomado de Altieri F, DNA Damage and Repair: From Molecular Mechanisms to Health Implications: Comprehensive Invited Review. Antioxidants & Redox Signaling, Volume 10, Number 5, 2008.

Como es posible observar en la figura 6, por el daño suscitado por radiaciones ionizantes se activan principalmente las vías BER, NHEJ y HR. Aún más importante se evidencian los distintos daños causados por IR comúnmente utilizados en técnicas de laboratorio con el objetivo de describir la respuesta biológica del modelo celular.

Asimismo, aunque los SSBs, DSBs y sitios alcalino-labiles no se puedan medir de manera directa hay varios ensayos que proveen un marcador secundario de la extensión del daño del ADN que puede ser visualizado y cuantificado. El patrón de migración de los fragmentos de ADN en un soporte sólido como la agarosa es aprovechado para evaluar el daño del ADN de manera individual en cada célula esta técnica es mejor conocida como electroforesis de célula única o ensayo cometa. (Fairbairn, Olive, and O'Neill 1995). De esta manera es posible determinar si todas las células en una población demuestran el mismo grado de daño o, en otras palabras, determinar el potencial genotóxico de una sustancia o de un tratamiento en particular; en el caso de encontrarse una respuesta heterogénea durante el tratamiento se puede predecir la respuesta del tumor a tratamientos específicos y por lo tanto se hace posible identificar pequeñas poblaciones que pueden ser resistentes. (Olive and Banáth 2006).

Uno de los eventos más tempranos y universales durante la reparación del ADN es la fosforilación por las quinasas ATM, ATR y DNA-PKcs, de la isoforma de la histona H2AX en el residuo serina 139 (P-S139) para formar  $\gamma$ H2AX. (Rogakou et al. 1998). Los focos de  $\gamma$ H2AX son formados por miles de copias alrededor de los sitios en donde hay DSBs por ello son útiles para monitorear la reparación de esos DSBs *in vitro* y *ex vivo*. (Ivashkevich et al. 2012). La fosforilación de la histona H2AX actúa como un impulsador para el reclutamiento de otras proteínas de reparación del ADN tales como el complejo MRN, MDC-1, ATM y BRCA1. (Kinner et al. 2008).

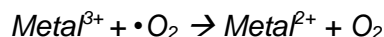
## 1.4 Estrés Oxidativo

### 1.4.1 IR y Estrés Oxidativo

La radiación ionizante en presencia de oxígeno, convierte el radical hidroxilo, superóxido y radicales orgánicos a peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos. Estas especies reaccionan con iones redox metálicos activos, tales como el Fe y el Cu, vía reacción de Fenton y/o Heber/Weiss induciendo a un estrés oxidativo. (Birben et al. 2012).



**Ecuación 1.** Reacción de Fenton



**Ecuación 2.** Reacción de Haber-Weiss

Esta sobreproducción de ROS finalmente conlleva a un desequilibrio a favor de un ambiente oxidativo, en otras palabras, la homeostasis REDOX de la célula se altera y entra en el estado de estrés oxidativo. La célula se encuentra equipada con una gran cantidad de sistemas antioxidantes para contrarrestar el efecto de ROS excesivas ya sea por intercepción directa o indirectamente a través de la reversión del daño oxidativo. (Eglon, Mcgrath, and Brien 2010).

### 1.4.2 Mecanismos de Defensa Antioxidante

Los compuestos antioxidantes endógenos en las células pueden ser clasificados como antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos. Las principales enzimas antioxidantes directamente involucradas en neutralización de ROS y RNS son: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GTPx), catalasa (CAT), tioredoxina reductasa (TRX), Peroxiredoxina (PRX) y Glutathion transferasa (GST).

Los antioxidantes no enzimáticos son divididos también en antioxidantes metabólicos (endógenos) y nutrientes antioxidantes (exógenos). Los antioxidantes metabólicos son producidos por metabolismo en el organismo, tales como el ácido lipoico, glutatión, L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes, transferrina; por otra parte los nutrientes antioxidantes son aquellos que no pueden ser producidos en el organismo y deben ser proveídos a través de los alimentos o

suplementos, tales como vitamina E, vitamina C, carotenoides, trazas de metales (Selenio, Manganeso, Zinc), flavonoides, ácidos graso omega-3 y omega-6. (Pham-Huy, He, and Pham-Huy 2008).

### 1.4.3 Factores de Transcripción

En total se han reportado más de 100 genes involucrados en la respuesta antioxidante. Por lo que, las vías de transducción de señales que registran y activan dichas respuestas se han convertido en una trascendente área de estudio. Entre los factores de transcripción que se activan por ROS y RNS destacan el factor nuclear  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B), la proteína activadora 1 (AP1) y los factores relacionados al factor nuclear eritroide-2 (NF-E2) conocidos como Nrfs (del inglés: Nuclear Factor Erythroid 2-related factor). (Königsberg 2007).

Bajo condiciones fisiológicas normales, Nrf-2 forma un complejo inactivo con el regulador negativo Keap-1 el cual controla la localización subcelular y los niveles de estado estacionario de Nrf-2. La oxidación o fosforilación de los residuos de cisteína facilita la disociación de Nrf-2 desde Keap-1 y se transloca al núcleo, en este compartimiento celular Nrf-2 se enlaza con los elementos de respuesta a antioxidantes (ARE) regulando la codificación de genes tales como: NAD(P)H, quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GSTs), hemo-oxigenasa-1 (HO-1), glutamato cistein ligasa (GCL), y tioredoxina (TRX), los cuales protegen contra el daño del estrés oxidativo celular. (Zhou et al. 2013). Por medio de este mecanismo la mayoría de las células cancerígenas sobreviven por la neutralización de los efectos del estrés oxidativo y adquieren resistencia tanto a la quimioterapia tradicional como a la radioterapia a través de la vía de señalización Nrf2-Keap1-ARE. (Akhdar et al. 2009; Lee et al. 2012).

Sin embargo, en algunos tipos de cáncer, como el de cabeza y cuello, vesícula, pulmón y páncreas, se han encontrado niveles elevados de Nrf2. 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 fármacos y a los efectos de la radiación ionizante, en ciertos tipos de cáncer; Nrf2 actuaría entonces como un “arma de doble filo”. Este papel “ambiguo” del Nrf2 indica la necesidad de adelantar estudios conducentes a la inhibición de la vía Nrf2

durante la quimio o radioterapia de tal forma que se incremente la efectividad de los tratamientos contra el cáncer. (Lau et al. 2008; McDonald et al. 2010; TSUKIMOTO et al. 2010).

## 1.5 Terapia Génica y NIS

El transportador de sodio y yodo ( $\text{Na}^+/\text{I}^-$ ) (NIS) es una proteína de la membrana plasmática que facilita el transporte activo de  $\text{I}^-$  principalmente en tiroides, glándula mamaria lactante, estómago y glándulas salivales. La proteína NIS (también llamada SLC5A5), es una glicoproteína integral de membrana miembro de la familia de cotransportadores sodio/soluto, que reside en la membrana basolateral de los tirocitos (Ekaterina Dadachova and Carrasco 2004). NIS es un cotransportador que cataliza un transporte acoplado de yodo y sodio, con una estequiometría de transporte de 1  $\text{I}^-$  por 2  $\text{Na}^+$ , utilizando como fuerza motriz para transportar el yodo en contra de su gradiente de concentración, el gradiente favorable de sodio creado por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$   $\text{ATP}_{\text{asa}}$ . NIS fue identificada en la rata (G. Dai, Levy, and Carrasco 1996), y luego en el hombre (Smanik et al. 1996), y posteriormente en el ratón por el equipo Unité Transporteurs en Imagerie et radiothérapie en oncologie (TIRO) (Perron et al. 2001).

Es importante resaltar que NIS se ha detectado en bajos niveles de expresión en órganos como la próstata, ovarios, glándulas suprarrenales, pulmón y corazón; por el contrario, esta proteína no se ha detectado en colon, fibroblastos orbitales o en la mucosa nasofaríngea. El gen que codifica para esta proteína presenta un marco de lectura de 1929 nucleótidos que codifican para la glicoproteína de 643 aminoácidos. (De La Vieja et al. 2000),(C Spitzweg and Morris 2002).

Como ya se refirió anteriormente NIS es una proteína de membrana cuya función es la de permitir la acumulación de yodo en diferentes tejidos, esta proteína cumple roles clave en la tiroides ya que a partir del yodo internalizado se realiza la biosíntesis de hormonas tiroideas por lo que es esencial para el control del metabolismo humano en general. Dada la funcionalidad de NIS, no solamente mediante la captación de yodo sino también mediante la regulación de sus niveles de expresión, es posible utilizarlo para el diagnóstico y aplicación terapéutica con los sustratos radioactivos del transportador como yoduro ( $\text{I}^{123}$ ,  $\text{I}^{124}$ ,  $\text{I}^{131}$ ), y otros aniones monovalentes como el perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ), clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ), tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ) y nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Eskandari et al. 1997; Lindencrona, Nilsson, and Forssell-

Aronsson 2001), y diferentes radioisótopos tales como el pertecnato ( $TcO_4^-$ ) (Van Sande et al. 2003), perrenato ( $ReO_4^-$ ) (E. Dadachova et al. 2002), y astatina (At). El  $ClO_4^-$  es el único inhibidor competitivo eficaz de la actividad de NIS.

Desde la clonación e identificación de este gen en el año 1996 se le ha dado un rol principal en el cáncer de tiroides y la investigación de otros desordenes como lo son las enfermedades autoinmunes de la tiroides o el hipotiroidismo congénito (Lakshmanan et al. 2014). Los resultados en la estrategia antitumoral en carcinomas hepáticos y en mielomas múltiples han sido muy prometedores (Dohán and Carrasco 2003). Los desarrollos actuales en terapia génica han permitido la transferencia de NIS a otros tipos de células tumorales, por medio de vectores basados en retrovirus (Kim et al. 2008), adenovirus (Dohán et al. 2003), lentivirus (Liu et al. 2009) y baculovirus, 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. Es claro que el estudio de NIS, más allá de sus intereses bioquímicos y fisiológicos inherentes, podría también presentar grandes implicaciones en el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer en una amplia variedad de tejidos. (Micali et al. 2014).

Con base en los avances con respecto a su funcionalidad y estructura, la implementación de NIS en sistemas de transferencia genética utilizando promotores tejido-específicos que permitan la expresión del gen en células tumorales, maximizando la citotoxicidad específica es ahora una realidad. (Sheridan 2011; Christine Spitzweg et al. 2003). Este tipo de estrategias (terapia génica) han sido útiles en diferentes modelos de cáncer en los cuales las terapias usualmente implementadas no han sido efectivas. (Cengic et al. 2005; Klutz et al. 2011).





## 2.PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Teniendo en cuenta que:

- Las distintas alternativas actuales para el tratamiento contra el cáncer poseen una limitada toxicidad selectiva lo que limita su uso en clínica, incluyendo la radioterapia y la quimioterapia.
- Con la terapia génica, en la cual se transfecta un gen determinado a la célula para la expresión de una proteína en específico, se espera lograr el mejoramiento de la selectividad del tratamiento y evitar la aparición de efectos adversos relacionados con este.
- El transportador NIS es aprovechado en la actualidad por su característica propia de facilitar el transporte de iones de yodo para realizar el diagnóstico y tratamiento con isótopos radiactivos principalmente de células cancerígenas tiroideas, puesto que estas expresan el transportador de manera constitutiva.

Pensando en el contexto clínico en donde se combinan distintos tratamientos para lograr el control de la patología, se plantea la pregunta de investigación: **¿Cuál es el efecto del transportador NIS en la respuesta al tratamiento con radiaciones ionizantes en células derivadas de carcinoma de colon HT29 en condiciones de proliferación y quiescencia?**

Ante las consideraciones anteriormente expuestas, y dada la importancia que la terapia génica basada en NIS ha cobrado, se estableció una alianza entre la Unidad TIRO, el Centro de Control de Cáncer Ltda y el grupo de investigación en Bioquímica y Biotecnología (Bio-Bio) de la Universidad del Rosario, con el fin de dar respuesta a la pregunta planteada.



## **3.OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la expresión de NIS y de los cambios en la proliferación celular sobre la respuesta al tratamiento con radiaciones ionizantes de fuente externa de la línea celular transfectada con el transportador NIS (HT29-NIS).

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el efecto de la expresión de NIS y de los cambios en la proliferación celular sobre la supervivencia de las células HT29-NIS expuestas a radiación ionizante de fuente externa.
- Evaluar las posibles diferencias inducidas por la expresión de NIS en el grado de daño a nivel del ADN causado por la irradiación en la línea celular HT29-NIS en condiciones quiescentes y proliferantes.
- Evaluar los posibles cambios inducidos por la expresión de NIS en el estado oxidativo celular posterior al tratamiento con radiaciones ionizantes en la línea celular HT29-NIS en condiciones quiescentes y proliferantes.



# 4. METODOLOGÍA

## 4.1 Metodología General

### 4.1.1 Mantenimiento del Cultivo Celular

Para el estudio se empleó la línea celular HT29 (ATCC® HTB-38™) proveniente de adenocarcinoma colorectal de origen humano. Se utilizó la línea HT29 sin modificar (HT29-WT) y la línea HT29 que presenta el transportador NIS (HT29-NIS). Ambas líneas celulares fueron donación de la unidad TIRO de la universidad de Niza. El método que se utilizó para transfectar establemente el transportador en la línea celular fue el siguiente: la línea celular HT29 fue transfectada con el vector de expresión eucariótico pcDNA3.1-mNIS (NIS de ratón). Los clones estables fueron seleccionados tres días después de la transfección adicionando al medio geneticina. La verificación de la expresión de la proteína NIS en los clones establemente transfectados se realizó mediante la captación de <sup>125</sup>I, análisis por western blot y experimentos de inmunotinción, mostrando una alta localización de la proteína NIS en la membrana plasmática (Richard-Fiardo et al. 2012).

Ambas líneas celulares fueron mantenidas con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco®, suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico antimicótico Gibco® a una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37°C. Se mantuvieron los cultivos en un rango de confluencia de 60 a 80%; al alcanzar el máximo nivel de confluencia propuesto (80%) se realizó el pase correspondiente de la siguiente manera: para separar las células adheridas, estas fueron lavadas 3 veces con solución de buffer fosfato salino (PBS) (pH: 7,2) y para facilitar el despegue de las células de la caja de cultivo se utilizó solución Tripsina-EDTA (0.025%-0.03% v/v respectivamente) durante 5 minutos en incubadora a 37°C. Posteriormente se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizó conteo celular mediante el método de

azul de tripan para mantener, expandir o preparar el cultivo celular para los experimentos respectivos para la consecución de cada uno de los objetivos propuestos.

#### **4.1.2 Establecimiento de condiciones de proliferación y quiescencia**

Para simular las características proliferantes de ambas líneas celulares se utilizaron las condiciones estándar de cultivo celular descritas en el apartado anterior (medio DMEM suplementado con 10% v/v de SFB), el cultivo se mantiene durante 4 días antes de realizar cualquier experimento.

Para la simulación de las condiciones quiescentes, el cultivo celular se mantuvo con medio DMEM suplementado con una concentración de SFB de 0.1% v/v, el cultivo es mantenido durante 24 horas con medio DMEM 10% SFB para lograr adherencia y posterior a ello se realiza el cambio del medio de cultivo al descrito anteriormente durante 4 días para lograr la condición quiescente. Estas condiciones se estandarizaron en colaboración con la estudiante de maestría Lorena González. (Tesis de Maestría: "Terapia génica y microambiente tumoral: efecto de los cambios en la proliferación celular sobre la expresión y localización del cotransportador sodio/yodo (NIS) en un modelo *in vitro* de cáncer de colon").

En ambas condiciones tanto proliferativa como quiescente el cultivo celular se mantuvo en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> y a una temperatura de 37°C.

#### **4.1.3 Irradiación Celular**

Se realizó la irradiación tanto en la línea parental como en la línea con el transportador NIS establemente transfectado, en condiciones de proliferación y quiescencia. Las líneas celulares previamente cultivadas en dichas condiciones fueron transportadas hasta el centro del control del cáncer donde fueron irradiadas con dosis de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy utilizando un acelerador lineal de uso clínico Varian Medical Systems® TrueBeam™ (tipo de radiación: rayos X, energía: 6 MV, tasa de dosis: 600 cGy/min). Posteriormente se transportaron nuevamente al laboratorio en donde se realizaron los respectivos experimentos.

## 4.2 Estrategia Experimental para lograr el primer objetivo

El perfil de supervivencia a la radiación externa se estudió mediante la construcción de curvas de supervivencia celular, dicha construcción se realizó de la siguiente manera.

### 4.2.1 Ensayos Clonogénicos

Posterior a la irradiación las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 6 pozos y se mantuvieron en cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de SFB durante 14 días. Después de los 14 días se realizó la fijación y tinción de las células con cristal violeta como se describe a continuación: se retiró el medio de cultivo y se hicieron lavados con solución buffer fosfatos (PBS) para realizar la fijación con paraformaldehído 8% (PFA, Sigma, Ref. 252549), durante 30 minutos. Posterior a los 30 minutos de fijación se retiró el paraformaldehído y se realizaron lavados con agua para adicionar el cristal violeta por 30 minutos. Por último, se retiró el colorante y nuevamente se realizaron lavados para retirar el exceso de este y observar de manera más clara las colonias formadas.

### 4.2.2 Digitalización de Imágenes y Conteo de Colonias

Posterior a la fijación y tinción de las colonias formadas de ambas líneas celulares, se realizó el escaneo de cada una de las cajas de 6 pozos en el equipo Thermo Scientific mY ECL Imager™. Para el conteo de colonias se utilizó el software ImageJ; se realizó tanto conteo automático como conteo manual con el objetivo de verificar la veracidad del conteo automático. Se tomaron en cuenta aquellas colonias que contaban por lo menos con 50 células.

### 4.2.3 Ajuste al modelo y realización de la curva

Después del conteo de las colonias tanto en el grupo control como en cada uno de las muestras expuestas a las distintas dosis de radiación se procedió a calcular la eficiencia de sembrado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de Sembrado (ES)} = \frac{(\text{No. Colonias Contadas})}{(\text{No. Celulas Inoculadas})} \times 100$$

**Ecuación 3.** Eficiencia de Sembrado

Obteniendo este dato se calculó la fracción de supervivencia de cada una de las muestras con respecto al control teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\text{Fracción de Supervivencia (FS)} = \frac{(ES \text{ muestra})}{(ES \text{ control})}$$

**Ecuación 4.** Ecuación de Fracción de Supervivencia

Por último, se realizó el ajuste de los datos al modelo lineal cuadrático empleando el software gnuPLot 5.0.

### **4.3 Estrategia Experimental para lograr el segundo objetivo**

Se evaluó el grado de daño en el ADN mediante la utilización de dos métodos que permiten hacer aproximaciones complementarias, se realizó la determinación de daños de una sola hebra (electroforesis de células individuales) y daño de doble hebra (inmunocitoquímica de la fosforilación de la histona H2AX).

#### **4.3.1 Electroforesis de células individuales (Ensayo Cometa)**

La determinación de daño en el ADN se realizó mediante la utilización del kit OxiSelect™ Comet Assay Kit. Este experimento se basa en un ensayo de electroforesis de célula única lo que permite evaluar de manera individual el daño en el ADN. El ensayo se realizó posterior a la irradiación celular evaluando la exposición a 0Gy, 1Gy, 6Gy y 10Gy analizando el efecto de la radiación 1h, 6h, 24h y 48h después de la exposición.

Las células irradiadas fueron despegadas del plato de cultivo mediante la utilización de PBS frío y un raspador, favoreciendo el despegue mecánico sin requerir a la utilización de la solución de Tripsina-EDTA (0.025%-0.03% v/v). La suspensión celular fue centrifugada 3 veces con PBS frío y de esta suspensión final se extrajo la alícuota para mezclar con la agarosa de bajo punto de fusión procurando que al menos 10000 células fueran sembradas en cada uno de los pozos de los portaobjetos. Posteriormente cada portaobjeto se mantuvo a 4°C en oscuridad durante 15 minutos.



Una vez cada muestra gelificara de manera adecuada, se prosiguió a transferir el portaobjetos a un contenedor con el buffer de lisis pre-enfriado (30 mM NaOH); cada portaobjeto se mantuvo durante 1 hora a 4°C en oscuridad antes de proseguir con el ensayo. El buffer de lisis fue retirado y reemplazado por solución alcalina (300 mM NaOH, pH >13, 1 mM EDTA), el portaobjetos se mantuvo durante 45 minutos a 4°C en oscuridad en este buffer.

El protocolo de corrido electroforético se realizó con buffer alcalino (300 mM NaOH, pH >13, 1 mM EDTA) y con los siguientes parámetros: 30 minutos, 25V, 300mA. Posterior a la electroforesis cada portaobjetos fue sumergido en agua fría por 2 minutos en tres ocasiones. Con el objetivo de deshidratar y almacenar los portaobjetos, estos fueron sumergidos en etanol al 70% por 5 minutos.

Para facilitar la observación de cada uno de los cometas cada portaobjetos se sumergió en una solución de Vista Green DNA Dye incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos, se utilizó el equipo Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek®) para la obtención de las imágenes. El plug-in OpenComet del software ImageJ fue utilizado para el análisis de los parámetros de los cometas: Tail moment, Porcentaje de ADN en la cola, Porcentaje de ADN en la cabeza, etc.

### **4.3.2 Inmunocitoquímica (ICC) de $\gamma$ -H2AX**

Se realizó el cultivo celular bajo las condiciones determinadas para cada ensayo en cajas de veinticuatro pozos con laminillas previamente esterilizadas y tratadas con L-Polilisina durante 1 hora. Las células fueron irradiadas con distintas dosis de radiación (0, 1, 6, y 10Gy) y se evaluó la activación de sistemas de reparación 24h posterior a la irradiación celular.

Una vez las 24 horas post-irradiación se hubieran cumplido, se realizó el retiro del medio de cada uno de los pozos y se hicieron 3 lavados con PBS, posteriormente se procedió a la fijación de las células con paraformaldehído 4% (PFA, Sigma, Ref. 252549), seguido de la permeabilización de membranas utilizando Tritón™ X100 0,1% (Sigma Ref. T8787); posterior a ello se incubaron las células 15 minutos con cloruro de amonio; en el intermedio de cada uno de los pasos se realizaron tres lavados con solución buffer fosfatos (PBS) de

5 minutos cada uno en plataforma de agitación. Luego se llevó a cabo el bloqueo con BSA 0,1% durante 30 minutos y la incubación con el anticuerpo primario contra  $\gamma$ H2AX (Abcam, ab11174) en una dilución 1:5000 over-night a 4°C. Posteriormente se realizaron lavados con PBS y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit, Alexa Fluor 488 (Thermo Scientific, A11008) en una dilución 1:1000.

Por último, con el objetivo de observar el núcleo celular se incubó con Hoescht 33342 (Life Technologies, Ref H3570) durante 15 minutos en la oscuridad. Para montar las laminillas en los portaobjetos se sumergieron en agua destilada para remover el exceso de sal proveniente del PBS, y se colocó una gota de Fluoromount (Sigma, F4680) en el portaobjetos, esto se dejó secar por aproximadamente 1 hora. Las laminillas se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta su observación.

Las imágenes fueron adquiridas en el equipo Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek®) y los focos fueron contados de manera manual utilizando el software ImageJ.

## **4.4 Estrategia Experimental para lograr el tercer objetivo**

### **4.4.1 Producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS)**

Para determinar el efecto de las radiaciones ionizantes sobre la producción celular de ROS se empleó el marcador fluorogénico diacetato de 5(6)-carboxi-2,7-difluorodihidrofluoresceína (H2DFFDA) del kit Image-iTTM LIVE Green ROS Detection (Invitrogen®). Brevemente las células fueron cultivadas en platos de cultivo de 24 pozos y la medición de ROS se realizó en ambas líneas celulares tanto en condiciones quiescentes y proliferantes a distintas dosis de radiación (0, 1, 6 y 10Gy) y a distintos tiempos post-irradiación (1, 6, 24 y 48 horas).

Posterior al cumplimiento de cada uno de los tiempos post-irradiación las células fueron lavadas con PBS 1X, se adicionó la sonda H2DFFDA en concentración 10  $\mu$ M durante 45 minutos a 37°C. Luego se lavaron 2 veces con PBS posterior a lo cual se resuspendieron con buffer RIPA (Tris-Cl 50mM pH 7.4, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Triton X-100 0.5%) y se dispuso dicha mezcla en cajas de 96 pozos con fondo oscuro. La intensidad de fluorescencia media se determinó en el Equipo lector de multiplacas de lectura multi-modo

Cytation 3 Imagine Reader (BioTek®) utilizando los siguientes parámetros de  $\lambda$  excitación: 360 /  $\lambda$  emisión: 460.

Los resultados de fluorescencia obtenidos fueron normalizados por microgramo ( $\mu\text{g}$ ) de proteína, empleando para su cuantificación el método del ácido bicinconínico (BCA) con el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Brevemente a 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) del extracto proteico o del blanco (PBS) se adicionaron 200 $\mu\text{L}$  de solución de trabajo (50 partes de reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0,1 M) y 1 parte de reactivo B (Sulfato cúprico 4%) y se incubó por 30 min a 37°C en placa de 96 pozos. Posteriormente la lectura de absorbancia fue realizada en el equipo lector de multiplacas de lectura multi-modo Cytation 3 Imagine Reader Biotek® con el siguiente parámetro:  $\lambda$  absorbancia: 562 nm; y la concentración de proteína se determinó empleando una curva de calibración construida con concentraciones conocidas de albumina sérica bovina.

#### **4.4.2 Expresión de Proteínas en las células modificadas**

Se evaluó la expresión de la proteína Nrf-2 asociada a la activación de respuesta a estrés celular en células no irradiadas y en células irradiadas con dosis de 0Gy, 1Gy, 6Gy, y 10Gy, a los tiempos de 1, 6, 24 y 48 horas post-irradiación. Adicionalmente se evaluó Keap-1 como proteína asociada a Nrf-2 y se tomaron como controles de carga a Lamina-A y  $\beta$ -Actina.

##### *Extracción de Proteínas (Nucleares y Citoplasmáticas)*

Para la realización de extracción de proteínas tanto nucleares como citoplasmáticas se empleó el kit Nuclear Extract Kit (Active Motif®, Ref 40010). De manera resumida, el procedimiento se realizó de la siguiente manera: se retiró el medio del cultivo celular y se añadió PBS frío/ inhibidor de fosfatasas, las células son despegadas por medios mecánicos mediante la resuspensión celular y la ayuda de un raspador. Las células fueron transferidas a un tubo Falcon® de 15 mL y se sometieron a centrifugación durante 5 minutos a 4°C a 1500 RPM.

Para la colección de la fracción citoplasmática, el pellet celular fue resuspendido con buffer hipotónico, se adicionó detergente y se centrifugó la suspensión durante 1 minuto a 14000

RPM a 4°C. El sobrenadante corresponde a la fracción citoplasmática que fue recolectada y almacenada a -80°C. El pellet corresponde a la fracción nuclear.

Para la colección de la fracción nuclear, dicho pellet fue resuspendido en buffer de lisis completo e incubado durante 30 minutos. Posterior a ello se centrifugó durante 10 minutos a 14000 RPM a 4°C. El sobrenadante corresponde a la fracción nuclear que fue recolectada y almacenada a -80°C. El pellet fue desechado.

Como control positivo para la inmunodetección de la proteína Nrf-2 se usaron células tratadas con peróxido de hidrogeno a una concentración de 300µM durante 1h a 4°C y la extracción de proteínas se realizó de acuerdo al método mencionado previamente.

#### *SDS-PAGE.*

Se cargaron 50 µg de extracto de proteína nuclear y citoplasmática de cada línea celular a evaluar y se corrió una electroforesis vertical en un gel de 10% acrilamida/bisacrilamida durante 1h y 30 minutos a 100 V en buffer de electroforesis (25 mM tris, 200 mM glicina, 0,5% SDS).

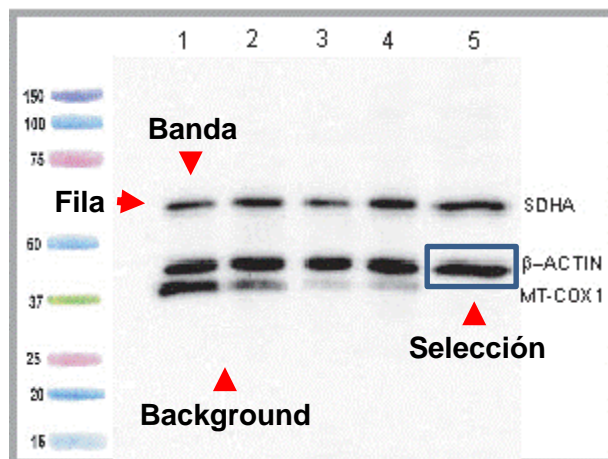
#### *Western Blot*

Las proteínas separadas durante la electroforesis en el gel de agarosa fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Hybond™ – P GE Healthcare), durante toda la noche a 30V en buffer de transferencia (10 mM tris, 34 mM glicina, 10% metanol). Luego de la transferencia, la membrana se incubó con solución de bloqueo 5% leche descremada (w/v) o 3% de BSA (w/v) de acuerdo al anticuerpo primario a ser evaluado, durante 2 h con agitación constante. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario contra Nrf-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-722), y Keap-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-33569) en la dilución correspondiente, durante toda la noche con agitación constante. La membrana se lavó tres veces con buffer Tween-Tris Salino 1X (TBS 1X; 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7.5 y 0.05% Tween 20 v/v), luego tres veces con TBS y se incubó con el anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) α-rabbit (Thermo Scientific, #31460) en una dilución 1:10000, durante 1 hora, a temperatura ambiente y con agitación constante. Se lavó la membrana de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y se reveló empleando el kit ECL Novex® ECL

invitrogen™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control de carga de la fracción citoplasmática se usó la proteína  $\beta$ -Actina (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778) y de la fracción nuclear Lamina-A (Santa Cruz Biotechnology, sc-20680), en una dilución 1:200 y 1:5000 respectivamente y el anticuerpo secundario conjugado con HRP  $\alpha$ -rabbit (Thermo Scientific, #31460) y  $\alpha$ -mouse (Thermo Scientific, #31430) en una dilución 1:10000, siguiendo las mismas indicaciones empleadas para la inmunodetección de la proteína Nrf-2 y Keap-1.

#### *Adquisición y análisis de imágenes*

Se adquirieron imágenes de las membranas en el equipo Thermo Scientific mY ECL Imager™. Las imágenes se analizaron por densitometría con ayuda del programa ImageJ. Para facilitar el entendimiento del lenguaje utilizado a continuación se ilustrará mediante un gráfico:



**Figura 7.** Figura ilustrativa densitometría Western Blot.

Figura tomada de <http://www.abcam.com/mitobiogenesis-western-blot-cocktail-ab123545.html>.

#### *Definición y selección de regiones de interés*

Para el análisis de múltiples proteínas en cada una de las membranas, para cada fila de proteínas se definió una región de interés. Se realiza la selección en la banda más larga de cada una de las filas y se ajusta de tal manera que cubra el área mínima que contenga la banda más larga de la fila, esta selección es guardada como una región de interés.

Para cada una de las filas que contengan una proteína distinta se define y se guarda una región de interés. Para las filas que contienen las proteínas utilizadas como control de carga se define la región de interés con el mismo procedimiento.

#### *Realización de Medidas*

Para cada una de las filas de proteínas se realizan las medidas iniciando con la primera línea y utilizando la misma selección guardada anteriormente, la medición es realizada hasta llegar a la última línea.

Con la misma región de interés definida se tomarán las medidas respectivas al background, localizando la selección en la parte de arriba de cada una de las bandas en la fila, en un lugar donde no hay otras bandas o manchas en la película.

Para cada una de las filas y controles de carga se tomarán medidas de la misma manera de las bandas y sus respectivos backgrounds.

#### *Cálculos*

Se invierte la densidad del pixel para todos los datos (bandas/controles y sus backgrounds) de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{Inv. Densidad Pixel} = 255 - X$$

**Ecuación 5.** Inversión de la densidad del pixel.

Donde X es el valor obtenido por la medición de la región de interés por el software ImageJ.

Para las bandas de proteínas y controles de carga, se expresa el valor neto realizando la resta del valor del background invertido y el valor de la banda invertido.

$$\text{Valor Neto Densitometria} = \text{Valor Inv. Banda} - \text{Valor Inv. Background}$$

**Ecuación 6.** Valor neto densitometría

El cálculo neto de los niveles de proteína se realiza mediante la relación de los valores netos de la proteína de interés sobre el valor neto del control de carga.

$$\text{Niveles de expresión proteína de interés} = \frac{\text{Valor neto proteína de interés}}{\text{Valor neto control de carga}}$$

**Ecuación 7.** Niveles de expresión de proteína de interés.

Finalmente se realiza la normalización de los datos obtenidos con el resultado de las células no irradiadas:

$$\begin{aligned} \text{Niveles de expresión proteína de interés normalizado} \\ = \frac{\text{Valor neto proteína de interés } X \text{ Gy}}{\text{Valor neto proteína de interés } 0\text{Gy}} \end{aligned}$$

Siendo X Gy la dosis de radiación evaluada.

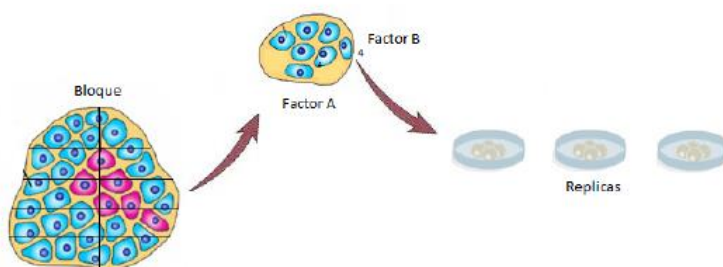
Los valores de cuantificación relativos fueron graficados en histograma con el objetivo de realizar las comparaciones respectivas.

## 4.5 Análisis Estadístico

### *Objetivo 1*

Con el apoyo del departamento de estadística y el servicio de consultoría estadística se realiza el análisis estadístico del objetivo 1, curvas de supervivencia mediante un diseño de parcelas divididas y subdivididas el cual es detallado a continuación.

Es un diseño de parcelas divididas ya que se tienen dos líneas celulares WT y NIS, dentro de cada línea se realizó una partición en 10 segmentos, cada segmento fue seleccionado sin aleatorización para aplicarle un tratamiento: proliferación (P) o quiescencia(Q), dentro de cada segmento en estas condiciones se dividió en 7 submuestras para irradiar una dosis definida (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy); posteriormente se realizó el conteo de colonias formadas posterior a 14 días en cultivo, en la figura 8 se presenta una descripción gráfica del diseño para una línea o bloque.



**Figura 8.** Diagrama diseño de parcelas divididas.

Se procede a la construcción del modelo y a partir de este se puede determinar si existen interacciones entre los factores. Teniendo en cuenta el objetivo, se realizaron dos diseños de parcelas divididas, uno para la línea celular HT29-WT y otro para la línea celular HT29-NIS. Para éstas se dividen en dos niveles, siendo el primero la condición (P y Q), y cada nivel se dividió en siete sub parcelas aplicando una de las 7 dosis (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy) en cada subparcela, el número de réplicas es de 15 para cada línea celular. En la tabla 1 se muestra de forma más detallada para la línea celular HT29-NIS.

NIS		
	P	Q
<b>0</b>	35,129,...,18	17,15,...,8
<b>1</b>	1,33,...,25	11,14,...,10
<b>2</b>	35,63,...,34	40,27,...,16
<b>4</b>	47,233,...,48	19,25,...,23
<b>6</b>	39,83,...,23	4,6,...,16
<b>8</b>	0,38,...,9	2,2,...,2
<b>10</b>	5,16,...,3	2,0,...,0

**Tabla 1.** Diseño ejemplo para el primer bloque (HT29-NIS)

### Objetivos 2 y 3

Para los objetivos 2 y 3 el análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con prueba post-hoc de Tuckey para la comparación entre grupos. Un  $p < 0,05$  fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.





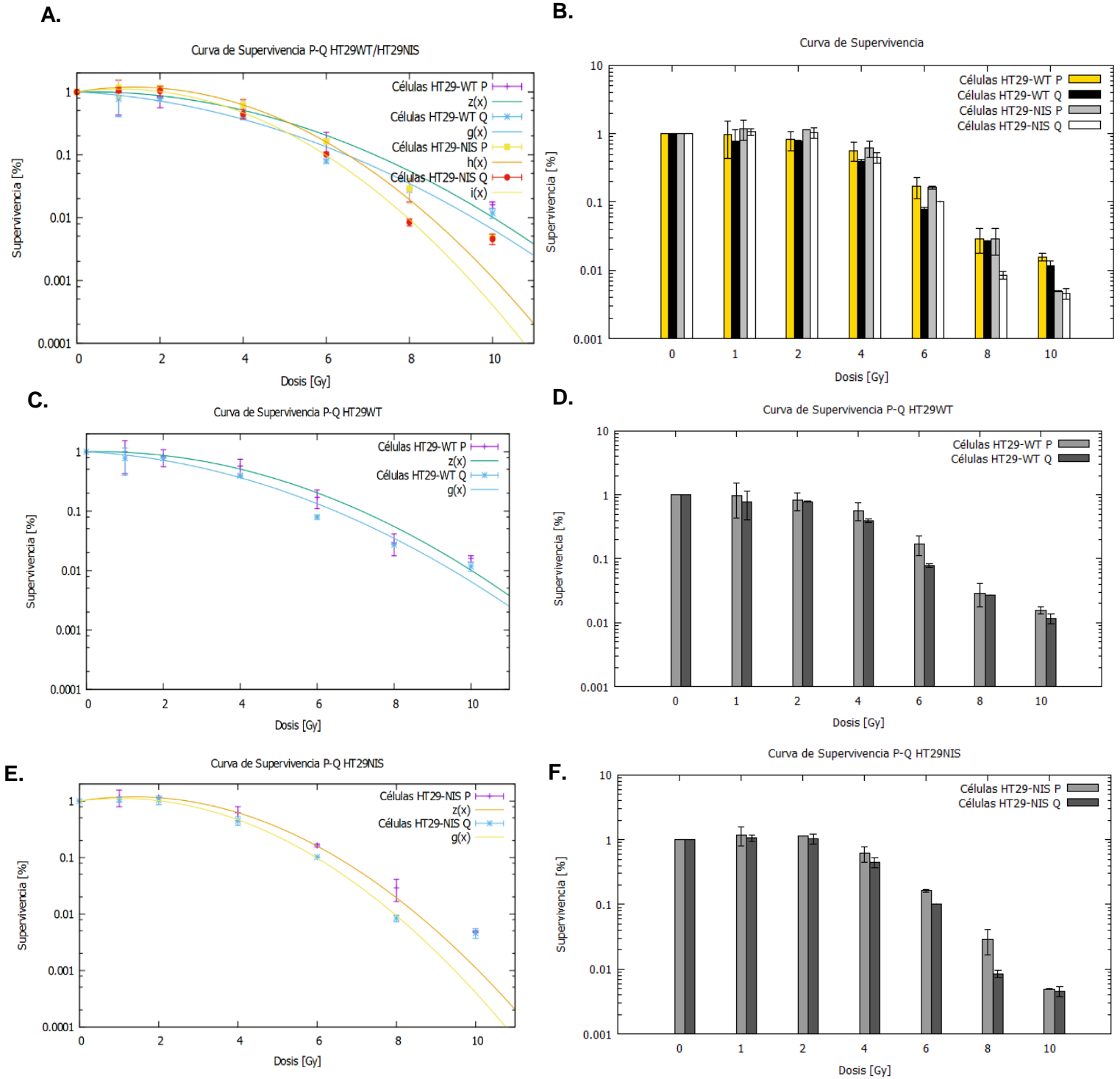
## 5.RESULTADOS

### 5.1 ¿Cuál es la supervivencia de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes tratadas con radiaciones ionizantes?

A partir de los resultados del ensayo clonogénico mediante el conteo de las colonias, se realizó el cálculo de la eficiencia de sembrado y la fracción de supervivencia de las líneas celulares expuestas a las dosis de radiación anteriormente relacionadas, con el objetivo de realizar la construcción de las curvas de supervivencia. De igual manera se realizó el cálculo con los controles no irradiados. Estos datos se analizaron en el software gnuplot efectuándose el ajuste al modelo lineal cuadrático obteniendo las curvas de supervivencia relacionadas en la Figura 9. Adicionalmente se realizó otra aproximación gráfica mediante un análisis de barras complementario para cada una de las curvas

En los resultados fue posible evidenciar la diferencia de supervivencia entre las líneas celulares, encontrando que la línea HT29-NIS fue más radiosensible que la línea HT29-WT tanto en condiciones quiescentes como proliferantes tal como se muestra en las figuras 9A y 9B. Al realizar la evaluación en las condiciones proliferantes y quiescentes en cada línea celular se observa en las figuras 9C y 9D que en la línea HT29-WT cultivada en el medio simulando la condición quiescente es más radiosensible que las células cultivadas en condiciones proliferantes. Este mismo comportamiento se evidencia en las figuras 9E y 9F en las células HT29-NIS. Estos resultados sugieren un mayor efecto de la radiación

ionizante en dichas condiciones ya sea por daño en el ADN o por un estrés oxidativo incrementado, ambos factores son analizados en los siguientes objetivos del trabajo.



**Figura 9. ¿Cuál es la supervivencia de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes tratadas con radiaciones ionizantes?** A partir de ensayos clonogénicos se analizaron las diferencias en la supervivencia celular tanto de la línea HT29-WT y HT29-NIS cultivadas en condiciones proliferantes y quiescentes. **A).** Representación gráfica de la curva de supervivencia celular de ambas líneas celulares en condiciones de proliferación y quiescencia; representación de acuerdo al modelo lineal cuadrático. **B).** Representación gráfica en barras de la supervivencia celular de ambas líneas celulares en condiciones de proliferación y quiescencia **C)** Representación gráfica de la curva de supervivencia celular de la línea HT29-WT en condiciones de proliferación y quiescencia; representación de acuerdo al modelo lineal cuadrático **D).** Representación gráfica en barras de la supervivencia celular de la línea HT29-WT en condiciones de proliferación y quiescencia **E).** Representación gráfica de la curva de supervivencia celular de la línea HT29-NIS en condiciones de proliferación y quiescencia; representación de acuerdo al modelo lineal cuadrático **F).** Representación gráfica en barras de la supervivencia celular de la línea HT29-NIS en condiciones de proliferación y quiescencia

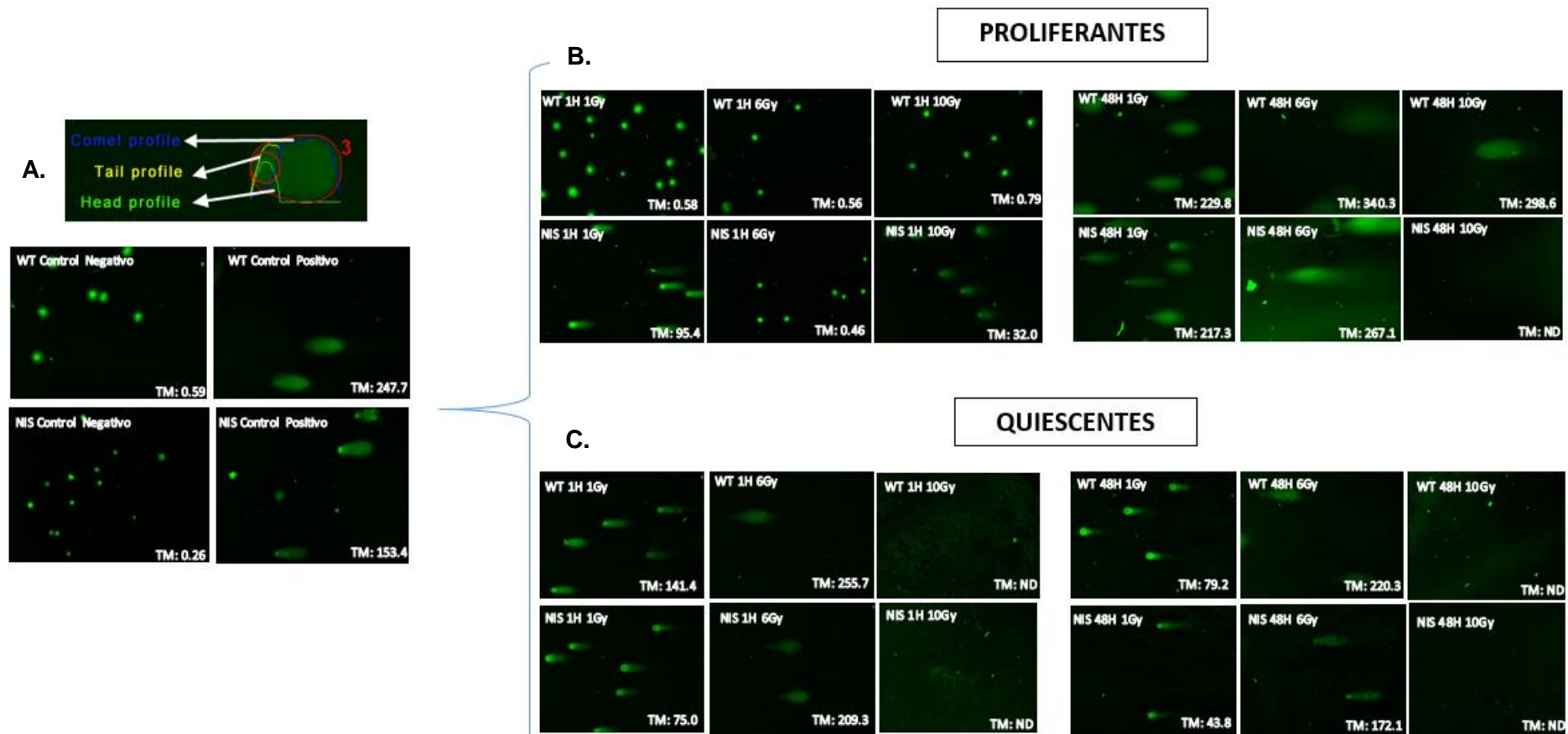
Los resultados del análisis estadístico permiten evidenciar que se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los datos correspondientes a altas dosis y bajas dosis de ambas líneas celulares ( $p < 0.05$ ), de ahí la forma de curva que toma la gráfica de acuerdo al ajuste de los datos mediante el modelo lineal cuadrático; adicionalmente también se observan diferencias significativas entre la condición quiescente y proliferante de cada una de las líneas celulares especialmente a dosis mayores a 4Gy tanto en la línea HT29-WT como en la línea HT29-NIS, corroborando la radiosensibilidad de las células en condición quiescente.

## **5.2 ¿Cuál es el grado de daño en el ADN de las células HT29-WT y NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes posterior a la irradiación celular?**

Con el fin de evaluar el grado de daño en el ADN se procedió a la realización del ensayo de electroforesis de células individuales o ensayo cometa; denominado de esta manera por el patrón de migración de los fragmentos del ADN en el soporte de agarosa. Fueron analizadas por lo menos 70 células individuales por cada condición evaluada.

Se analizó el parámetro del momento de la cola (TM por sus siglas en inglés) el cual relaciona el porcentaje de ADN en la cabeza y en la cola del cometa, de tal manera que entre más alto sea el TM mayor daño habrá en el ADN. En la figura 10A se observa el ejemplo de detección de los cometas por el software, y análisis de cada uno de los cometas, adicionalmente los cometas adquiridos con el control negativo (células no expuestas a radiación) y el control positivo (células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h a 4°C) validando la utilización del método. En la figura 10B se observan imágenes representativas de los cometas obtenidos y sus respectivos TM al pie de cada una de las figuras en condiciones proliferantes y en la figura 10C las correspondientes a las células en condiciones quiescentes. Es posible evidenciar que en algunos casos no fue posible realizar la detección del cometa mediante la utilización del software puesto que el daño era muy grande y a pesar de realizar el barrido total de cada uno de los pozos y tomar tantas fotos como fueran posibles, no se logró detectar un cometa bien delimitado que permitiera dicha cuantificación.



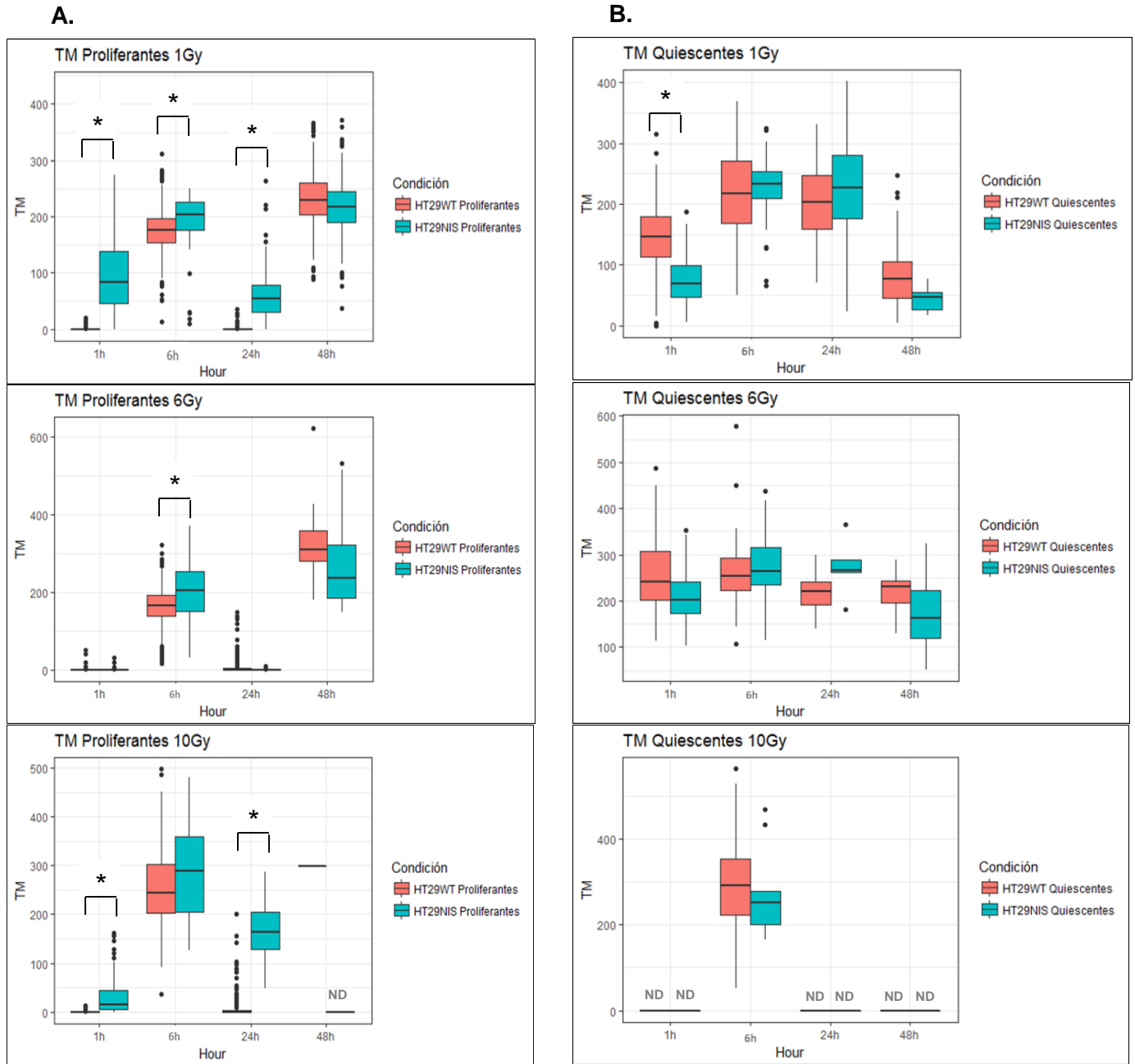


**Figura 10. ¿Cuál es el grado de daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes posterior a la irradiación celular?**

Ensayo cometa de las líneas celulares HT29-NIS Y HT29-WT en condiciones de proliferación y quiescencia. Imágenes adquiridas por microscopio de epifluorescencia con filtro FITC, aumento 10X, células teñidas con Vista Green. **A.** El control positivo corresponde a células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una concentración de 100µM durante 1 hora a 4°C y el control negativo a células no irradiadas. **B.** Imágenes representativas de ambas líneas celulares post-irradiación en condiciones de proliferación. **C.** Imágenes representativas de ambas líneas celulares post-irradiación en condiciones de quiescencia. Se tomaron las fotos correspondientes a todos los campos visuales de cada uno de los pozos, se analizaron mínimo 70 células por cada condición en el plug-in OpenComet del software ImageJ. (TM: Tail Moment; ND: No Determinado).







**Figura 11. ¿Cuál es el grado de daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes?**

Ensayo cometa de las líneas celulares HT29-NIS Y HT29-WT en condiciones de proliferación y quiescencia. **A.** Representación gráfica de los box-plot del momento de la cola (TM) de las líneas células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones proliferantes expuestas a dosis de radiación de 1Gy, 6Gy y 10Gy. **B.** Representación gráfica de los box-plot del momento de la cola (TM) de las líneas células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones quiescentes expuestas a dosis de radiación de 1Gy, 6Gy y 10Gy. Evaluación del TM 1h, 6h, 24h y 48 horas después de la exposición a la radiación. Se analizaron mínimo 70 células por cada condición en el plug-in OpenComet del software ImageJ. (TM: Tail Moment; ND: No Determinado). ( $p < 0.05$ )

Al realizar los box-plot correspondientes graficando el TM de cada uno de los puntos tomados posterior a la irradiación celular (1h, 6h, 24h y 48h) se observa que en condiciones proliferantes (Figura 11A) hay un mayor daño en el ADN de las células que tienen el transportador NIS (representándose como un TM mayor) con una recuperación del daño a las 24 horas a cada una de las dosis, pero con una expansión del daño a las 48 horas que es mayor al inicial, inclusive siendo no detectable a los 10Gy. En las células HT29-WT proliferantes se observa en general que el daño en el ADN es menor en la mayoría de las condiciones comparado con la línea HT29-NIS (datos con significancia estadística mostrados en la Figura 11A y señalados con un asterisco).

En las células en condiciones quiescentes (Figura 11B) se observa que al realizar la comparación entre las líneas celulares no se identifican mayores diferencias estadísticamente significativas entre ambas, sin embargo, se resalta que a los 10Gy no fue posible detectar la mayoría de cometas. Al realizar la comparación con la condición proliferante se evidencia que el daño a tiempos cortos post-irradiación es mayor en las células quiescentes puesto que se detecta un TM alto en tiempos tempranos después de irradiar. Adicionalmente se resalta el hecho de no observarse recuperación del daño del ADN a las 24 horas sino a las 48 horas posterior a la irradiación.

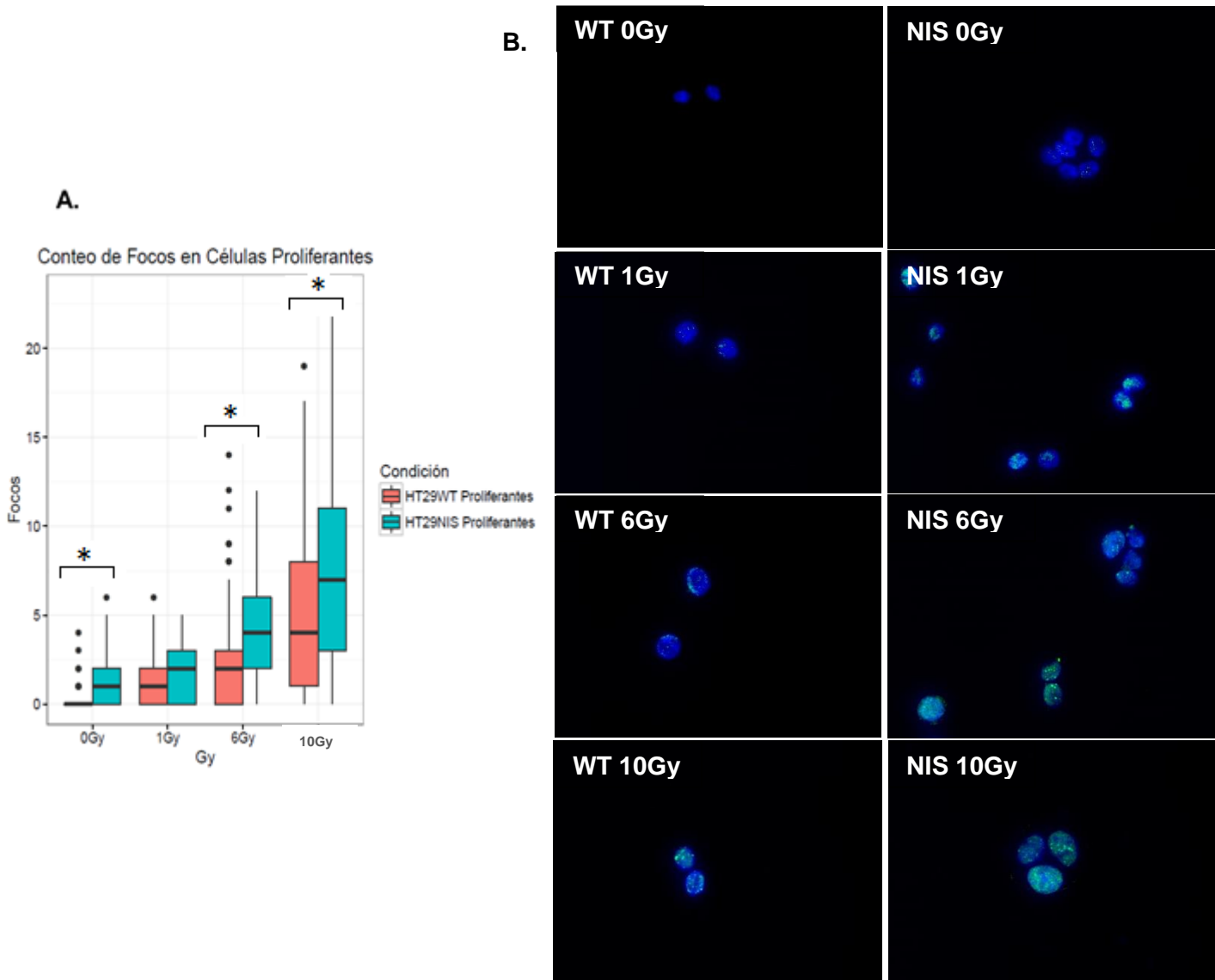
Estos resultados evidencian un mayor daño en el ADN en las células quiescentes que en las proliferantes, resultado concordante con los resultados de la supervivencia celular; lo que evidencia una mayor sensibilidad de las células que expresan el transportador NIS y de las células quiescentes a la radiación, lo que sugiere una activación tardía o nula de los sistemas de reparación del ADN o un control ineficaz del estrés oxidativo provocado por la exposición a la radiación ionizante.

### **5.3 ¿Cuál es la respuesta al daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes posterior a la irradiación celular?**

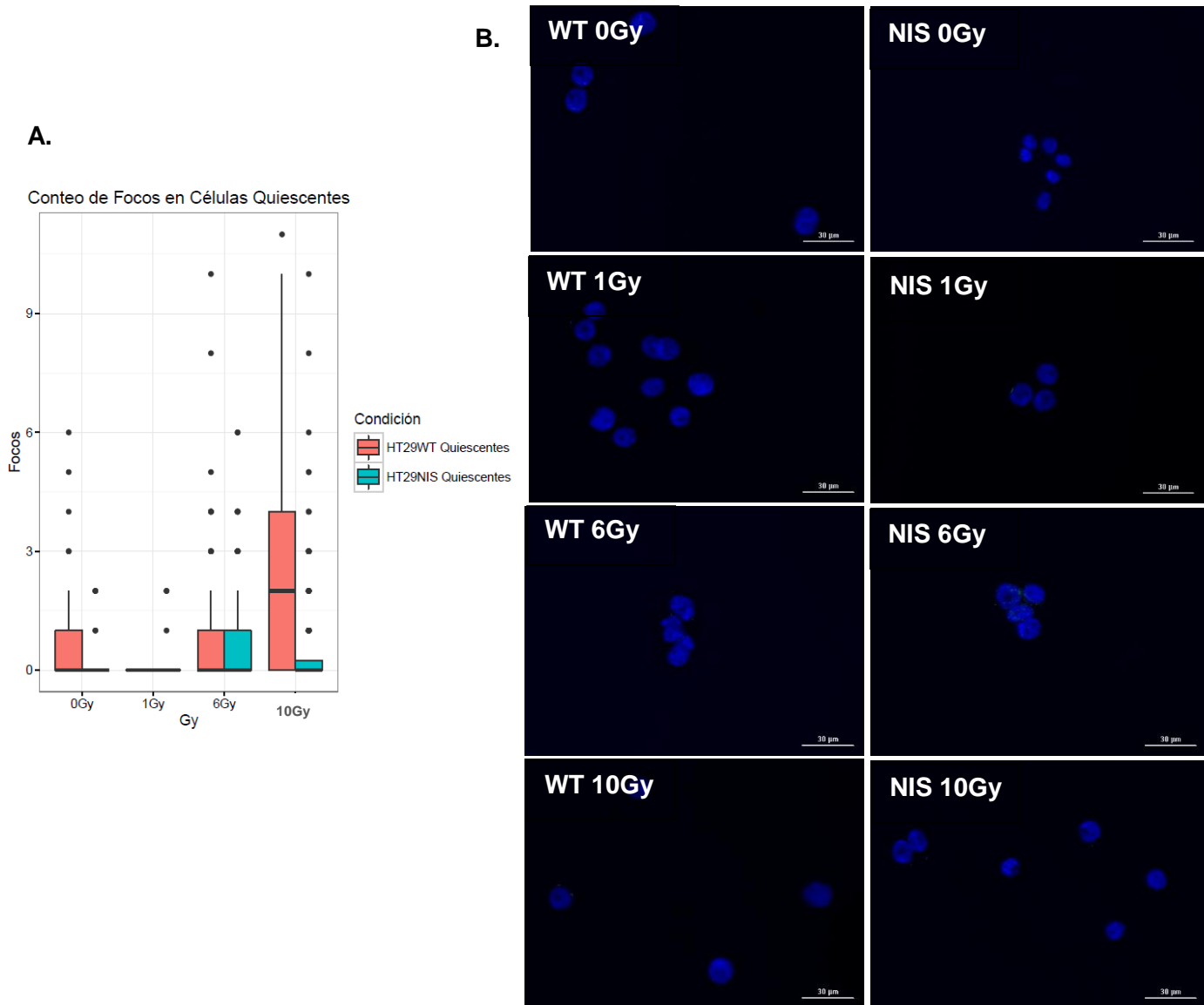
Con el objetivo de analizar el estado de activación de los sistemas de reparación del ADN posterior a la irradiación celular se evaluó la fosforilación de la histona H2AX, la cual es uno de los primeros sucesos que ocurren de manera común para los distintos sistemas de respuesta al daño de ADN descritos anteriormente. Se tomaron en cuenta mínimo 100 células de cada condición entre las dos replicas biológicas.

Como se evidencia en la figura 12A en las células cultivadas en condiciones proliferantes, los focos de la histona H2AX incrementaron a medida que se incrementó la dosis con la cual las células fueron irradiadas, comportamiento esperado de acuerdo a lo descrito en la teoría. Sin embargo, al realizar la comparación entre las líneas celulares, es posible observar que en la línea celular con el transportador NIS hay un número mayor de focos comparado directamente con la línea HT29-WT en cada una de las dosis de radiación utilizada, resultado con diferencias estadísticamente significativas para las dosis utilizadas de 0Gy, 6Gy y 10Gy. Este comportamiento se evidencia inclusive en las células que no fueron irradiadas (control negativo). Este resultado es concordante con el mayor daño en el ADN en las células con el transportador evidenciado en el ensayo cometa, lo que resulta en una mayor activación de sistemas de reparación (mayor número de focos de H2AX), se sugiere entonces que el número de DSBs es mayor en las células HT29-NIS, y por lo tanto (si no se da una reparación adecuada) puede conducir a una muerte celular de manera más rápida.

En la Figura 13A se observa el box-plot de las células en condiciones quiescentes, al contrario de las células proliferantes no se observa un patrón definido, probablemente relacionado con la quiescencia celular y la pobre activación de los sistemas de reparación del ADN en dicha condición, factor que se discutirá más adelante. Se muestran imágenes representativas de la inmunocitoquímica en las células proliferantes y quiescentes en las figuras 12B y 13B respectivamente.



**Figura 12. ¿Cuál es la respuesta al daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes posterior a la irradiación celular?** Inmunocitoquímica para la detección de la fosforilación de la histona H2AX como medición de la activación de los sistemas de reparación del ADN. **A).** Representación gráfica en box-plot del conteo de focos en las líneas celulares (HT29-WT y HT29-NIS) en condiciones proliferativas 24 horas después de la exposición a las radiaciones ionizantes con dosis de 1Gy, 6Gy y 10Gy. Ensayo representativo de dos replicas biológicas. **B).** Imágenes representativas de la inmunocitoquímica realizada adquiridas en un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 40X. Tinción del núcleo con Hoescht 33342 y utilización de anticuerpo primario anti- $\gamma$ H2AX y anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. Se analizaron mínimo 100 células por cada ensayo en cada condición. (\* corresponde a un  $p < 0.05$ )



**Figura 13. ¿Cuál es la respuesta al daño en el ADN de las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo quiescentes posterior a la irradiación celular?** Inmunocitoquímica para la detección de la fosforilación de la histona H2AX como medición de la activación de los sistemas de reparación del ADN. **A).** Representación gráfica en box-plot del conteo de focos en las líneas celulares (HT29-WT y HT29-NIS) en condiciones quiescentes 24 horas después de la exposición a las radiaciones ionizantes con dosis de 1Gy, 6Gy y 10Gy. Ensayo representativo de dos replicas biológicas. **B).** Imágenes representativas de la inmunocitoquímica realizada adquiridas en un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 40X. Tinción del núcleo con Hoescht 33342 y utilización de anticuerpo primario anti- $\gamma$ H2AX y anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488. Se analizaron mínimo 100 células por cada ensayo en cada condición. (\* corresponde a un  $p < 0.05$ )

## 5.4 ¿Cuáles son los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) posterior a la irradiación celular en las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes?

Para determinar el estado oxidativo celular se realizó la medición de las especies reactivas de oxígeno (ROS) posterior a la exposición a la radiación ionizante. La sonda H2DFF-DA en un ambiente celular oxidativo es clivada y fluorescente permitiendo realizar el análisis del estado REDOX celular mediante la medición de dicha fluorescencia.

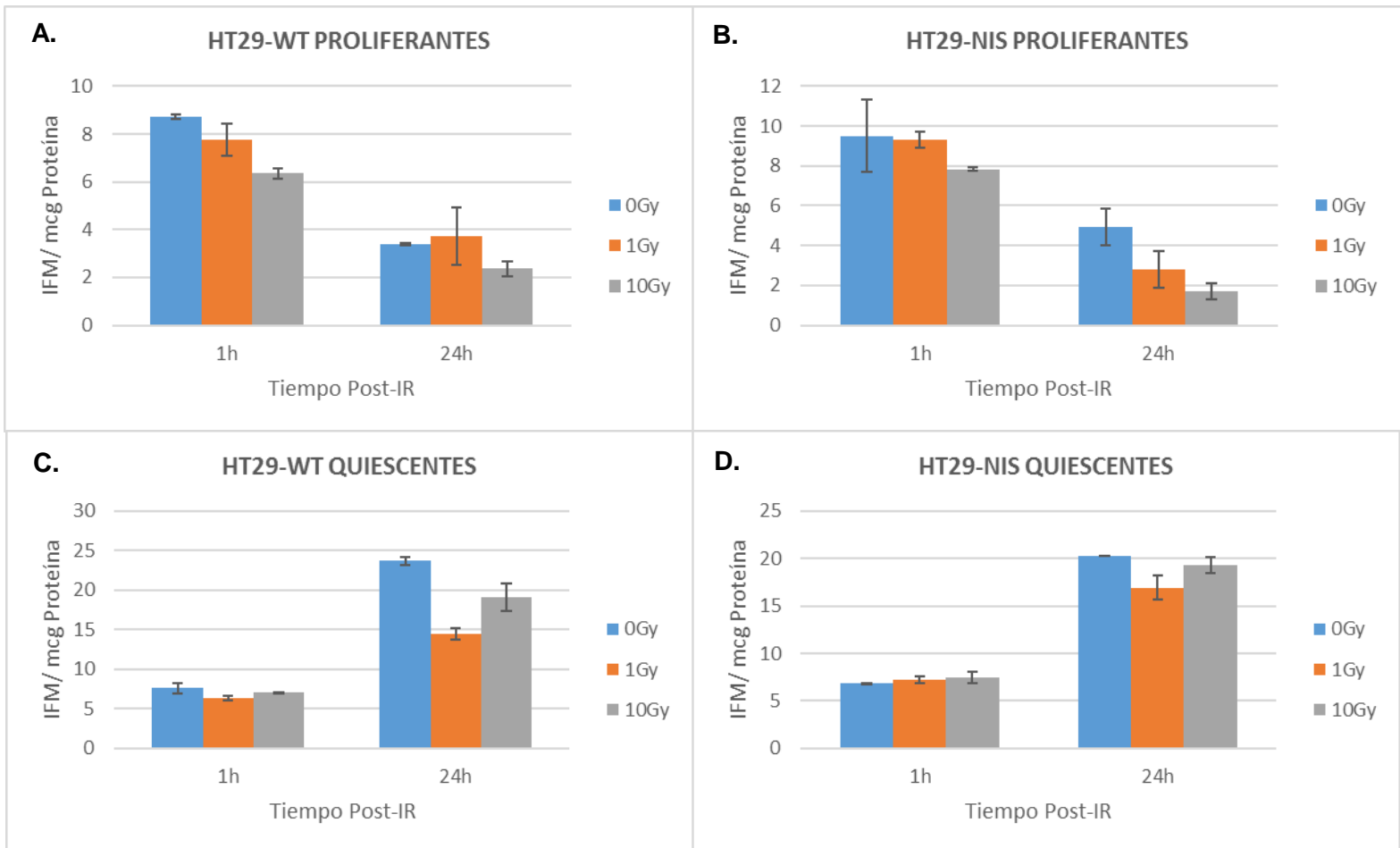
El ensayo se realizó tanto en las células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones de quiescencia y proliferación. Se realizaron mediciones de fluorescencia en tiempos posteriores a la exposición con la radiación ionizante (1h, 6h, 24h y 48h) con dosis de irradiación de 1Gy, 6Gy y 10Gy.

En la figura 14 se observan los niveles relativos de fluorescencia normalizados por cantidad de proteína en microgramos. En las figuras 14A y 14B se muestra los resultados obtenidos en las células proliferantes en donde se resaltan los niveles de ROS 1h y 24h posterior a la irradiación. Se evidencia que hay disminución de estos niveles 24h después de irradiar, niveles que se mantienen incluso 48h post-irradiación (datos no mostrados). Sin embargo, los resultados no alcanzan la significancia estadística.

Por el contrario, en las células en condición de quiescencia (14C y 14D) fue posible evidenciar que los niveles de ROS se incrementaron 24h después de irradiar tanto para las células HT29-WT como para las HT29-NIS. Adicionalmente también se evidencia que la condición de quiescencia, sin exponer a radiación, incrementa los niveles de ROS en el cultivo celular.

De estos resultados es posible sugerir que en las células proliferantes los sistemas antioxidantes celulares se encuentran funcionando de manera adecuada, y por esta razón hay disminución en los niveles de especies reactivas de oxígeno. En las células quiescentes, el solo hecho de ser sometidas a esta condición altera el estado REDOX celular, sin embargo, esto puede ser controlado por los sistemas antioxidantes en células no irradiadas o irradiadas con bajas dosis, por ejemplo: 0Gy y 1Gy (datos no mostrados), pero a dosis altas y tiempos prolongados los sistemas antioxidantes se pueden saturar y

no logran controlar el estrés oxidativo celular lo que podría conllevar finalmente a la muerte celular.



**Figura 14. ¿Cuáles son los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) posterior a la irradiación celular en las células HT29-WT y HT29-NIS en las condiciones de cultivo proliferantes y quiescentes?** Niveles de fluorescencia relativos normalizados por cantidad de proteína. **A.** Niveles de ROS en células wild-type en condiciones proliferantes. **B.** Niveles de ROS en células con el transportador NIS en condiciones proliferantes. **C.** Niveles de ROS en células wild-type en condiciones quiescentes. **D.** Niveles de ROS en células con el transportador NIS en condiciones quiescentes. Se realizaron 3 réplicas biológicas del ensayo y cada réplica biológica contaba con tres réplicas experimentales. ( $p < 0.05$ )

## **5.5 ¿Cuál es el estado de la vía de activación Nrf-2 por respuesta a estrés oxidativo en las líneas celulares posterior a la irradiación?**

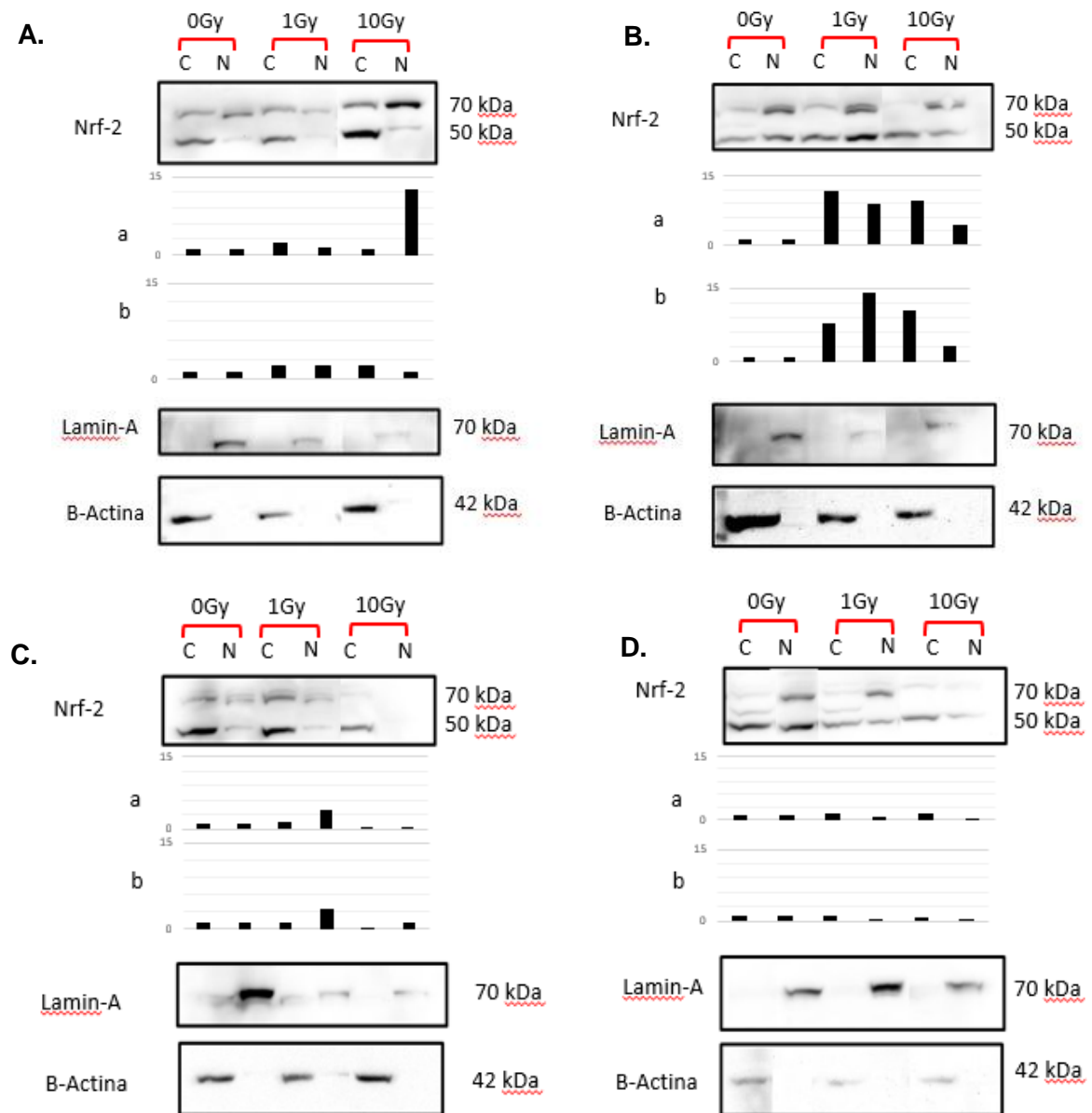
Con el objetivo de evaluar el estado de la vía de activación de la proteína Nrf-2 (referida como factor de transcripción para la activación de sistemas antioxidantes), se analizó mediante el ensayo de western-blot la expresión de esta proteína tanto en extractos proteicos nucleares como citoplasmáticos. Adicionalmente y como factor confirmatorio de la activación de la vía por translocación de Nrf-2 de citoplasma a núcleo se evaluó la proteína Keap-1, la cual se encuentra asociada con Nrf-2 en estado basal y solamente cuando se disocia este complejo permite la entrada de Nrf-2 a núcleo cuando se incrementa el estrés oxidativo celular. Los resultados de cada uno de los sets (tanto imágenes obtenidas como densitometría respectiva del ensayo) son mostrados en las figuras 15 y 16.

Es importante resaltar que de la proteína Nrf-2 se detectaron varias bandas, pero de acuerdo a la ficha técnica del anticuerpo utilizado para la detección de esta proteína se cuantificaron las dos bandas más nítidas, la primera banda detectada a los 70kDa y la segunda aproximadamente a los 50kDa.

En la figura 15 se relacionan los resultados del WB de las células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones de proliferación; en las figuras 15A y 15B se observan los niveles de expresión de la proteína Nrf-2 en las células WT en condiciones de proliferación, en donde se evidencia proteína a nivel nuclear en células expuestas a 10Gy 1h después de irradiar y a 1Gy y 10Gy 24h después de irradiar, resultado que se mantiene, pero con menor intensidad a 48h (datos no mostrados).

Para las células HT29-NIS (15C y 15D), solamente se observa un ligero incremento en los niveles de expresión de Nrf-2 a las 6 horas post-irradiación (datos no mostrados).





**Figura 15. ¿Cuál es el estado de la vía de activación Nrf-2 por respuesta a estrés oxidativo en las líneas celulares posterior a la irradiación en condiciones proliferantes?** Niveles de proteína Nrf-2 detectados mediante western blot (WB) en extractos nucleares y citoplasmáticos de células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones proliferantes. Se utilizaron como control de carga las proteínas a nivel citoplasmático:  $\beta$ -Actina y nuclear: Lamin-A. **A.** WB de células HT29-WT 1h post-irradiación. **B.** WB de células HT29-WT 24h post-irradiación. **C.** WB de células HT29-NIS 1h post-irradiación. **D.** WB de células HT29-NIS 24h post-irradiación. Densitometría realizada mediante el software ImageJ. **a y b.** Representan a las bandas de Nrf-2 que fueron tenidas en cuenta en la cuantificación de los niveles de proteína total. C: Citoplasmático. N: Nuclear.

En la figura 16 se observan los resultados de niveles de expresión de la proteína Nrf-2 en las células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones de quiescencia. De acuerdo a los

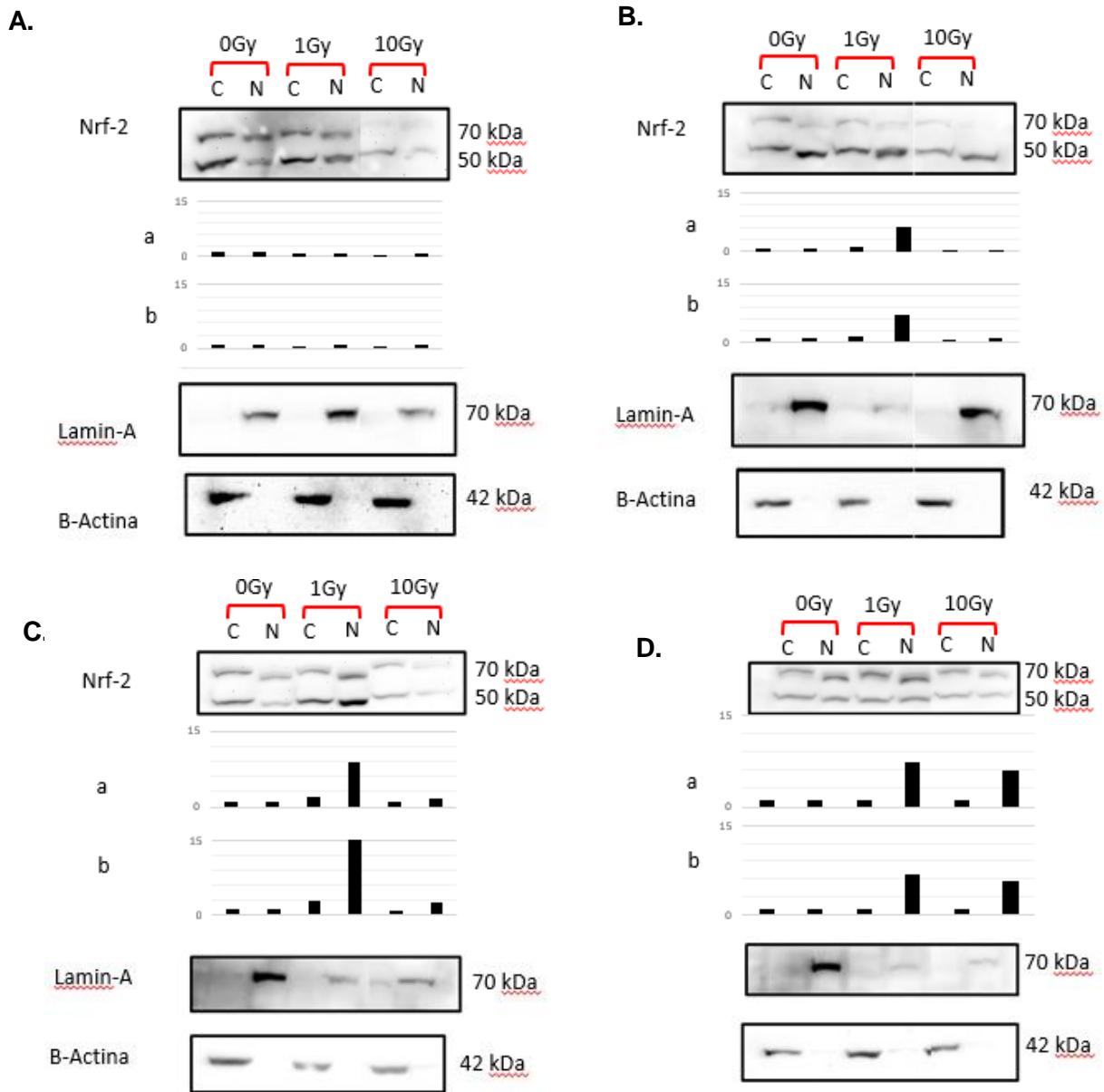
resultados del western-blot se observa incremento en los niveles de expresión de la proteína Nrf-2 en las células HT29-WT a 1Gy posterior a 24 horas de haber irradiado. (Figuras 16A y 16B). Adicionalmente, 48h posterior a la irradiación se evidencia incremento de Nrf-2 a nivel citoplasmático en las células tratadas a 1Gy y 10Gy. (Datos no mostrados).

En las células HT29-NIS en condiciones quiescentes (Figuras 16C y 16D) se observa un incremento de Nrf-2 a 1h posterior a la irradiación con una dosis de 1Gy, que decrece a las 24h y desaparece por completo a las 48h después de irradiar.

En todos los casos la proteína Keap-1 fue detectada a nivel nuclear sin encontrarse diferencias significativas en los niveles de la misma (datos no mostrados).

De acuerdo a los resultados anteriores, en las células proliferantes se observa una respuesta relativamente rápida de la proteína Nrf-2, lo que puede contribuir al control del estrés oxidativo y por lo tanto a evitar la muerte celular. Al realizar la comparación entre ambas líneas celulares se observa mayor cantidad de proteína Nrf-2 de la línea HT29-WT que de la línea con el transportador NIS, de esto último se sugiere que la menor activación de los sistemas antioxidantes de las células HT29-NIS puede estar disminuyendo la tolerancia al estrés oxidativo y por lo tanto relacionarse con una mayor radiosensibilidad.

En las células quiescentes también fue posible evidenciar proteína Nrf-2 a nivel nuclear, sin embargo, al compararse con las células en condiciones proliferantes, la traslocación de esta proteína parece estar dándose de manera más tardía en las células HT29-WT y por lo tanto controlar menos efectivamente el estrés oxidativo. Con las células HT29-NIS la respuesta parece ser rápida pero poco sostenida relacionándose nuevamente con una menor tolerancia al estrés oxidativo y posiblemente una mayor radiosensibilidad.



**Figura 16. ¿Cuál es el estado de la vía de activación Nrf-2 por respuesta a estrés oxidativo celular en las células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones quiescentes?** Niveles de proteína Nrf-2 detectados mediante western blot (WB) en extractos nucleares y citoplasmáticos de células HT29-WT y HT29-NIS en condiciones quiescentes. Se utilizaron como control de carga las proteínas a nivel citoplasmático:  $\beta$ -Actina y nuclear: Lamin-A. **A.** WB de células HT29-WT 1h post-irradiación. **B.** WB de células HT29-WT 24h post-irradiación. **C.** WB de células HT29-NIS 1h post-irradiación. **D.** WB de células HT29-NIS 24h post-irradiación. Densitometría realizada mediante el software ImageJ. a y b. Representan a las bandas de Nrf-2 que fueron tenidas en cuenta en la cuantificación de los niveles de proteína total. C: Citoplasmático. N: Nuclear.



## 6. DISCUSIÓN

Este trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la proteína NIS sobre la respuesta al tratamiento con radiaciones ionizantes en condiciones de proliferación y quiescencia.

### 6.1 Supervivencia celular

La mayoría de los órganos se encuentran compuestos tanto de células proliferantes como de células quiescentes. Entender como estas células difieren en su sensibilidad a la radiación puede ser aprovechado para la construcción de tratamientos más selectivos y de esta manera prevenir o reducir el daño por la radiación (Lloyd 1987); es por ello que se hace interesante evaluar la supervivencia de una línea celular en estas condiciones. De esta manera al realizarse la evaluación de la supervivencia celular analizada mediante la realización de ensayos clonogénicos, se evidenció en primera instancia que las células con el transportador NIS son más radiosensibles comparadas con las células HT29-WT, adicionalmente al realizar el análisis de supervivencia en condiciones quiescentes tanto la línea parental como las transfectadas con el transportador NIS fueron más radiosensibles comparadas con su contraparte directa en condiciones proliferantes.

A pesar de que de manera tradicional se ha descrito que las células en estado de proliferación son más sensibles a la radiación que las células en estado quiescente (J. Dai, Itahana, and Baskar 2015; West and Barnett 2011), y que de acuerdo a las leyes de Bergonie y Tribondeau en donde se afirma que “Los rayos X actúan más eficientemente en células que poseen una gran actividad reproductiva” (Bergonié and Tribondeau 1959), los resultados que respaldan esta teoría tienen en cuenta otros factores relacionados con características del microambiente tumoral como lo es la adquisición de resultados en modelos *in vivo* en donde claramente se describen diferencias con los modelos *in vitro* (Chapman and Nahum 2015), relación directa de estado de quiescencia e hipoxia celular (Masunaga, Ono, and Abe 1991) y sincronización del ciclo celular en los experimentos (Mendonca, Rodriguez, and Alpen 1989).

Algunos otros autores prefieren no realizar una generalización tan cortante e inclusive llegan a ignorar la autodenominada "ley de radiosensibilidad" refiriendo que la tasa de proliferación no se encuentra necesariamente correlacionada con la muerte celular posterior a la irradiación (Vogin and Foray 2013). De esta manera el resultado de supervivencia evidenciado en este trabajo de investigación (mas radiosensibilidad en las células quiescentes) puede estar relacionado exclusivamente con las condiciones de cultivo utilizadas e inclusive con la línea celular HT29 de carcinoma colorectal referenciada como una línea radioresistente en la literatura en condiciones tradicionales de cultivo (Huerta et al. 2010). Inclusive se relacionan trabajos en donde se observa el mismo comportamiento de radiosensibilidad de las células en condición de quiescencia comparadas con las proliferantes (Luk, Keng, and Sutherland 1985; Sweigert et al. 1989; Wilson, K.M; Keng 1989).

Por otro lado, al realizar la comparación entre las líneas celulares se evidenció que la línea transfectada con el transportador NIS fue más radiosensible que la línea wild-type a altas dosis de radiación en las condiciones de proliferación y quiescencia, lo que evidencia un efecto mayor de la radiación en dicha línea celular. En la literatura se ha descrito las características moleculares del transportador (Dohán et al. 2003), su regulación en la célula tiroidea (De La Vieja et al. 2000), y su aplicación en el tratamiento del cáncer ya sea con estrategias para volver a diferenciar el tejido tumoral (con el objetivo de incrementar la expresión de NIS) (C Spitzweg and Morris 2002), o como gen candidato para la terapia génica de otro tipo de canceres (Kim et al. 2008); (Riesco-Eizaguirre and Santisteban 2008); sin embargo, no se reporta relación del transportador e inducción a algún tipo de muerte celular e inclusive sensibilidad a la radiación ionizante. Por lo que no es posible realizar alguna conexión entre la presencia del transportador y la radiosensibilidad comparada con la línea wild-type.

Teniendo en cuenta los resultados de las curvas de supervivencia en los siguientes dos objetivos se realizó una aproximación a la detección del daño directo e indirecto, de esta manera se evaluó el grado de daño de ADN mediante el ensayo cometa, la activación de sistemas de reparación con la fosforilación de la histona H2AX y medición del estrés oxidativo y activación de sistemas antioxidantes posterior a la irradiación.

## 6.2 Daño en el ADN

En el ensayo cometa se evidencio el grado de daño en el ADN tanto en las células HT29-WT y HT29-NIS encontrándose que en las células con el transportador NIS el daño es mayor que en las células wild-type inclusive no pudiéndose detectar los cometas por su gran extensión a dosis altas y tiempos prolongados, adicionalmente se evidencia un mayor daño en las células en estado de quiescencia, resultado acorde con la supervivencia celular.

Se resalta en los resultados del ensayo cometa la reparación del daño del ADN a las 24h posterior a la irradiación celular en las células proliferantes, esto traducido en un menor TM. Sin embargo, a las 48h el daño es mayor que el encontrado 1h después de irradiar; para explicar esto resultados es necesario introducir el concepto de daño subletal en el que, como su nombre lo indica, no es letal para las células pero que puede interactuar con un daño similar producido por la radiación generando finalmente un daño letal. (Bedford 1991). Esto se puede explicar por el daño inicial producido por la radiación, detectado a la hora y 6h posterior a irradiar, reparación de ese daño por parte de la activación de los sistemas de reparación a las 24h y daño incrementado a las 48h por el daño subletal acumulado no eficientemente reparado y posiblemente sumado al estrés oxidativo celular.

## 6.3 Activación de la respuesta al daño en el ADN (DDR)

Mediante la realización de la inmunocitoquímica de la fosforilación de la histona H2AX se permite la detección de los quiebres de doble hebra (DSB) de manera individual, de tal manera que se puede relacionar linealmente el número de DSB con el número de focos de H2AX detectados y por lo tanto con mayor activación de sistemas de reparación del ADN. (Olive 2004). El ensayo cometa permite la detección de más tipos de daños en el ADN tal como SSB, entrecruzamientos de hebra y daños de base (Fairbairn, Olive, and O'Neill 1995); realizando estos dos ensayos es posible detectar más precisamente el daño en el ADN y de manera subsecuente su reparación.

Del resultado del conteo de focos de la histona H2AX fue posible evidenciar la activación residual de los sistemas de reparación 24 horas posterior a la irradiación celular. De esta manera se evidenció en las células en condición de proliferación un daño gradual con el

incremento de dosis de radiación que permanece por lo menos durante 24 horas y fue posible detectarlo gracias a la inmunocitoquímica de la histona. Este es un resultado esperado debido a que a mayor dosis de radiación mayor daño habrá en el ADN y por lo tanto mayor reparación del mismo, en este caso traducido en un mayor número de focos. Al realizar la comparación entre las líneas celulares se evidenció que en las células con el transportador hubo un mayor número de focos, inclusive en las células no irradiadas.

Como se ha reflexionado anteriormente no se referencia literatura en la cual se le dé un papel a NIS en función distinta a nivel celular a la captación y transporte de yodo y sodio. De esta afirmación surgen dos hipótesis:

- ➔ De acuerdo a lo anterior la única diferencia entre las líneas celulares es la presencia del transportador NIS, y la función de este como se ha reportado en la literatura es la captación de sodio y de yodo. Por esta razón es válido pensar que, aunque en el medio de cultivo hay muy bajas cantidades de yodo, es posible que la célula lo capte y por lo tanto cambiar el metabolismo celular. (Pesce and Kopp 2014). Durante el procesamiento y formación de las hormonas tiroideas se habla tanto de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de yodo (RIS), principalmente cuando el yodo no es utilizado de manera eficiente y queda libre en la célula (Daicoviciu 2006); si trasladamos ese conocimiento al modelo celular que se está evaluando, una célula no especializada en el metabolismo del yodo, es posible sugerir una producción tanto de ROS como de RIS que al desequilibrar el estado REDOX puede estar causando un daño a nivel del ADN y por lo tanto activar los sistemas de reparación del ADN evidenciado en este trabajo por la fosforilación de la histona H2AX.
- ➔ La segunda posibilidad que se plantea, pero no la más factible, es la posible alteración de algún sistema en la célula por la transfección estable de la proteína NIS, en cuyo caso se deberían construir en un futuro experimentos en los cuales se incluyan controles de transfección y descartar esta posibilidad.

En las células quiescentes no se observa un patrón definido en el conteo de los focos de reparación, esto puede estar relacionado con tres posibilidades: 1) el análisis realizado a las 24 horas pudo haber sido “tardío” en las células en esta condición y por lo tanto no



detectarse en mayor cantidad a este tiempo; 2) algunos autores describen que en las células quiescentes hay una menor activación de sistemas de reparación por la condición de *stand-by* en la que se encuentra la célula (T. Tanaka et al. 2013), o 3) otros trabajos relacionan a la disminución de la fosforilación de la histona H2AX con la entrada al estado quiescente celular y adquisición de inmortalidad, e inclusive es utilizado como marcador de quiescencia. (Atsumi et al. 2011).

Tomando en cuenta los resultados del ensayo cometa y de la fosforilación de la histona H2AX de manera conjunta, se observa que en las células en condición de quiescencia a pesar de no detectarse en mayor grado H2AX fosforilada, hay reparación del ADN cuando se comparan los datos de TM 1h y 48h post irradiación. Se ha observado en algunos modelos celulares la reparación del ADN por parte de la histona H2AX aun en el estado quiescente en donde esta proteína es raramente expresada. (Atsumi et al. 2015). También, en la reparación de los DSB se describe una fase que es independiente de la fosforilación de la histona H2AX, en la cual los demás factores de reparación del ADN son reclutados sin necesidad de fosforilar esta proteína involucrando al complejo MRN, modificaciones de la histona adicionales y cambios en la compactación de la cromatina en los sitios donde se produce el daño. (Polo and Jackson 2011).

## 6.4 Estrés Oxidativo

Al realizar la medición de la fluorescencia relacionada con la cantidad de especies reactivas de oxígeno se evidenció que en las células proliferantes no hay un resultado que permita relacionar un estrés oxidativo producido en dichas células, posiblemente relacionado con la activación de sistemas antioxidantes que mantienen el control del estado REDOX celular y por lo tanto la supervivencia, es importante aclarar que la sonda utilizada para este ensayo no detecta de manera específica especies reactivas de oxígeno, como algunos autores lo han descrito, (Kalyanaraman et al. 2012; Rhee et al. 2010), sino un desequilibrio en el balance REDOX de la célula, es decir la entrada a un estado de estrés oxidativo (Forman et al. 2015).

En las células quiescentes a dosis altas y tiempos prolongados como por ejemplo de 24 y 48 horas posterior a la irradiación se encuentra una gran cantidad de ROS que no son

controladas efectivamente, resultado relacionado con la radiosensibilidad de las células quiescentes y el gran daño en el ADN encontrado en las mismas. Es de notar que en las células transfectadas con NIS sin irradiar (0Gy) hay un notable estrés oxidativo comparadas con las células wild-type dando más fuerza a la hipótesis de ROS y RIS en estas células por la presencia de dicha proteína. (Arriagada et al. 2015; Daicoviciu).

En algunos estudios se ha evidenciado que el estrés oxidativo influencia no solamente en la distribución subcelular de Nrf2 sino también en la cantidad total de la proteína (Kwak et al. 2002; Stewart et al. 2003), esto se evidencia en el análisis de la proteína Nrf2 en las células HT29-WT en condición proliferante en donde se observa incremento de la misma tanto a nivel citoplasmático y nuclear. En las células HT29-NIS la cantidad de proteína Nrf2 es menor, esto relacionándose posiblemente con la mayor radiosensibilidad de esta línea celular.

En las células quiescentes se observan también niveles de proteína de Nrf-2 a nivel citoplasmático y nuclear, sin embargo, el tiempo en el cual suceden estos acontecimientos en el caso de las células HT29-WT parece ser tardío y por lo tanto el daño producido por un estrés oxidativo no controlado en tiempos tempranos puede ser suficiente para conllevar a una rápida muerte celular. De manera contraria en las células con el transportador NIS, parece suscitarse una respuesta rápida antioxidante que disminuye del todo a las 24 horas.

Al revisar en la literatura los tiempos de activación de la proteína, se evidencia que esta cuenta con un tiempo de vida media promedio de 15 minutos en células no tratadas, y en células expuestas a algún agente inductor de estrés oxidativo 30 a 40 minutos, es decir que en condiciones oxidativas la proteína aun es degradada más lentamente que en condiciones normales. (McMahon et al. 2004; Nguyen, Nioi, and Pickett 2009).

Es de esta forma como se relaciona la detección de Keap-1 en núcleo, puesto que se le da un papel de control post-inducción, en donde posterior a la recuperación de la homeostasis REDOX celular Keap-1 ingresa a núcleo para disociar a Nrf-2 de los ARE, este complejo Keap1-Nrf2 es exportado del núcleo y una vez en citoplasma se disocia resultando en la degradación de Nrf-2 y la terminación de esta vía. (Bryan et al. 2013; Sun et al. 2007).

De acuerdo a los resultados y a la discusión de los mismo es posible concluir de la siguiente manera:

En las células HT29-NIS proliferantes se evidenció menor supervivencia celular que las células HT29-WT, esto posiblemente relacionado con un mayor daño en el ADN con activación de los sistemas de reparación para el mismo, detección de cantidades bajas de la proteína Nrf-2 pero sin embargo hay control del estado REDOX (posiblemente se active la vía muy rápidamente y no se alcanzó a evidenciar dentro de los tiempos analizados); es posible que la mayor fuente de daño de la radiación ionizante en las células NIS proliferantes fuera por daño directo en el ADN que no se repare de manera adecuada por los sistemas de reparación del ADN.

En las células quiescentes, se observa menor supervivencia celular, activación no efectiva o nula de sistemas de reparación a pesar de evidenciarse un gran daño en el ADN y adicionalmente un control inadecuado de ROS por activación no efectiva o tardía de los sistemas antioxidantes; en las células quiescentes se propone que hay tanto daño directo e indirecto de la radiación, ninguno controlado de manera efectiva resultando en una rápida muerte celular.



## **7.CONCLUSIONES**

Las células con el transportador HT29-NIS proliferantes son más radiosensibles que las células HT29-WT.

La quiescencia en la línea celular HT29 de carcinoma colorectal es un factor que favorece el tratamiento con radiaciones ionizantes puesto que son más radiosensibles comparado con su contraparte proliferante.

Los resultados de supervivencia celular se relacionan con los resultados de la activación de sistemas de reparación, de daño en el ADN y de estrés oxidativo permitiendo concluir que la quiescencia es un factor que sensibiliza a la célula a la muerte celular por radiaciones ionizantes en el modelo celular utilizado.



## 8.RECOMENDACIONES

En este trabajo de investigación se utilizó una línea celular que no expresara de manera constitutiva la proteína NIS, esta fue sometida a distintas dosis de radiación y se evaluó la supervivencia y el efecto de la radiación ionizante a nivel celular. Con el objetivo de evidenciar si el efecto “radiosensibilizador” de la quiescencia utilizada es o no dependiente de la línea celular utilizada, se sugiere la realización de ensayos posteriores con otras líneas celulares (tumoraes y no tumoraes)

En la literatura no fue posible encontrar una relación entre NIS y el posible mecanismo por el cual puede estar sensibilizando a la célula a la muerte por radiaciones ionizantes, para complementar el trabajo realizado se recomienda la realización de ensayos de captación de yodo, comprobando la funcionalidad de la proteína y la alteración del estrés oxidativo. Así mismo como control metodológico se sugiere la inclusión de un control de transfección y de esta manera descartar todo efecto posiblemente relacionado y atribuido a esta.

La mayoría de los ensayos realizados en este trabajo se realizaron con el objetivo de evaluar de manera secuencial el efecto de la radiación en el modelo celular utilizado, sin embargo, por cuestiones logísticas no fue posible realizar la cinética de reparación del ADN celular por lo que se propone tener en cuenta este experimento en proyectos futuros.

Adicionalmente el saber que efecto tiene la radiación de manera inmediata en la célula es muy importante sin embargo en este proyecto no fue posible realizar ensayos inmediatos posterior a la radiación, por lo que se propone la adquisición de un equipo de irradiación portátil en el laboratorio del grupo de investigación.

Tecnologías actuales permiten la realización de ensayos en distintas condiciones ambientales y de cultivo celular (presión de oxígeno, presión de CO<sub>2</sub>, humedad relativa, etc.) facilitando la simulación del microambiente tumoral, por ello en aras de ampliar el conocimiento y optimizar el tratamiento del cáncer se sugiere tener en cuenta otras condiciones del microambiente tumoral en proyectos de investigación futuros.

Analizar el efecto de la radiación por sí misma en la localización del transportador NIS, tratando de dar un concepto más preciso acerca de su utilización en terapia combinada entre terapia génica como punto de partida y radioterapia metabólica y radioterapia de haz externo como ataque directo a la zona tumoral. De la misma manera evaluar la localización del transportador NIS en el modelo de hipoxia.

Para tener una mayor claridad sobre la muerte por radiaciones ionizantes se recomienda realizar un análisis sobre el posible tipo de muerte celular que puede estar sobrellevando la línea celular al ser irradiada por la radiación ionizante.





## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Akhdar, Hanane et al. 2009. "Involvement of Nrf2 Activation in Resistance to 5-Fluorouracil in Human Colon Cancer HT-29 Cells." *European Journal of Cancer* 45(12): 2219–27.
- Altieri, Fabio, Caterina Grillo, Manola Maceroni, and Silvia Chichiarelli. 2008. "DNA Damage and Repair: From Molecular Mechanisms to Health Implications." *Antioxidants & redox signaling* 10(5): 891–937.
- Arriagada, Alejandro A. et al. 2015. "Excess Iodide Induces an Acute Inhibition of the Sodium/iodide Symporter in Thyroid Male Rat Cells by Increasing Reactive Oxygen Species." *Endocrinology* 156(4): 1540–51.
- Atsumi, Yuko et al. 2011. "Onset of Quiescence Following p53 Mediated down-Regulation of H2AX in Normal Cells." *PLoS ONE* 6(8).
- Atsumi et. al. 2015. "ATM and SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient H2AX Foci Formation." *Cell Reports* 13(12): 2728–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.054>.
- Balkwill, Frances R, Melania Capasso, and Thorsten Hagemann. 2012. "The Tumor Microenvironment at a Glance." *Journal of Cell Science* 125(23): 5591–96.
- Barton, Michael B, Michael Frommer, and Jesmin Shafiq. 2006. "Role of Radiotherapy in Cancer Control in Low-Income and Middle-Income Countries." *The Lancet. Oncology* 7(7): 584–95.
- Baskar, Rajamanickam et al. 2014. "Biological Response of Cancer Cells to Radiation Treatment." *Frontiers in molecular biosciences* 1(November): 24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988165> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4429645>.
- Baskar, Rajamanickam, Kuo Ann Lee, Richard Yeo, and Kheng-Wei Yeoh. 2012. "Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions." *International journal of medical sciences* 9(3): 193–99.
- Bedford, Joel S. 1991. "Sublethal Damage, Potentially Lethal Damage, and Chromosomal Aberrations in Mammalian Cells Exposed to Ionizing Radiations." *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 21(6): 1457–69.
- Bergonié, J, and L Tribondeau. 1959. "Interpretation of Some Results of Radiotherapy and an Attempt at Determining a Logical Technique of Treatment." *Radiation Research* 11(4): 587.
- Birben, Esra et al. 2012. "Oxidative Stress and Antioxidant Defense." *WAO Journal* 5(January): 9–19.
- Bray, Freddie, Jian Song Ren, Eric Masuyer, and Jacques Ferlay. 2013. "Global Estimates of Cancer Prevalence for 27 Sites in the Adult Population in 2008." *International*

- Journal of Cancer* 132(5): 1133–45.
- Bridges, Bryn A. 2005. "Error-Prone DNA Repair and Translesion Synthesis: Focus on the Replication Fork." *DNA Repair* 4(5): 618–34.
- Brooks, Michael D., Monika L. Burness, and Max S. Wicha. 2015. "Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer." *Cell Stem Cell* 17(3): 260–71.
- Bryan, Holly K., Adedamola Olayanju, Christopher E. Goldring, and B. Kevin Park. 2013. "The Nrf2 Cell Defence Pathway: Keap1-Dependent and -Independent Mechanisms of Regulation." *Biochemical Pharmacology* 85(6): 705–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.016>.
- Burney, Samar et al. 1999. "The Chemistry of DNA Damage from Nitric Oxide and Peroxynitrite." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424(1–2): 37–49.
- Buscombe, John, and Shaunak Navalkisoor. 2012. "CME Nuclear Medicine." 12(4): 381–86.
- Cadet, Jean, M Berger, Thierry Douki, and Jean-Luc Ravanat. 1997. "Oxidative Damage to DNA: Formation, Measurement, and Biological Significance." *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 131: 1–87.
- Cengic, Nezih et al. 2005. "A Novel Therapeutic Strategy for Medullary Thyroid Cancer Based on Radioiodine Therapy Following Tissue-Specific Sodium Iodide Symporter Gene Expression." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90(8): 4457–64.
- Chen, Fei et al. 2015. "New Horizons in Tumor Microenvironment Biology: Challenges and Opportunities." *BMC medicine* 13: 45.
- Cleary, James., Hellen. Gelband, and Judith. Wagner. 2015. "Cancer: Disease Control Priorities." *Disease Control Priorities 3rd Edition*: 1–363. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343628/pdf/Bookshelf\\_NBK343628.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK343628/pdf/Bookshelf_NBK343628.pdf).
- Coller, Hilary A., Liyun Sang, and James M. Roberts. 2006. "A New Description of Cellular Quiescence." *PLoS Biology* 4(3): 0329–49.
- Dadachova, E., B. Bouzahzah, L. S. Zuckier, and R. G. Pestell. 2002. "Rhenium-188 as an Alternative to Iodine-131 for Treatment of Breast Tumors Expressing the Sodium/iodide Symporter (NIS)." *Nuclear Medicine and Biology* 29(1): 13–18.
- Dadachova, Ekaterina, and Nancy Carrasco. 2004. "The Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter (NIS): Imaging and Therapeutic Applications." *Seminars in Nuclear Medicine* 34(1): 23–31.
- Dai, G, O Levy, and N Carrasco. 1996. "Cloning and Characterization of the Thyroid Iodide Transporter." *Nature* 379(6564): 458–60.
- Dai, Jiawen, Koji Itahana, and Rajamanickam Baskar. 2015. "Quiescence Does Not Affect

- p53 and Stress Response by Irradiation in Human Lung Fibroblasts." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458(1): 104–9.
- Daicoviciu, Doina. "IODIDE EXCESS EXERTS OXIDATIVE STRESS IN SOME TARGET TISSUES OF THE THYROID HORMONES." (13): 1–28.
- Daignan-Fornier, B, and I Sagot. 2011. "Proliferation/quiescence: The Controversial 'aller-Retour.'" *Cell Div* 6(1): 10.
- Daignan-Fornier, Bertrand, and Isabelle Sagot. 2011. "Proliferation/Quiescence: When to Start? Where to Stop? What to Stock?" *Cell division* 6(1): 20.
- Darrouzet, Elisabeth et al. 2014. "The Sodium/iodide Symporter: State of the Art of Its Molecular Characterization." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1838(1 PARTB): 244–53.
- Dohán, Orsolya et al. 2003. "The Sodium/iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance." *Endocrine Reviews* 24(1): 48–77.
- Dohán, Orsolya, and Nancy Carrasco. 2003. "Advances in Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter (NIS) Research in the Thyroid and beyond." *Molecular and Cellular Endocrinology* 213(1): 59–70.
- Eglon, Marc, Barry Mcgrath, and Timothy O Brien. 2010. "Advanced Protocols in Oxidative Stress II." *Business* 594(25): 395–408. <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-411-1>.
- Eskandari, Sepehr et al. 1997. "Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> Symporter. Mechanism, Stoichiometry, and Specificity." *Journal of Biological Chemistry* 272(43): 27230–38.
- Fairbairn, Daryl W., Peggy L. Olive, and Kim L. O'Neill. 1995. "The Comet Assay: A Comprehensive Review." *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 339(1): 37–59.
- Ferlay, Jacques et al. 2015. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012." *International Journal of Cancer* 136(5): E359–86.
- Forman, Henry Jay et al. 2015. "Even Free Radicals Should Follow Some Rules: A Guide to Free Radical Research Terminology and Methodology." *Free Radical Biology and Medicine* 78: 233–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.504>.
- Fröhlich, Eleonore, Peter Brossart, and Richard Wahl. 2009. "Induction of Iodide Uptake in Transformed Thyrocytes: A Compound Screening in Cell Lines." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 36(5): 780–90.
- Haber, A. H., and B. E. Rothstein. 1969. "Radiosensitivity and Rate of Cell Division: 'Law of Bergonie and Tribondeau.'" *Science* 163(3873): 1338–39.
- Herskind, C. 1988. "Variable Protection by OH Scavengers against Radiation-Induced

- Inactivation of Isolated Transcriptionally Active Chromatin: The Influence of Secondary Radicals When DNA Is Irradiated with Low LET Radiation in Pure , Dilute Aqueous Solution OH Radicals Pr.” 41: 28–41.
- Huerta, Sergio et al. 2010. “In Vitro and in Vivo Radiosensitization of Colorectal Cancer HT-29 Cells by the Smac Mimetic JP-1201.” *Surgery* 148(2): 346–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2010.05.006>.
- Ivan, Mircea, and Xin Huang. 2014. 772 Tumor Microenvironment and Cellular Stress *Tumor Microenvironment and Cellular Stress*.
- Ivashkevich, Alesia et al. 2012. “Use of the  $\gamma$ -H2AX Assay to Monitor DNA Damage and Repair in Translational Cancer Research.” *Cancer Letters* 327(1–2): 123–33.
- Joiner, Michael. 2009. “Basic Clinical Radiobiology Edited by.” : 375.
- Junttila, Melissa R., and Frederic J. de Sauvage. 2013. “Influence of Tumour Micro-Environment Heterogeneity on Therapeutic Response.” *Nature* 501(7467): 346–54.
- Kalyanaraman, Balaraman et al. 2012. “Measuring Reactive Oxygen and Nitrogen Species with Fluorescent Probes: Challenges and Limitations.” *Free Radical Biology and Medicine* 52(1): 1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>.
- Kim, Seung Hoo et al. 2008. “Tumor-Targeted Radionuclide Imaging and Therapy Based on Human Sodium Iodide Symporter Gene Driven by a Modified Telomerase Reverse Transcriptase Promoter.” *Human gene therapy* 19(9): 951–57.
- Kinner, Andrea, Wenqi Wu, Christian Staudt, and George Iliakis. 2008. “Gamma-H2AX in Recognition and Signaling of DNA Double-Strand Breaks in the Context of Chromatin.” *Nucleic acids research* 36(17): 5678–94.
- Klutzn, Kathrin et al. 2011. “Sodium Iodide Symporter (NIS)-Mediated Radionuclide ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ) Therapy of Liver Cancer After Transcriptionally Targeted Intratumoral *in Vivo* NIS Gene Delivery.” *Human Gene Therapy* 22(11): 1403–12.
- Kogai, Takahiko, and Gregory a Brent. 2013. “The Sodium Iodide Symporter (NIS): Regulation and Approchesto Targeting for Cancer Therapeutics.” 135(3): 355–70.
- Königsberg, Mina. 2007. “Nrf2: La Historia de Un Nuevo Factor de Transcripción Que Responde a Estrés Oxidativo .” *Reb* 26(1): 18–25.
- Kues, W. A. et al. 2000. “Cell Cycle Synchronization of Porcine Fetal Fibroblasts: Effects of Serum Deprivation and Reversible Cell Cycle Inhibitors.” *Biology of Reproduction* 62(2): 412–19.
- Kwak, Mi-Kyoung, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto, and Thomas W Kensler. 2002. “Enhanced Expression of the Transcription Factor Nrf2 by Cancer Chemopreventive Agents: Role of Antioxidant Response Element-like Sequences in the nrf2 Promoter.” *Molecular and cellular biology* 22(9): 2883–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940647><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC133753>.

- De La Vieja, a, O Dohan, O Levy, and N Carrasco. 2000. "Molecular Analysis of the Sodium/Iodide Symporter: Impact on Thyroid and Extrathyroid Pathophysiology." *Physiological reviews* 80(3): 1083–1105.
- Lakshmanan, Aparna, Daniel Scarberry, Daniel H. Shen, and Sissy M. Jhiang. 2014. "Modulation of Sodium Iodide Symporter in Thyroid Cancer." *Hormones and Cancer* 5(6): 363–73.
- Lau, Alexandria et al. 2008. "Dual Roles of Nrf2 in Cancer." *Pharmacological Research* 58(5–6): 262–70.
- Lee, Saeloom et al. 2012. "An Effective Strategy for Increasing the Radiosensitivity of Human Lung Cancer Cells by Blocking Nrf2-Dependent Antioxidant Responses." *Free Radical Biology and Medicine* 53(4): 807–16.
- Lindencrona, U., M. Nilsson, and E. Forssell-Aronsson. 2001. "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* 28(1): 41–50.
- Liu, Ren Shyan et al. 2009. "Specific Activation of Sodium Iodide Symporter Gene in Hepatoma Using Alpha-Fetoprotein Promoter Combined with Hepatitis B Virus Enhancer (EIIAPA)." *Anticancer Research* 29(1): 211–21.
- Lloyd, D. 1987. "Biochemistry of the Cell Cycle." *The Biochemical journal* 242(2): 313–21.
- Luk, Catherine K., Peter C. Keng, and Robert M. Sutherland. 1985. "Regrowth and Radiation Sensitivity off Quiescent Cells Isolated from EMT6/Ro-Fed Plateau Monolayers." *Cancer Research* 45(3): 1020–25.
- Maier, Patrick, Linda Hartmann, Frederik Wenz, and Carsten Herskind. 2016. "Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization." *International Journal of Molecular Sciences* 17(1).
- Masunaga, Shin-ichiro, Koji Ono, and Mitsuyuki Abe. 1991. "A Method for the Selective Measurement of the Radiosensitivity of Quiescent Cells in Solid Tumors: Combination of Immunofluorescence Staining to BrdU and Micronucleus Assay." *Radiation Research* 125(3): 243–47. <http://www.jstor.org/stable/3578105>.
- Matt, Sonja, and Thomas G. Hofmann. 2016. "The DNA Damage-Induced Cell Death Response: A Roadmap to Kill Cancer Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(15): 2829–50.
- McDonald, J. Tyson et al. 2010. "Ionizing Radiation Activates the Nrf2 Antioxidant Response." *Cancer Research* 70(21): 8886–95.
- McMahon, Michael et al. 2004. "Redox-Regulated Turnover of Nrf2 Is Determined by at Least Two Separate Protein Domains, the Redox-Sensitive Neh2 Degron and the Redox-Insensitive Neh6 Degron." *Journal of Biological Chemistry* 279(30): 31556–67.
- Mendonca, M S, A Rodriguez, and E L Alpen. 1989. "Quiescence in 9L Cells and Correlation with Radiosensitivity and PLD Repair." *Radiation Research* 117(3): 433–

47. <http://www.jstor.org/stable/3577349>.
- Micali, Salvatore et al. 2014. "Sodium Iodide Symporter (NIS) in Extrathyroidal Malignancies: Focus on Breast and Urological Cancer." *BMC cancer* 14(1): 303. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/14/303>.
- Mladenov, Emil, and George Iliakis. 2011. "Induction and Repair of DNA Double Strand Breaks: The Increasing Spectrum of Non-Homologous End Joining Pathways." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1–2): 61–72.
- Mohanty, Anwoy Kumar, Aniruddha Datta, and Vijayanagaram Venkatraj. 2014. "A Model for Cancer Tissue Heterogeneity." *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 61(3): 966–74.
- Nguyen, Truyen, Paul Nioi, and Cecil B. Pickett. 2009. "The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress." *Journal of Biological Chemistry* 284(20): 13291–95.
- Olive, Peggy L. 2004. "Detection of {DNA} Damage in Individual Cells by Analysis of Histone {H2AX} Phosphorylation." *Cytometry, 4th Edition: New Developments* 75: 355–73. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X04750141>.
- Olive, Peggy L, and Judit P Banáth. 2006. "The Comet Assay: A Method to Measure DNA Damage in Individual Cells." *Nat. Protoc.* 1(1): 23–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406208>.
- Pellegriti, G et al. 2013. "Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors." *J Cancer Epidemiol* 2013: 965212. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23737785](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23737785).
- Perron, B., A. M. Rodriguez, G. Leblanc, and T. Pourcher. 2001. "Cloning of the Mouse Sodium Iodide Symporter and Its Expression in the Mammary Gland and Other Tissues." *Journal of Endocrinology* 170(1): 185–96.
- Pesce, Liuska, and Peter Kopp. 2014. "Iodide Transport: Implications for Health and Disease." *International Journal of Pediatric Endocrinology* 2014(1): 8. <http://ijpeonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1687-9856-2014-8>.
- Pham-Huy, Lien Ai, Hua He, and Chuong Pham-Huy. 2008. "Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health." *International journal of biomedical science : IJBS* 4(2): 89–96.
- Polo, S, and S Jackson. 2011. "Dynamics of DNA Damage Response Proteins at DNA Breaks: A Focus on Protein Modifications." *Genes & development* 25(5): 409–33. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3049283&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Prasad, R. et al. 2011. "A Review of Recent Experiments on Step-to-Step 'hand-Off' of the DNA Intermediates in Mammalian Base Excision Repair Pathways." *Molecular Biology*

45(4): 536–50.

- Rhee, SueGoo, Tong-Shin Chang, Woojin Jeong, and Dongmin Kang. 2010. "Methods for Detection and Measurement of Hydrogen Peroxide inside and outside of Cells." *Molecules and Cells* 29(6): 539–49. <http://dx.doi.org/10.1007/s10059-010-0082-3>.
- Richard-Fiardo, Peggy et al. 2012. "Normalisation to Blood Activity Is Required for the Accurate Quantification of NAI Symporter Ectopic Expression by SPECT/CT in Individual Subjects." *PLoS ONE* 7(3): 1–9.
- Riesco-Eizaguirre, Garcilaso, and Pilar Santisteban. 2008. "Transportador de Yodo (NIS) Y Su Aplicación Diagnóstica Y Terapéutica En Diferentes Enfermedades." *Endocrinología y Nutrición* 55(3): 107–10.
- Riley, P.A. 2009. "Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation." *International Journal of Radiation Biology* 65(1): 27–33.
- Rodríguez, Josefa A., Lina M. Martínez, Nataly Cruz Y Alba L. Cómbita. 2014. "Terapia Génica Para El Tratamiento Del Cáncer." *Colombiana, Revista* 18(1): 27–40.
- Rogakou, E.P. et al. 1998. "Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." *The Journal of Biological Chemistry* 273(10): 5858–68.
- Rutherford, R Bruce, and Russell Ross. 1976. "AND FACTORS STIMULATE SERUM SMOOTH IN MUSCLE PLASMA QUIESCENT TO PROLIFERATE Preparation O F Sera F R O M Whole Blood and." 69(14): 196–203.
- Van Sande, J. et al. 2003. "Anion Selectivity by the Sodium Iodide Symporter." *Endocrinology* 144(1): 247–52.
- Selzer, Edgar, and Alexandra Hebar. 2012. "Basic Principles of Molecular Effects of Irradiation." : 47–54.
- Shackleton, Mark, Elsa Quintana, Eric R. Fearon, and Sean J. Morrison. 2009. "Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution." *Cell* 138(5): 822–29.
- Sheridan, Cormac. 2011. "Gene Therapy Finds Its Niche." *Nature biotechnology* 29(2): 121–28.
- Siegel, Rebecca et al. 2013. "Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2012." 0(0): 1–22.
- Smanik, P a et al. 1996. "Cloning of the Human Sodium Iodide Symporter." *Biochemical and biophysical research communications* 226(2): 339–45.
- Spitzweg, C, and J C Morris. 2002. "The Sodium Iodide Symporter: Its Pathophysiological and Therapeutic Implications." *Clin Endocrinol (Oxf)*. 57: 559–74.
- Spitzweg, Christine et al. 2003. "Retinoic Acid-Induced Stimulation of Sodium Iodide



- Symporter Expression and Cytotoxicity of Radioiodine in Prostate Cancer Cells.” *Endocrinology* 144(8): 3423–32.
- Stewart, Daniel et al. 2003. “Degradation of Transcription Factor Nrf2 via the Ubiquitin-Proteasome Pathway and Stabilization by Cadmium.” *Journal of Biological Chemistry* 278(4): 2396–2402.
- Sugiyama, Hiroshi et al. 1994. “Chemistry of Thermal Degradation of Abasic Sites in DNA. Mechanistic Investigation on Thermal DNA Strand Cleavage of Alkylated DNA.” *Chemical Research in Toxicology* 7(5): 673–83.
- Sun, Zheng, Shirley Zhang, Jefferson Y Chan, and Donna D Zhang. 2007. “Keap1 Controls Postinduction Repression of the Nrf2-Mediated Antioxidant Response by Escorting Nuclear Export of Nrf2.” *Molecular and cellular biology* 27(18): 6334–49. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2099624&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sweigert, S E, K Eguchi-Kasai, R L Warters, and L a Dethlefsen. 1989. “Repair of DNA Single- and Double-Strand Breaks in Proliferating and Quiescent Murine Tumor Cells.” *International journal of radiation biology* 56(3): 253–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570811>.
- T. Tanaka\*, †, M. Kajstura\*, H. D. Halicka\*, F. Traganos\*, and and Z. Darzynkiewicz\*. 2013. “Constitutive Histone H2AX Phosphorylation and ATM Activation Are Strongly Amplified during Mitogenic Stimulation of Lymphocytes.” *Cell Prolif* 40(1): 1–17.
- Therapy, Radiation, and Because Cdks. 2014. “The Science Behind Radiation Therapy.” *American Cancer society*: 15.
- TSUKIMOTO, Mitsutoshi, Nana TAMAISHI, Takujiro HOMMA, and Shuji KOJIMA. 2010. “Low-Dose Gamma-Ray Irradiation Induces Translocation of Nrf2 Into Nuclear in Mouse Macrophage RAW264.7 Cells.” *Journal of Radiation Research* 51(3): 349–53.
- Venezia, Teresa A et al. 2004. “Molecular Signatures of Proliferation and Quiescence in Hematopoietic Stem Cells.” 2(10).
- Vogin, Guillaume, and Nicolas Foray. 2013. “The Law of Bergonié and Tribondeau: A Nice Formula for a First Approximation.” *International Journal of Radiation Biology* 89(1): 2–8.
- Vuillez, Jean-philippe. 2005. “J . P . Vuillez Radiothérapie Métabolique : État et Perspectives . Radiothérapie Métabolique : État et Perspectives.” 29: 247–56.
- Wagner, Louis K, Patricia J Eifel, and Richard A Geise. 1994. “Potential Biological Effects Following High X-Ray Dose Interventional Procedures.” *JVIR. Journal of Vascular and Interventional Radiology* 5(1): 71–84.
- Wapnir, Irene L. et al. 2003. “Immunohistochemical Profile of the Sodium/iodide Symporter in Thyroid, Breast, and Other Carcinomas Using High Density Tissue Microarrays and Conventional Sections.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(4):

1880–88.

- West, Catharine M, and Gillian C Barnett. 2011. "Genetics and Genomics of Radiotherapy Toxicity: Towards Prediction." *Genome medicine* 3(8): 52.
- Wilson, K.M; Keng, P.C. 1989. "Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Quiescent and Proliferating Human Tumor Cells in Vitro." (Radford 1986).
- Yao, Guang. 2014. "Modelling Mammalian Cellular Quiescence." *Interface focus* 4(3): 20130074.
- Yonekura, Shin-Ichiro, Nobuya Nakamura, Shuji Yonei, and Qiu-Mei Zhang-Akiyama. 2009. "Generation, Biological Consequences and Repair Mechanisms of Cytosine Deamination in DNA." *Journal of radiation research* 50(1): 19–26.
- Yunta, Eduardo Rodríguez. 2003. "TERAPIA GÉNICA Y PRINCIPIOS ÉTICOS." : 69–79.
- Zellmer, Victoria R, and Siyuan Zhang. 2014. "Evolving Concepts of Tumor Heterogeneity." *Cell & bioscience* 4(1): 69.
- Zhou, Suna et al. 2013. "Nrf2 Is a Potential Therapeutic Target in Radioresistance in Human Cancer." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 88(3): 706–15.