

Tesis de Posgrado

Participación de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la transformación celular y en la modulación de la radiosensibilidad

Policastro, Lucía Laura

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Policastro, Lucía Laura. (2002). Participación de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la transformación celular y en la modulación de la radiosensibilidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3543_Policastro.pdf

Cita tipo Chicago:

Policastro, Lucía Laura. "Participación de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la transformación celular y en la modulación de la radiosensibilidad". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3543_Policastro.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**PARTICIPACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS
DEL OXIGENO Y DEL NITROGENO EN LA TRANSFORMACION
CELULAR Y EN LA MODULACION DE LA RADIOSENSIBILIDAD**

Autor: Lic. Lucía Laura Policastro

Director: Dra. Hebe Alicia Durán

**Lugar de trabajo: Comisión Nacional de Energía Atómica
Departamento de Radiobiología**

**Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas
2002**

Nº 3543

A MIS PADRES

Quisiera citar unas palabras del Dr René Favalaro, que más allá de sus antecedentes académicos, siempre estará en nuestra memoria por sus enseñanzas nacidas de su profunda vocación docente. Así, y dirigiéndose a las nuevas generaciones afirmaba que,

"...una de las cosas que siempre traté de inculcar a los jóvenes es que los logros son hijos del esfuerzo. En esta sociedad tan superficial, yo diría light, en donde parece ser que el esfuerzo es algo secundario -insisto- el trabajo sacrificado y la entrega son necesarios. Nunca creí en las genialidades, sí en el trabajo cotidiano intenso..."

Agradecimientos

Hacer una tesis es una parte muy importante en la formación de un científico, he tenido la suerte de poder compartir esta etapa junto a la Dra Hebe Durán, mi directora. Quiero dedicarle mi agradecimiento de manera muy especial no sólo por haberme guiado en el aspecto académico que una tesis implica, sino por haber confiado plenamente en mi, por mostrarme que nunca hay que abandonar los sueños, que siempre hay que sostener los ideales más allá de la adversidad de las circunstancias, y por sobre todo por haberse convertido en una de las personas guías de mi vida.

A la Dra Beatriz Molinari, por su apoyo constante, por su confianza y por sus consejos que muchas veces simplificaron panoramas que parecían oscuros y complejos.

A la Dra Amanda Schwint, por su apoyo constante, por su sensibilidad y por la calidez humana brindada durante estos años.

Al Dr Mario Pisarev por haberme dado la oportunidad de trabajar en el Departamento de Radiobiología y por su apoyo e interés en mi trabajo.

Al Dr Andrés Kreiner por sus enseñanzas y discusiones en el campo de la matemática y de la física, que me ayudaron a entender mejor los procesos radiobiológicos, pero especialmente por mostrarme un increíble ejemplo de perseverancia y optimismo.

A la Dra Mariel Itoiz y al Dr Rómulo Cabrini por su buena predisposición ante cualquier consulta o pedido de consejos.

A la Universidad de Buenos Aires, por haberme dado la oportunidad de formarme de forma gratuita y a la que espero poder retribuir con mi trabajo futuro.

A la Comisión Nacional de Energía Atómica, por haberme dado la oportunidad de haber realizado mi primer trabajo de investigación.

A los Dres Ramón Pizarro, Rubén Fernández y Cristina Costa quienes me han ayudado a resolver muchos problemas, por mostrar interés y preocupación por mí en muchas oportunidades y por alentarme en la finalización de este trabajo.

A Fernando Larcher por su tiempo de enseñanzas y discusiones desinteresadas en sus cortos pasos anuales por Buenos Aires y por hacer que en este momento esté escribiendo estos agradecimientos a 12.000 km de distancia.

Al Dr Vincent Favoudon y al Dr Yann Henry por haberme permitido realizar parte de este trabajo en su laboratorio y al Dr Alejandro Mazal por su colaboración en los estudios radiobiológicos.

A los Carlos Fitzimons por las discusiones de los resultados, su buena predisposición y por la paciencia cuando las células PB no crecían.

Al Dr Osvaldo Podhajcer por abrirme las puertas de su laboratorio y por su valiosa y desinteresada ayuda y por ser un ejemplo de "supervivencia elegida con alto nivel académico" en el arduo sistema científico argentino.

Al Dr Fernando Pitossi por haberme escuchado en aquel curso de tópicos y haberme brindado su ayuda para comenzar a darle forma y realidad a algunas proyectos.

A Patricia Blanco por su colaboración y cooperación en la finalización de este trabajo y por haberme introducido en las técnicas de biología molecular.

Al Dr Juan José Poderoso por las amenas y porque no decirlo divertidas discusiones científicas sobre "su óxido nítrico y mi peróxido de hidrógeno" y por haberme socorrido en algunos momentos de desesperación.

A los chicos del laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Francisco y Natalia por toda su colaboración y por hacerme sentir muy cómoda en su laboratorio. A Paola por todos los momentos parisinos compartidos

A Juan Schuff por su siempre buena predisposición y paciencia en enseñarme estadística.

Al Dr Claudio Conti por su aporte en la discusión de este trabajo.

A Paola Rojas, con quien pude lograr una profunda amistad y de quien me siento muy cerca a pesar de la distancia.

A Mónica por su constante preocupación y su gran espíritu de colaboración.

A Martín, Alejandro, Alejandra y Gaby por su amistad, por su calidez y por tener siempre la mejor onda!

A Eugenia por socorrerme a en mis pedidos de último momento.

A León, Laura, Silvina, Alfonsina, Verónica, María, Giselle, Omar, Guillermo y David por el buen compañerismo y predisposición en el trabajo cotidiano.

A todos aquellos que me acompañaron en las noches de irradiación con Tandar, odiadas en su momento y ahora recordadas con cariño.

A Silvia, Florencia y Hernán, mis amigos de la facu, con quienes sigo compartiendo muy lindos momentos, pero ahora inclusive en fiestitas de cumpleaños de los que son ahora mis sobrinitos postizos. Y aquellos que el destino separó, pero que han dejado una huella importante en mi vida.

A Ushi, a Vero y Maru, por nuestros " vulnerables", por esos encuentros mágicos renovadores del alma y por demostrarme que a veces la vida te cruza, detecta y te une en momentos especiales, no precisamente por casualidad.

A Laura, Analía y Cecilia, mis amigas de siempre, por todas los momentos lindos y aquellos muy difíciles compartidos, por ser las poseedoras de los secretos más profundos.

A mi familia,

A mis hermanas, Vero y Ceci, por quererme, por ayudarme, enojarse y zamarrearne cuando es necesario, por sostenerme y acompañarme siempre.

A mis padres, por su amor, su ayuda constante e incondicional, por el ejemplo de esfuerzo y constancia, por haber promovido y priorizado la educación y porque siempre están a mi lado, acompañándome. A la vida, por haberme dado la mejor familia del mundo!

INDICE

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION GENERAL	4
Cáncer. Conceptos generales	5
Modelos de estudio	7
Tratamientos actuales y nuevos enfoques terapéuticos	9

CAPITULO I

ESTUDIO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO Y DEL NITROGENO EN LA TRANSFORMACION CELULAR

1. 1 INTRODUCCION

1.1.1 La célula y el estrés oxidativo: las especies reactivas del oxígeno	10
1.1.1.1 El sistema de defensa antioxidante	13
1.1.1.2 Las especies reactivas del oxígeno y su vinculación con el cáncer	16
1.1.2 Las especies reactivas del nitrógeno (RNS)	19
1.1.2.1 Fuentes celulares.	20
1.1.2.2 Las especies reactivas del nitrógeno y su vinculación con el cáncer	21
1.1.3 Objetivos	23

1.2 MATERIALES Y METODOS

1.2.1 Modelos de estudio <i>in vitro</i>	24
1.2.1.1 Líneas celulares	24

Líneas derivadas de epidermis de ratones de la cepa SENCAR	
Líneas derivadas de epidermis de ratones C57BL/6N	
Líneas derivadas de epitelio mamario humano	
Líneas celulares de diversos orígenes	
1.2.1.2 Condiciones de cultivo	26
1.2.2 Caracterización de la proliferación y de la tumorigenicidad de las líneas celulares	26
2.2.2.1 Ensayo clonogénico	27
2.2.2.2 Curvas de crecimiento	27
2.2.2.3 Ensayo de formación de colonias en agar blando	28
2.2.2.4 Test de tumorigenicidad	28
1.2.3 Evaluación del sistema antioxidante y de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en las líneas celulares	29
1.2.3.1 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes	29
1.2.3.1.1 Obtención de las muestras	29
1.2.3.1.2 Determinación de actividades enzimáticas	29
Superóxido dimutasa	
Catalasa	
Glutatión peroxidasa	
1.2.3.2 Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno	31
1.2.3.3 Determinación de la producción de anión superóxido	31
1.2.3.4 Evaluación de las especies reactivas del nitrógeno	
Determinación de la producción de nitritos	32
1.2.4 Modulación de la producción de peróxido de hidrógeno y evaluación de la proliferación celular	32
1.2.4.1 Tratamientos con catalasa	32
1.2.4.2 Evaluación de proliferación	32
Ensayo de MTT	
Conteo celular	
Determinación inmunohistoquímica de la incorporación de bromodeoxiuridina	

1.2.4.3 Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en función de la concentración de catalasa	33
1.2.4.4 Recuperación de los tratamientos con catalasa	33
1.2.4.5 Evaluación de apoptosis	34
1.2.5 Modelos de estudio <i>in vivo</i>	
Animales	34
1.2.6 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno <i>in vivo</i> y evaluación del crecimiento tumoral	34
1.2.6.1 Experimentos con ratones nude	34
1.2.6.2 Experimentos con ratones SENCAR	35
1.2.7 Transfección del cDNA de la catalasa humana en las células MCF-7	
1.2.7.1 Subclonado del cDNA de la catalasa humana en un vector de expresión en células eucariotas.	36
Transformación de bacterias competentes	
Selección de los clones positivos y obtención del cDNA de la catalasa humana.	
Subclonado del vector de expresión eucariota	
1.2.7.2 Transfección y selección de las células MCF-7	38
1.2.7.3 Determinación de la actividad de catalasa en las células transfectadas.	38
1.2.7.4 Caracterización de las células tranfectadas	38
1.2.8 Estudio de los posibles mecanismos involucrados en la inhibición de la proliferación mediante el secuestro del peróxido de hidrógeno	39
1.2.8.1 Determinación de la producción de nitritos en células tratadas con catalasa	39
1.2.8.2 Experimentos de inhibición de la NOS	39
1.2.8.3 Experimentos de inhibición de la guanilato ciclasa	39
1.2.8.4 Determinación de la producción de nitritos y de la proliferación en presencia de L-NAME y de ODQ en las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana	40

1.2.9 Análisis estadístico	40
----------------------------	----

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterización de la proliferación y la malignidad de las líneas celulares	41
1.3.1.1 Curvas de crecimiento	41
1.3.1.2 Ensayo clonogénico y formación de colonias en agar blando	43
1.3.1.3 Caracterización de la capacidad tumorigénica	43
1.3.2 Caracterización del sistema antioxidante y de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en líneas celulares con diferente grado de malignidad	45
1.3.2.1 Evaluación de los niveles de enzimas antioxidantes	45
1.3.2.1.1 Evaluación de enzimas antioxidantes en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57.	
Antecedentes experimentales	45
1.3.2.1.2 Evaluación de enzimas antioxidantes en las líneas celulares HBL-100 y MCF-7	46
1.3.2.2 Evaluación de los niveles de peróxido de hidrógeno	46
1.3.2.3 Evaluación de la producción de anión superóxido	48
1.3.2.4 Evaluación de la producción de óxido nítrico	49
1.3.3 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno y evaluación de la proliferación celular	49
1.3.3.1 Tratamientos de las líneas celulares con catalasa y evaluación de la proliferación celular	49
1.3.3.2 Recuperación de la proliferación celular	52
1.3.3.3 Concentración de peróxido de hidrógeno en función de la dosis de catalasa	53
1.3.3.4 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno e inhibición de la proliferación en otras líneas celulares	54
1.3.3.5 Determinación de apoptosis	54

1.3.4 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno <i>in vivo</i> y evaluación del crecimiento tumoral	56
1.3.4.1 Experimento con ratones nude	56
1.3.4.2 Experimento de carcinogénesis en ratones SENCAR	56
1.3.5 Modulación de la proliferación celular por transfección del cDNA de la catalasa humana	59
1.3.5.1 Evaluación de la actividad de catalasa de los clones seleccionados	59
1.3.5.2 Ensayo de clonogenicidad, curva de crecimiento e incorporación de bromodeoxiuridina	60
1.3.5.3 Crecimiento de colonias en agar blando	61
1.3.6 Posibles vías involucradas en la inhibición de la proliferación celular por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno	62
1.3.6.1 Caracterización de la producción de óxido nítrico en las células tratadas con catalasa	62
1.3.6.2 Tratamientos de las células con un inhibidor de la NOS	63
1.3.6.3 Tratamientos con un inhibidor de la guanilato ciclasa	65
1.3.6.4 Caracterización de la producción de óxido nítrico, evaluación de la proliferación por tratamientos con un inhibidor de la NOS y de la guanilato ciclasa en las células transfectadas con el cDNA de la catalasa.	67
1.4 DISCUSION	70

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LA RADIOSENSIBILIDAD INTRÍNSECA Y DE SU POSIBLE MODULACIÓN SELECTIVA EN FUNCIÓN DE LA MALIGNIDAD CELULAR

2.1 INTRODUCCION

2.1.1 Origen y evolución de la radioterapia	82
2.1.2 Clasificación de las radiaciones ionizantes	83
2.1.2.1 Radiaciones electromagnéticas	83
2.1.2.2 Radiaciones paticuladas	84
Haces de protones y de iones pesados	
Haces de electrones	
Haces de neutrones	
2.1.3 Interacción de las radiaciones ionizantes con la materia	85
2.1.4 Dosis, tasa de dosis y distribución de dosis de las radiaciones ionizantes	85
2.1.4.1 Distribución de la dosis para los distintos tipos de radiaciones ionizantes.	87
Radiaciones electromagnéticas	87
Radiaciones particuladas	88
Haces de protones y de iones pesados	
Haces de electrones	
Haces de neutrones	
2.1.5 Acción directa e indirecta de la radiación	89
2.1.6 Modelos de estudio	91
2.6.1 Modelos de curvas de sobrevida	91
2.6.2 Modelos matemáticos y teoría del impacto y del blanco	93
2.1.7 Radiosensibilizadores	96

2.1.7.1 Generalidades	96
2.1.7.2 Especies reactivas del nitrógeno y su potencial capacidad radiosensibilizadora	96
2.1.7 Objetivos	98
 2.2 MATERIALES Y METODOS	
2.2.1 Modelos de estudio	99
2.2.1.1 Líneas celulares	99
2.2.1.2 Curvas de sobrevida	99
2.2.1.3 Modelos <i>in vivo</i>	99
2.2.2 Estudio de la radiosensibilidad intrínseca de las líneas celulares	99
2.2.2.1 Irradiaciones con gamma	99
Condiciones experimentales	
Fuentes de radiación	
2.2.2.2 Irradiaciones con haces de protones y de litio	100
Condiciones experimentales	
Fuentes de irradiación	
2.2.3 Modulación de la radiosensibilidad. Tratamientos con dadores de óxido nítrico	101
2.2.3.1 Experimentos <i>in vitro</i>	101
Irradiaciones con gamma	
Irradiaciones con haces de protones	
2.2.3.2 Experimentos <i>in vivo</i>	102
2.2.4 Análisis estadístico	102

2.3 RESULTADOS	
2.3.1 Caracterización de la radiosensibilidad intrínseca de las líneas celulares con distinto grado de malignidad	103
2.3.1.1Irradiaciones con rayos gamma	103
2.3.1.2Irradiaciones con haces de protones y de litio	106
2.3.2 Modulación de la radiosensibilidad por óxido nítrico	113
2.3.2.1 Evaluación del efecto de un dador de óxido nítrico <i>in vitro</i>	113
Irradiación gamma	
Irradiación con haces de protones	
2.3.2.2 Evaluación del efecto de un dador de óxido nítrico <i>in vivo</i>	119
Irradiación gamma	
Irradiación con haces de protones	
2.4 DISCUSION	121
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	132
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	135
ABREVIATURAS	140
REFERENCIAS	142

RESUMEN

RESUMEN

Las poblaciones celulares en un organismo están estrictamente controladas por el balance de señales complejas que estimulan o inhiben la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células. Existen evidencias experimentales que sugieren que las especies reactivas del oxígeno están involucradas en el desarrollo del cáncer. El primer objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de las especies reactivas del oxígeno en los mecanismos de proliferación y transformación celular y modular los niveles de estas especies a fin de inhibir la proliferación y de esta forma controlar el crecimiento tumoral. Los resultados demostraron que existe un aumento de la actividad de superóxido dismutasa y una disminución de los niveles de catalasa y glutatión peroxidasa, enzimas disipadoras de peróxido de hidrógeno, en función de la malignidad. Este desbalance enzimático se correlacionó con aumento de la producción de peróxido de hidrógeno. La disipación de peróxido de hidrógeno de manera exógena mediante tratamientos con catalasa inhibió la proliferación en líneas celulares de diversos orígenes tisulares y de organismos diferentes, lo que sugiere que la participación del peróxido de hidrógeno en el control de la proliferación sería un fenómeno general. Por otro lado, tratamientos con catalasa inhibieron el desarrollo de tumores experimentales. En concordancia con estos resultados, se demostró que la transfección estable del cDNA de la catalasa en una línea celular tumoral humana, disminuyó la tasa de proliferación y revirtió características de fenotipo maligno. Con respecto a los mecanismos de la inhibición de proliferación por secuestro de peróxido de hidrógeno, se demostró aumento de los niveles de óxido nítrico en los tratamientos con catalasa, sugiriendo a esta especie como un posible mediador de esta vía.

Por otro lado, dado que la radioterapia constituye junto a la quimioterapia una de las principales formas de tratamiento contra el crecimiento tumoral, el segundo objetivo de esta tesis fue la caracterización de la radiosensibilidad intrínseca de líneas celulares con diferente grado de malignidad, de la respuesta celular a diferentes tipos de radiaciones ionizantes y el estudio del efecto del óxido nítrico como posible radiosensibilizador selectivo de las células tumorales. Los estudios de radiosensibilidad intrínseca demostraron un aumento de la radiorresistencia en función de la malignidad en las células tumorales de ratón evaluadas, que no se manifestó en las células de origen humano. Con respecto a las irradiaciones con haces de protones y de litio en comparación con la radiación gamma, se demostró un aumento de la eficiencia biológica relativa (RBE) en función de la transferencia lineal de energía (LET) de la radiación, que resultó consistente con los datos bibliográficos. Por otro lado, los estudios de la acción del óxido nítrico mostraron un mayor efecto radiosensibilizador en las

células con mayor capacidad tumorigénica. Este efecto podría ser explicado por el estado prooxidativo basal de las células más malignas, que potenciaría la acción de la radiación. Se demostró también la acción del óxido nítrico como radiosensibilizador en tumores experimentales.

Estos resultados sugieren la posibilidad de explorar terapias antioxidantes específicas y radiosensibilizadores selectivos para el control del crecimiento tumoral.

ABSTRACT

Cell populations in a living organism are strictly controlled by the balance of complex signaling systems, which stimulate or inhibit cell proliferation, differentiation and survival. Substantial experimental evidence suggests a role of reactive oxygen species in the development of cancer. The first aim of the present study was to evaluate the involvement of reactive oxygen species in the mechanisms of cell proliferation and transformation and to modulate the levels of these species to inhibit proliferation and thus control tumor growth. The results showed an increase in superoxide dismutase activity and a fall in the activities of H_2O_2 -detoxifying enzymes, catalase and glutathione peroxidase, as a function of malignancy. This imbalance in the antioxidant system was coupled to a rise in the levels of H_2O_2 . The exogenous removal of H_2O_2 by treatment with catalase induced an inhibition of proliferation in all the tested cell lines of different tissues from several species, suggesting that the regulation of proliferation by H_2O_2 would be a general phenomenon. Moreover, *in vivo* treatments with catalase inhibited the growth of experimental tumors. Furthermore, the rate of proliferation was inhibited and some features of malignant phenotype were reversed by a stable transfection of the cDNA of catalase in a human tumor cell line. Regarding the mechanisms of the inhibition of cell proliferation by scavenging H_2O_2 , an increase in the levels of nitric oxide by treatment with catalase was found, suggesting that nitric oxide could be a mediator of this signaling pathway.

Taking into account that radiotherapy coupled to chemotherapy is one of the main forms of treatment for cancer, the second aim of this study was to characterize the intrinsic radiosensitivity of cell lines with different degrees of malignancy, the cellular response to different types of ionizing radiation and the effect of nitric oxide as a possible selective radiosensitizer of tumor cells.

The studies of intrinsic radiosensitivity demonstrated an increase in radioresistance as a function of malignancy in the mouse tumor cells evaluated. However, this correlation was not found in the human cells tested. Regarding proton and lithium beam irradiations as compared with gamma irradiations, an increase in relative biological effectiveness (RBE) as a function of the linear energy transfer (LET) was found, which was consistent with previous reports. Furthermore, the studies of the action of nitric oxide resulted in a greater radiosensitizing effect on the more tumorigenic cells. These differential effects could be due to the basal prooxidative state of the more malignant cells that could potentiate the effect of radiation. The radiosensitizing effect of nitric oxide on experimental tumors was also demonstrated.

These results suggest the possibility of exploring specific antioxidant therapies and selective radiosensitizers for the control of tumor growth.

INTRODUCCION GENERAL

Hace 140 años, el microscopista alemán Johannes Mueller demostró que un tumor estaba formado por células, a partir de ese momento comenzó la búsqueda de las causas que estaban originando esta alteración celular. El descubrimiento realizado por Rous¹ en 1911, de que un virus era el transmisor y causante de la aparición de un crecimiento maligno en pollo y la identificación de numerosos retrovirus² con capacidad transformante durante las décadas del 50 y 60 fueron los pilares del concepto de que un tumor surge como consecuencia de un cambio genético. Howard Temin en 1971, fue quien propuso que esos genes serían formas alteradas de genes celulares normales a través de un proceso de mutación somática o rearreglo genético. En 1976, gracias al revolucionario descubrimiento de la transcriptasa reversa³ se construyó una sonda del oncogen v-src y se observó que hibridizaba con el ADN de células normales, se identificaron entonces las contrapartes normales de los oncogenes, los protooncogenes. Luego gracias a los sucesivos avances de la biología molecular y de la tecnología del ADN recombinante, se comenzaron a identificar que aquellas secuencias transformantes transportadas por los retrovirus eran formas alteradas de genes relacionados con el control del crecimiento y diferenciación celular⁴. Se comenzaron a vincular entonces a los oncogenes con componentes de vías de transducción de señales relacionadas con el control de la proliferación celular tales como proteínas quinasas, receptores de factores de crecimiento, factores de crecimiento, proteínas G y factores de transcripción. Hacia finales de los años 70, gracias al desarrollo de técnicas para introducir ADN exógeno en células eucariontes, se identificaron varios fragmentos de ADN de células cancerosas con capacidad transformante⁵. Esta metodología experimental así como la inducción de cáncer en animales por transferencia de oncogenes a través de la tecnología de animales transgénicos⁶ confirman el concepto de que la "ganancia de una función génica" puede generar la aparición de un fenotipo maligno.

La idea de que la "pérdida de función de genes" está asociada a la transformación celular surge en 1983 a partir de estudios que revelaron la alteración y pérdida de función de un gen supresor (RB) en el retinoblastoma⁷. Más tarde, en 1990 se demostró que mutaciones en el gen supresor p53 están

asociadas con una variedad de sarcomas, leucemias, cáncer de pulmón y de mama⁸. El análisis de polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y el desarrollo de la tecnología de los ratones "knock out" fueron de gran importancia para la confirmación de que las alteraciones recesivas y la consecuente pérdida de una función génica puede también provocar la aparición del fenotipo maligno. Actualmente la secuenciación del genoma humano, así como el desarrollo de nuevos enfoques de estudio como la genómica⁹ y proteómica¹⁰ funcional basada en tecnologías sumamente sofisticadas como la de "microarray" constituyen una fuente de gran potencial para el entendimiento de esta patología.

Como hemos visto, la comprensión de los mecanismos que se encuentran alterados en una patología humana está limitada y sigue los pasos de la tecnología desarrollada hasta el momento histórico en que nos encontremos. Vale la pena recordar, que somos parte del mismo proceso histórico y es de esperar que la investigación básica y aplicada junto al desarrollo de nuevas tecnologías, sean promisorias para el diseño de estrategias más eficientes para el tratamiento de esta patología.

Cáncer. Conceptos generales

Después de mencionar brevemente las principales hechos históricos que sirvieron de pilares para la comprensión de las causas que originan el cáncer, podemos definirlo como una patología genética caracterizada por la pérdida del control de la proliferación y del posicionamiento celular, características que le permiten a las células alteradas invadir y proliferar en otros tejidos u órganos. Esta alteración del comportamiento celular puede manifestarse en la mayoría de los tejidos del organismo, dando origen a una gama de tumores diferentes con características propias y heterogéneas. Sin embargo, el proceso de transformación del fenotipo celular tiene características comunes en todos los casos. Todas las células de un tumor parecen descender de una única célula ancestral¹¹ que ha acumulado una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que le otorgaron la capacidad de evadir las restricciones que

controlan la proliferación. Esto constituye "el paradigma genético" del cáncer¹². Un tumor se origina por la acumulación de varias alteraciones genéticas, aunque en algunos casos puede surgir como consecuencia de una o dos alteraciones genéticas¹³, como en el caso del retinoblastoma. Se ha estimado que hacen falta de 4 a 7 eventos para el desarrollo de los cánceres epiteliales más comunes¹⁴. Estas alteraciones afectan genes relacionados con el ciclo celular o su control, involucrando la activación de protooncogenes o la pérdida de actividad de genes supresores. Estos cambios pueden ocurrir por mutaciones o por sobreexpresión inducida por amplificación génica o por rearrreglos cromosómicos. Por otro lado, también se ha descrito la activación o supresión de genes por cambios en patrones de metilación¹⁵. En algunos casos, la mutación en si misma no es causal del cambio de fenotipo celular sino que puede afectar a genes relacionados con los sistemas de reparación celular¹⁶, elevando de este modo la tasa de mutación y en consecuencia aumentando la probabilidad de adquisición del fenotipo maligno. Finalmente, todas estas alteraciones genéticas pueden ser heredadas o adquiridas por acción de factores carcinogénicos externos o por estímulos internos como hormonas, radicales libres o procesos inflamatorios crónicos¹⁷.

Estas alteraciones genéticas difieren entre los distintos tipos de cáncer y aún pueden ser diferentes dentro de un mismo tumor. No obstante, asociaciones específicas de alteraciones genéticas son presumiblemente el reflejo de los procesos evolutivos que gobiernan la génesis y progresión de la transformación celular¹⁷. Por lo tanto, el cáncer se convierte en un proceso microevolutivo de acumulación de alteraciones genéticas que puede llevar meses o años donde a diferencia de cualquier otra célula del organismo empiezan a operar los mecanismos de selección natural.

Modelos de estudio

Los estadios de evolución celular responsables de la transformación de una célula normal en cancerosa se han logrado reproducir *in vivo* en los modelos de carcinogénesis en múltiples pasos en donde se induce la formación de tumores mediante el uso de distintos agentes químicos¹⁸. En estos modelos se definen tres etapas operativas:

Iniciación, es un estadio irreversible que implica una lesión genética no letal, heredable pero que altera potencialmente vías de transducción de señales relacionadas con la proliferación y diferenciación celular. Los agentes químicos que pueden actuar como iniciadores lo hacen de manera directa o indirecta, siendo en este caso metabolizados a intermediarios electrofílicos más reactivos que se unen covalentemente al ADN. Los compuestos químicos más utilizados en la iniciación son hidrocarburos policíclicos, como el 7,12-dimetil-benz(a)antraceno (DMBA) y el benzopireno. La etapa de iniciación, sin la subsiguiente etapa de promoción, no genera tumores.

Promoción, es un estadio de la carcinogénesis en el cual se induce la selección y expansión clonal de las células iniciadas, que resulta finalmente en la aparición de tumores. Los agentes promotores más utilizados son diterpenos como el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), alcaloides indólicos y peróxidos orgánicos como el peróxido de benzoílo. La acción de los promotores puede resultar en cambios epigenéticos, que surgen de alteraciones a nivel transcripcional, traduccional o post traduccional. Los agentes que pueden actuar como promotores, no son carcinógenos *per se* y sus efectos son reversibles si se suspende el tratamiento.

Progresión, es el estadio en el cual una lesión benigna se transforma en maligna a través de una nueva lesión en el ADN. Las sustancias que pueden actuar en la etapa de progresión son genotóxicas como agentes iniciadores o peróxidos orgánicos.

La transformación celular descrita, inducida *in vivo* mediante protocolos de carcinogénesis química, se puede correlacionar con los cambios sufridos por una célula en proceso de transformación neoplásica *in vitro*¹⁹. Cuando se extraen células de un tejido y se les provee de las condiciones y medios adecuados para su crecimiento *in vitro*, se dividen un número determinado de veces luego del cual entran en crisis y mueren. Algunas células pueden pasar ese punto de crisis, espontáneamente o en forma inducida mediante el uso de agentes químicos o físicos o por transfección de algún oncogen, y originar una **línea celular establecida**. Las células que la forman se hallan inmortalizadas no presentando otras diferencias fenotípicas más que la capacidad de dividirse indefinidamente. Estas células provenientes de cultivos primarios normales u obtenidas de tumores benignos, pueden sufrir otras alteraciones que le otorguen nuevas características fenotípicas tales como: una disminución en la adherencia a una superficie de anclaje, una menor dependencia del suero para su crecimiento, la capacidad de crecer en medios semisólidos o verticalmente en vez de en monocapa y de formar tumores al ser inoculadas en animales experimentales. Todas estas características transforman a la línea celular establecida en una **línea celular transformada o tumorigénica**.

Además de los modelos experimentales descriptos, se pueden diseñar otros modelos más sofisticados mediante manipulaciones genéticas (transfecciones celulares, animales transgénicos o "knock out"). Todos estos enfoques experimentales permiten un estudio controlado y reproducible que favorece el análisis de los mecanismos involucrados en la inducción de cáncer. Sin embargo, no reflejan totalmente las alteraciones que sufren las células en tumores humanos. Por lo tanto, los análisis *ex vivo* de biopsias de tejidos tumorales humanos son de suma utilidad para la caracterización de la inducción de cáncer en humanos. El estudio conjunto de varios enfoques y modelos nos acerca a una mejor comprensión de esta problemática.

Tratamientos actuales y nuevos enfoques terapéuticos

En el área de la investigación en cáncer, muchos esfuerzos se han dedicado a la búsqueda de estrategias terapéuticas para curar la enfermedad. Las células cancerosas pueden ser removidas quirúrgicamente o pueden ser eliminadas por la acción de compuestos químicos tóxicos (quimioterapia) o por radiación (radioterapia). Unas pocas células cancerosas que permanezcan en el organismo son suficientes para proliferar y producir un resurgimiento de la enfermedad.

Uno de los principales problemas de los tratamientos convencionales de quimioterapia es la toxicidad de los compuestos utilizados, para las células normales. Por lo tanto, la implementación de estrategias que permitan inhibir la proliferación de las células tumorales con menor riesgo para los tejidos normales representa una alternativa a las terapias convencionales. En este sentido, se pueden evaluar dos posibles alternativas. Por un lado, una opción que implique menor toxicidad para las células normales sería la implementación de tratamientos que logren modular las alteraciones que presentan las células tumorales, tendiendo a la reversión del fenotipo tumoral. Este enfoque es de sumo interés, dado que tiende a la recuperación de las características normales por parte de las células tumorales. Sin embargo, esta alternativa se encuentra en una etapa muy incipiente como para pensar actualmente en la cura del cáncer por esta vía. Por otro lado, una alternativa más realista basándonos en los conocimientos actuales, es la búsqueda de selectividad en los tratamientos, de manera de actuar sobre las células tumorales y no sobre las células normales. Con respecto a esto, existen diversas áreas de investigación con resultados promisorios y en algunos casos se han desarrollado protocolos terapéuticos que se aplican exitosamente. En este enfoque se incluyen áreas tan diversas como la inmunoterapia, la terapia génica selectiva y la radioterapia selectiva por el uso de partículas cargadas, como la protonterapia, o por el uso de radiosensibilizadores que actúen preferencialmente sobre las células tumorales.

CAPITULO I

ESTUDIO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO Y DEL NITROGENO EN LA TRANSFORMACION CELULAR

INTRODUCCION I

1.1.1. La célula y el estrés oxidativo: las especies reactivas del oxígeno

El mantenimiento de la homeostasis es un requisito indispensable para la integridad y supervivencia celular. Bajo condiciones fisiológicas, este equilibrio interno está sometido a fluctuaciones dadas por factores intra y extracelulares. Las **especies reactivas del oxígeno**, derivados metabólicos de la respiración celular, representan un factor que potencialmente puede alterar este equilibrio. Durante la respiración celular, el oxígeno se reduce en forma completa a agua, sin embargo un pequeño porcentaje (1 a 5 %) lo hace de manera incompleta dando origen a estas especies reactivas. Estos intermediarios de reducción son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Figuras I.1 y I.2). El oxígeno singulete (O_2') es otra especie reactiva derivada del O_2 , que no es un intermediario de reducción sino un estado excitado que posee alto poder oxidante (Figura I.2).

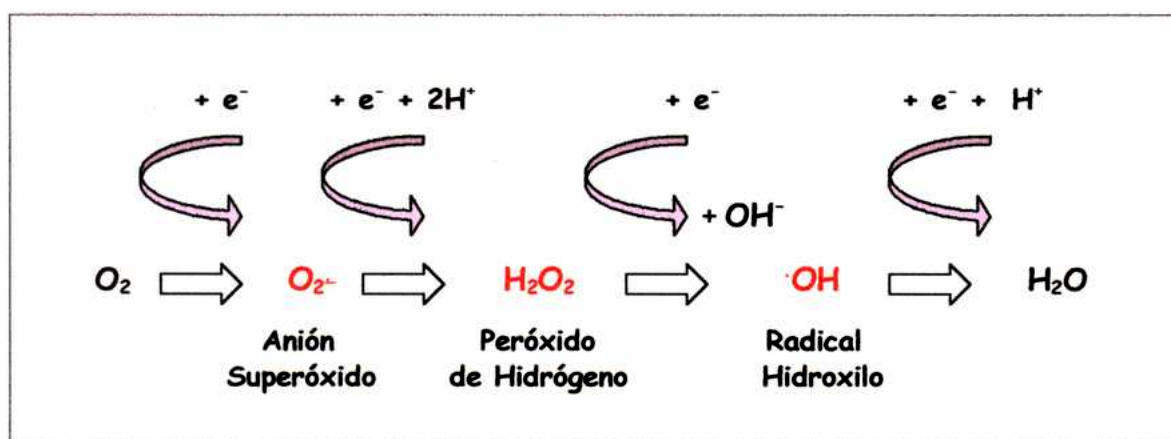


Figura I.1 Estados de reducción parcial y total del oxígeno molecular.

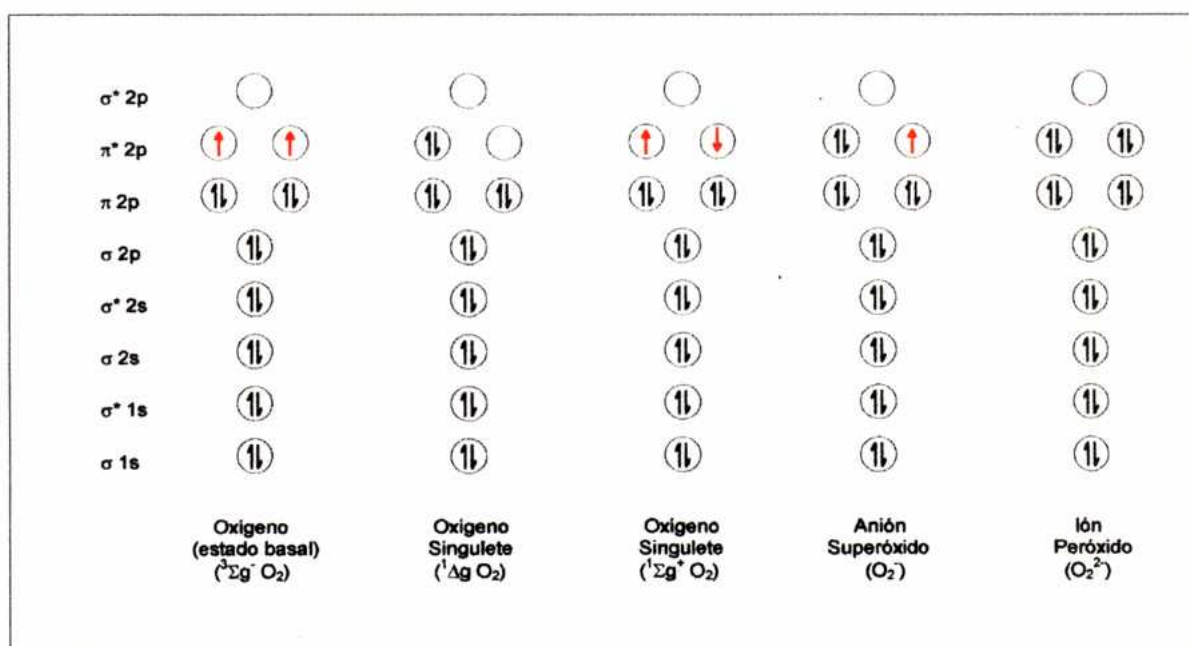


Figura I.2 Configuración electrónica del oxígeno molecular, estado basal, estados excitados y parcialmente reducidos

Algunos de estos intermediarios de reducción del oxígeno, como el O_2^- y el $\cdot OH$ son radicales libres dado que presentan un electrón desapareado y en consecuencia poseen una alta inestabilidad y capacidad de reacción inespecífica. El H_2O_2 no es un radical libre y presenta baja reactividad, pero en presencia de O_2^- y de metales de transición como el hierro genera $\cdot OH$, un radical libre sumamente reactivo²⁰(Figura I.3).

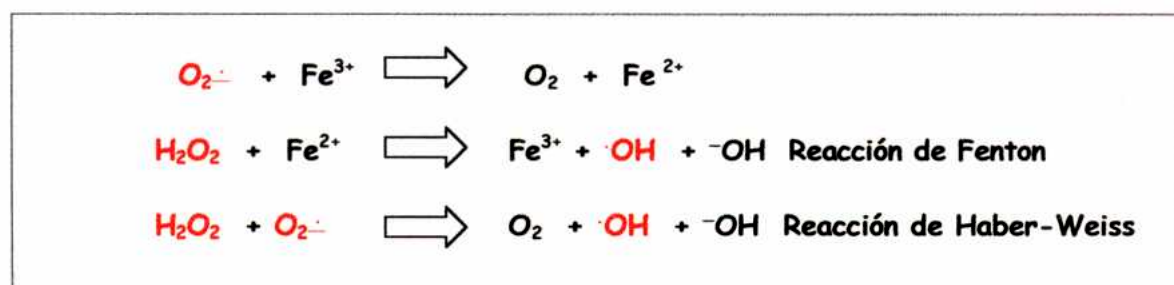


Figura I.3 Generación del radical hidroxilo por reacción del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno con metales de transición.

Las principales fuentes celulares que generan estas especies reactivas son la cadena de transporte electrónico mitocondrial, el metabolismo de ácidos grasos y el metabolismo de compuestos xenobióticos en el retículo endoplasmático^{21,22}.

En las mitocondrias, el oxígeno actúa como último aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones durante la respiración celular. Estas organelas reducen completamente aproximadamente el 90 % del oxígeno que consumen las células, sólo del 1 al 5 % deriva en especies parcialmente reducidas. La relación estimada de $O_{2\cdot-}$ a H_2O_2 está entre 1.5 y 2.1, lo cual indica que todo el H_2O_2 mitocondrial deriva del O_2 , dado que son necesarias dos moléculas de $O_{2\cdot-}$ para obtener una molécula de H_2O_2 . Los peroxisomas contienen enzimas que utilizan O_2 para eliminar átomos de hidrógeno de sustratos orgánicos específicos a través de una reacción oxidativa que genera H_2O_2 , el cual es localmente disipado por las altas concentraciones de catalasa de estas organelas. En el retículo endoplasmático, el citocromo P450 está involucrado en el metabolismo de compuestos xenobióticos catalizando su reducción u oxidación y generando $O_{2\cdot-}$ como compuesto residual en este proceso. Estas especies oxidativas también se generan por autooxidación de algunas moléculas citoplasmáticas como la hemoglobina y por acción de algunas enzimas, como la xantina deshidrogenasa que se encuentra predominantemente en endotelios. En condiciones de isquemia o estimulación por calcio esta enzima se convierte en xantina oxidasa que depura las xantinas generando ácido úrico y $O_{2\cdot-}$ como subproducto de la reacción.

Las especies reactivas del oxígeno están involucradas en fenómenos de toxicidad celular, debido a su capacidad de reactividad inespecífica con las biomoléculas. Ocasionan peroxidación lipídica (Figura I.4), daño a proteínas y lesiones al DNA²³.



Figura I.4. Peroxidación lipídica

1.1.1.1. El sistema de defensa antioxidante

Dada la toxicidad que presentan las especies reactivas del oxígeno, la aparición de sistemas de defensa antioxidantes hicieron posible la supervivencia de las células aeróbicas, permitiendo el mantenimiento y regulación de una homeostasis celular oxidativa compatible con la vida. La oxigenación de la biosfera constituyó entonces una fuerza evolutiva que actuó en forma paralela e independiente sobre los organismos existentes, lo que llevó a la existencia actual de múltiples sistemas de defensa antioxidante. Estos sistemas están constituidos por componentes enzimáticos y por compuestos de naturaleza no enzimática²⁴.

El sistema enzimático de defensa antioxidante está constituido por superóxido dismutasas que protegen a la célula de los efectos tóxicos del anión superóxido y por catalasas y peroxidasas que disipan principalmente el peróxido de hidrógeno.

Superóxido dismutasas (SOD)²⁵: Son un grupo de enzimas capaces de catalizar la dismutación de dos moléculas de anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno, constituyendo la principal defensa contra la toxicidad del oxígeno (Figura 1.5). En células eucariotas, se caracterizaron tres clases de superóxidos dismutasas:

Superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (SOD Cu-Zn): Es una proteína dimerica de 32 kD de peso molecular localizada en el citoplasma. Cada subunidad, contiene un átomo de cobre que forma parte de su sitio activo y un átomo de zinc que le da estabilidad a la molécula. Es inhibida por cianuro o por tratamientos prolongados con dietilditiocarbamato.

Superóxido dismutasa extracelular: Su secuencia aminoacídica tiene gran homología con la anterior. También está asociada a átomos de cobre y de zinc pero está constituida por cuatro subunidades, teniendo un peso aproximado de 135 kD y sólo se encuentra en algunos tejidos.

Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (SOD-Mn): Esta enzima no está relacionada filogenéticamente con las anteriores. Posee un átomo de

manganeso en su sitio activo y se encuentra en mitocondrias de eucariotas y en organismos procariotas. En los organismos eucariotas está constituida por cuatro subunidades idénticas teniendo un peso de 80 kD. A diferencia de las anteriores es insensible a la inhibición por cianuro.

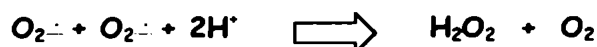


Figura I.5 Reacción de dismutación del anión superóxido.

Catalasa y peroxidasas: Controlan los niveles de peróxido de hidrógeno, que constituye un riesgo potencial para la formación del radical hidroxilo.

Catalasa (CAT)²⁶: Es una enzima que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a agua (Figura I.6). Es una hemoproteína homotetramérica cuyo peso molecular ronda entre 200 y 350 kD y se encuentra principalmente localizada en los peroxisomas.

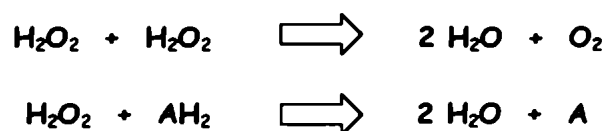


Figura I.6 Reducción de peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima catalasa

Glutathión peroxidasas (GPx)²⁷: Son un grupo de enzimas que también catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno y de otros hidroperóxidos orgánicos, utilizando de manera específica el tripéptido glutathión, como agente dador de electrones (Figura I.7). Hay dos isoformas de esta enzima, una de ellas está constituida por cuatro subunidades, posee selenio en su sitio activo y es la que se encuentra en mayor proporción en los tejidos. La otra isoforma está

constituída por dos subunidades, no posee selenio en su sitio activo y sólo reduce hidroperóxidos orgánicos. La distribución subcelular de glutatión peroxidasa es complementaria a la de catalasa, las dos terceras partes de la enzima están en el citosol, una tercera parte en las mitocondrias y no hay glutatión peroxidasa en peroxisomas²².

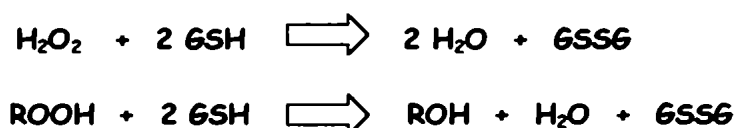


Figura I.7 Reducción de peróxido de hidrógeno y de otros hidroperóxidos orgánicos catalizada por la enzima glutatión peroxidasa.

Por otro lado, la célula además posee un mecanismo que restablece los niveles de glutatión en su forma reducida, constituido por la enzima glutatión reductasa que utiliza NADPH como agente dador de electrones para la reducción del tripéptido (Figura I.8).

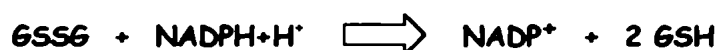


Figura I.8 Reducción de glutatión oxidado por acción de la enzima glutatión reductasa

Además del sistema enzimático de defensa antioxidante, la célula cuenta con moléculas de bajo peso molecular que actúan secuestrando radicales libres²⁸. Algunos son de naturaleza liposoluble, como la vitamina E y el β caroteno y actúan principalmente a nivel de la membrana plasmática, mientras que otros son hidrosolubles, como el glutatión y el ácido ascórbico. Este sistema es particularmente importante en la remoción del radical hidroxilo y del oxígeno singulete, ya que estas especies no poseen sistemas enzimáticos para su neutralización.

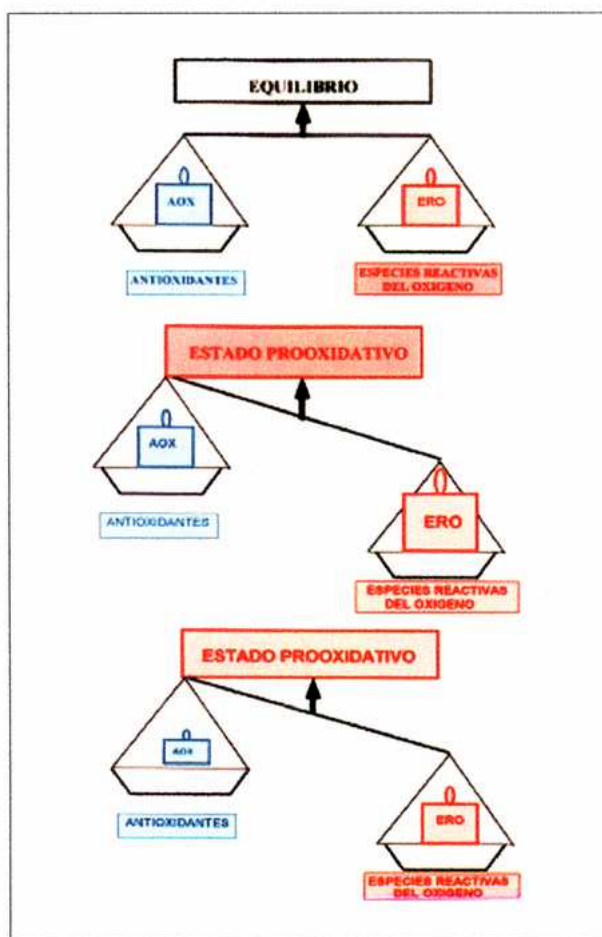


Figura I.9 Balance entre la producción de ROS y los sistemas de defensa antioxidante

Durante el metabolismo normal, existe un equilibrio entre la velocidad de generación y la velocidad de disipación de los niveles de especies reactivas del oxígeno. Cuando la velocidad de disipación disminuye o la velocidad de generación de estas especies aumenta, la célula entra en un **estado prooxidante** o **de estrés oxidativo** (Figura I.9).

1.1.1.2 Las especies reactivas del oxígeno y su vinculación con el cáncer

Las especies reactivas del oxígeno ya sea originadas por agentes exógenos o a partir de fuentes endógenas pueden provocar cambios genéticos, como aberraciones cromosómicas, mutaciones puntuales en protooncogenes o genes supresores, o cambios epigenéticos en vías de transducción de señales relacionadas con la proliferación y diferenciación celular. Por otro lado, diversas evidencias experimentales vinculan a las especies reactivas del oxígeno con el desarrollo del cáncer (Figura I.10):

> Los metabolitos del oxígeno están involucrados en las etapas de la carcinogénesis química. Por ejemplo, muchos promotores tumorales inducen la generación de especies oxidativas por fuentes celulares endógenas mientras que otros promotores son generadores de radicales libres²⁹.

- > Estudios epidemiológicos muestran que secuestradores de radicales libres tales como las vitaminas C y E inhiben el desarrollo de cáncer en modelos experimentales y tienen un efecto quimioprotector en el hombre, especialmente en el cáncer de pulmón, mama y colon ³⁰.
- > Procesos inflamatorios crónicos están asociados con el desarrollo de neoplasias. En este tipo de reacciones, hay reclutamiento de células pertenecientes al sistema inmune como neutrófilos y macrófagos, que generan estas especies reactivas como parte de su mecanismo de acción en defensa del organismo^{31,32}.
- > Existe una clara correlación entre la ingesta de metales de transición (hierro, níquel), que facilitan la producción de especies reactivas del oxígeno, con el desarrollo de cáncer en animales³³.

Por otro lado, existen numerosas evidencias que vinculan a las especies reactivas del oxígeno con la modulación de vías de transducción de señales relacionadas con la proliferación celular:

- > El aumento exógeno de especies reactivas del oxígeno promueven la proliferación en algunos tipos celulares. Concentraciones subtóxicas en el rango nM a μ M estimulan la proliferación *in vitro* de fibroblastos de hámster, rata³⁴ y células musculares humanas³⁵ entre otras.
- > Distintas especies reactivas del oxígeno regulan la fosforilación de tirosinas quinasas y tirosinas fosfatasas independientemente de las señales extracelulares³⁶.
- > Factores de transcripción tales como p53, AP1, NF κ B, que participan entre otras funciones en el control de la proliferación, pueden modificar su unión al ADN por la óxido reducción reversible de grupos sulfhidrilos³⁷.
- > El peróxido de hidrógeno induce el acoplamiento de proteínas adaptadoras entre receptores tirosina quinasas y la proteína p21, derivada del protooncogen ras, cuya participación en las vías de señalización, que activan proteínas quinasas inductoras de la mitogénesis (MAPKs) se ha estudiado ampliamente³⁸.

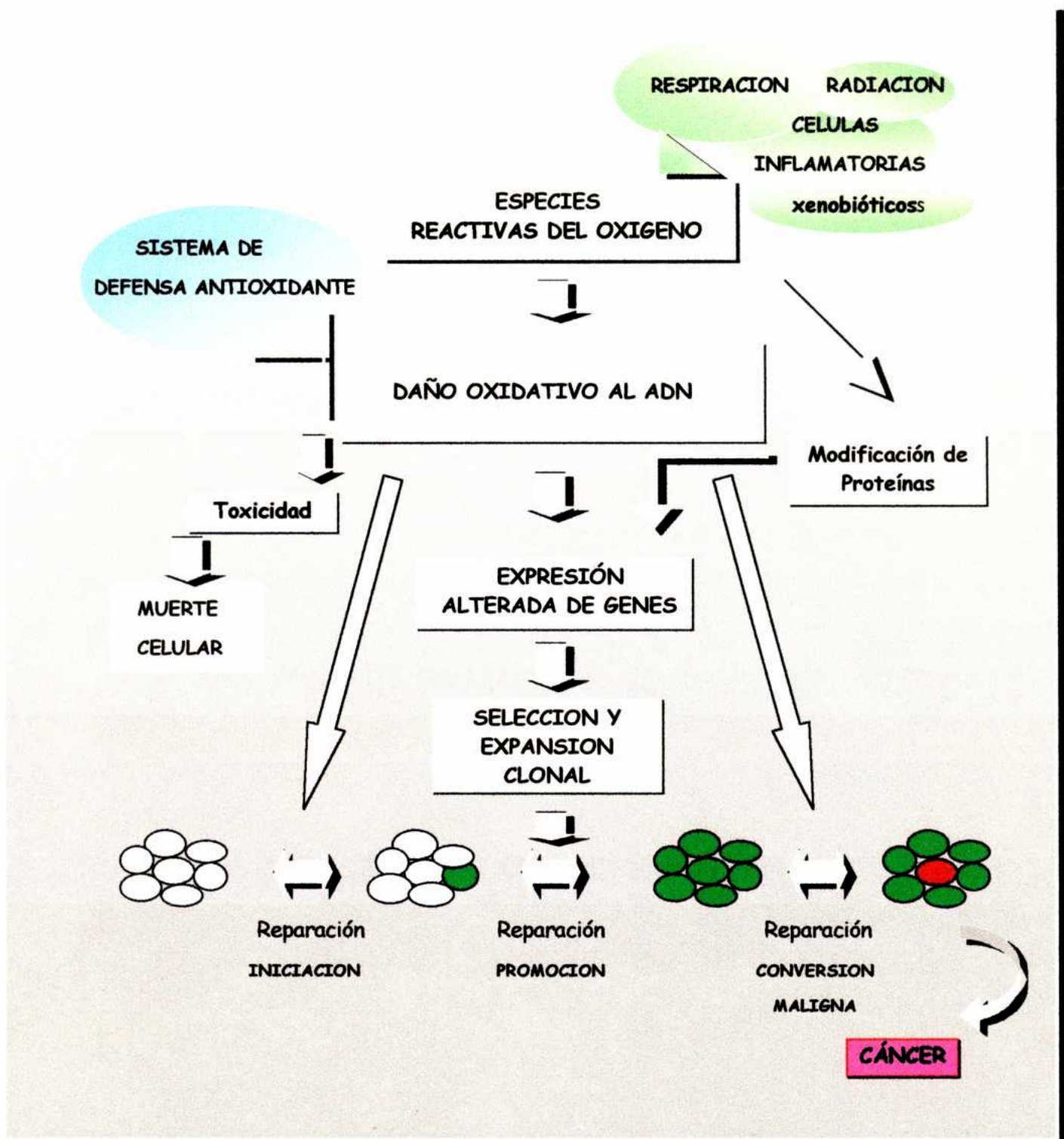


Figura I.10 Participación de las especies reactivas del oxígeno en el proceso de transformación celular.

1.1.2 Especies Reactivas del Nitrógeno (RNS)

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula inorgánica, gaseosa, soluble en agua y capaz de atravesar membranas lipídicas por ser eléctricamente neutra. Posee un electrón desapareado, razón por la cual pertenece al grupo de los radicales libres, aunque comparativamente con la mayoría de ellos es muy estable, no dimeriza ni dismuta. Dentro de las células, el óxido nítrico reacciona principalmente: con el O₂ dando origen a compuestos tales como el dióxido de nitrógeno (NO₂), con anión superóxido originando peroxinitrito (ONOO⁻) y con metales³⁹ (Figura I.11).

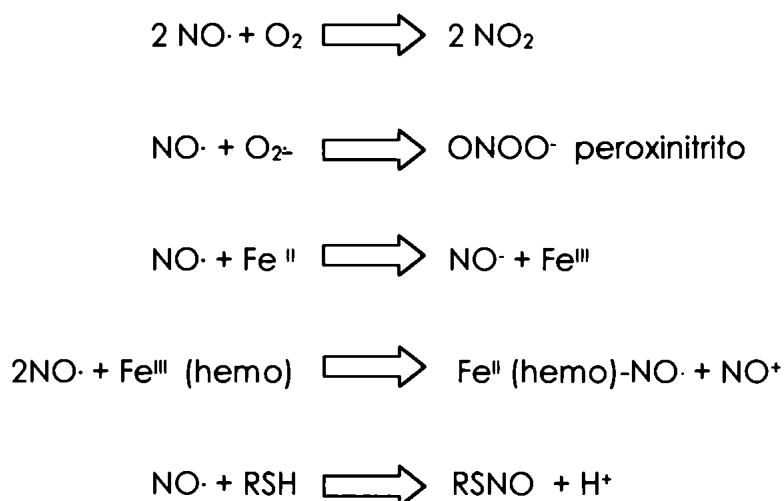


Figura I.11 Principales blancos de reacción del óxido nítrico en la célula.

Por lo tanto, además del oxígeno los principales blancos del NO son grupos sulfhidrilos y proteínas con metales de transición en sus sitios activos o alostéricos (por ej: hemoglobina, guanilato ciclasa, transferrina). Una de las reacciones más importantes del NO es la de nitrosilación. Este tipo de reacciones es generalmente de carácter reversible y se produce sobre aminos y tioles y sobre el ADN generando deaminaciones. Por otro lado, el óxido nítrico puede producir reacciones de oxidación más intensas, como nitraciones, de carácter irreversible⁴⁰.

Sin embargo, estas reacciones no pueden llevarse a cabo directamente por el NO, sino que se necesitan de la oxidación previa del NO a NO₂ o N₂O₃, compuestos con poderosa capacidad de oxidación. La frecuencia de una u otra reacción depende de la concentración de NO. A bajas concentraciones (menos de 1 μM) el NO reacciona preferentemente con blancos biológicos, como por ejemplo la guanilato ciclasa. A altas concentraciones se favorece la formación de N₂O₃, quien reacciona preferentemente con grupos tioles, y en menor medida produce deaminaciones y nitrosilación de aminas⁴¹.

Las características químicas mencionadas hacen que el NO pueda actuar como segundo mensajero en vías de señalización celular a concentraciones compatibles con la vida celular y presentar alta toxicidad a concentraciones elevadas.

1.1.2.1 Fuentes celulares

El óxido nítrico se sintetiza enzimáticamente por óxido nítrico sintetasas (NOS) a partir de L-arginina, por oxidación de uno de sus nitrógenos guanidinos terminal. Además de L-arginina, es necesario la presencia de oxígeno molecular y NADPH como cosustratos de reacción y flavinas (FAD y FMN), grupo hemo (Fe-protoporfinas IX), tetrahidrobiopterina (BH₄) y calmodulina (CaM) como cofactores. Como coproductos de la reacción se generan L-citrulina, NADP⁺ y H₂O (Figura I.12).

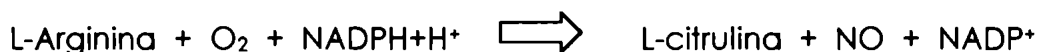


Figura I.12 Reacción catalizada por óxido nítrico sintetasas.

En mamíferos, se han aislado y purificado tres isoformas de NOS que pueden ser clasificadas en 2 grupos: **constitutivas** (NOS I y NOS III) activadas por el complejo Ca/CaM e **inducibles** (NOS II) insensibles a las variaciones de calcio intracelular. La NOS I y NOS III se caracterizaron por primera vez en neuronas y en células endoteliales respectivamente, por eso también se las conoce como NOS neuronal y NOS endotelial, mientras que la NOS II fue

aislada por primera vez de macrófagos estimulados con interferón gamma y lipopolisacáridos. La principal diferencia entre las isoformas es la actividad *in situ*⁴². Las enzimas constitutivas producen pequeñas cantidades de NO durante segundos a minutos (pmoles/min/mg prot). En general, el NO producido por la NOS I actúa como neurotransmisor mientras que el producido por la NOSIII actúa como factor relajante endotelial, regula la agregación plaquetaria y previene la adhesión leucocitaria. La NOS I se encuentra mayoritariamente en cerebelo, corteza, endotelio del sistema nervioso central, glándula adrenal, células esqueléticas mientras que la NOS III se encuentra en plaquetas, células endoteliales. El NO producido por la NOS II ante una inducción, se genera en grandes cantidades (nmol/min/mg proteína) y durante largos períodos (horas a días). En este caso, el óxido nítrico producido tiene un rol principalmente antibacteriano, antiparasitario, antiviral y antitumoral. La NOS II está presente mayoritariamente en hígado, pulmón, macrófagos , PMNs, linfocitos T, células de Kupffer y condrocitos.

1.1.2.2 Las especies reactivas del nitrógeno y su vinculación con el cáncer

Existen numerosas evidencias que vinculan a las especies reactivas del nitrógeno con los procesos de transformación celular:

- > Promotores tumorales modulan las concentraciones intracelulares de NO y la actividad de NOS:

En la carcinogénesis química los niveles de mRNA de NOS II⁴³ y la actividad de las NOS constitutivas⁴⁴ disminuyen durante la promoción.

- > Aumento de los niveles de oxido nítrico tienen efectos antiproliferativos:

El aumento de los niveles de óxido nítrico mediante tratamientos con dadores de óxido nítrico, inducción de la actividad de NOS II o transfección de distintos tipos de NOS inhiben la proliferación celular⁴⁵⁻⁴⁷.

- > Derivados del oxido nítrico tienen propiedades carcinogénicas⁴⁸:

Se ha demostrado la capacidad mutagénica del peroxinitrito, especie reactiva del nitrógeno con alta capacidad de reacción inespecífica.

- > Variación de la expresión de NOS en distintos tipos celulares normales, líneas tumorales y tumores:

Se ha descrito una expresión diferencial de NOS entre células diferenciadas y en activa proliferación. En células normales, se describió una mayor actividad de NOS en células diferenciadas (neuronas, células diferenciadas de la epidermis) con respecto a células en activa proliferación (células basales de la epidermis, de la cripta del intestino delgado, células hematopoyéticas y fibroblastos hiperproliferativos)⁴⁹. Sin embargo, existen resultados controvertidos con respecto al papel del NO en líneas tumorales y en tumores, se ha descrito una disminución de la expresión de NOS II y de NOS III en función del grado de malignidad en tumores de mama^{50,51} y un aumento de la actividad en diversos tipos de tumores⁵²⁻⁵⁵. Por otro lado, también existen resultados controvertidos con respecto a las variaciones de la expresión de NOS en líneas celulares tumorales^{56,57}.

> Vías de transducción de señales relacionadas con la proliferación celular modifican los niveles intracelulares de NO y tratamientos con dadores de NO modulan estas vías de señalización:

Se ha descrito que el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y la consecuente activación de vías relacionadas con la proliferación celular disminuyen los niveles de NO en queratinocitos⁵⁸.

Por otro lado, pretratamiento con dadores de NO disminuyen la liberación de fosfoinosítidos y calcio inducida por los factores de crecimiento epidérmico (EGF), derivado de plaquetas (PDGF) y fibroblástico (FGF)⁵⁹. Además, inhibidores de la NOS incrementan estos segundos mensajeros.

A pesar de todas las evidencias presentadas que muestran que las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno están relacionados con la etiología del cáncer, no se conocen con precisión los mecanismos de acción.

1.1.3. Objetivos

- 1. Evaluar la participación de las especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno en los mecanismos de proliferación celular y transformación neoplásica.**

- 2. Compensar las posibles alteraciones de los niveles de estas especies oxidativas vinculadas con la transformación celular con el objeto de inhibir la proliferación y controlar el crecimiento tumoral.**

1.2.1 Modelos de estudio *in vitro*

1.2.1.1 Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares de origen epitelial: PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7. Estas líneas difieren en características fenotípicas relacionadas con la malignidad celular y se estudiaron comparativamente teniendo en cuenta su origen.

Líneas derivadas de epidermis de ratones de la cepa SENCAR (Sensibles al Cáncer)

Las líneas celulares PB y CH72-T4 fueron gentilmente donadas por el Dr. Claudio Conti (M. D. Anderson Cancer Center, Universidad de Texas, USA) y por el Dr. Fernando Larcher (CIEMAT, Madrid, España). Estas líneas se originaron a partir de cultivos primarios de tumores experimentales originados en piel de ratones de la cepa SENCAR. Estos tumores se generaron a partir de protocolos de carcinogénesis química utilizando 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA) como agente iniciador y tetradecanoilforbol acetato (TPA) como agente promotor.

La línea celular PB se originó a partir de cultivos primarios de papilomas⁴⁰, son morfológicamente indistinguibles de los queratinocitos epidérmicos normales, proliferan en medios de cultivo con concentraciones de CaCl_2 del orden de 0,05 mM y conservan la capacidad de diferenciarse si la concentración de calcio del medio de cultivo se eleva a valores de 0.5 a 1,2 mM.

La línea celular CH72-T4 deriva de la línea celular CH72. Esta última se originó a partir de un cultivo primario de un carcinoma escamoso originado a partir de protocolos de carcinogénesis química en ratones SENCAR. Posteriormente, esta línea celular se traspasó cuatro veces por ratones atímicos, originándose de este modo la línea celular CH72-T4. Estas células presentan diversidad de forma y tamaño, han perdido casi todos los marcadores epiteliales de diferenciación y muestran un 100% de tumorigenicidad y metástasis espontánea al ser inoculadas en ratones nude (comunicación personal del Dr. Claudio Conti).

Líneas derivadas de epidermis de ratones C57BL/6N

Las líneas celulares PDV y PDVC57 fueron gentilmente donadas por el Dr. Fernando Larcher (CIEMAT, Madrid, España). La línea celular PDV se originó a partir de cultivos primarios de queratinocitos epidérmicos aislados de la cepa C57BL/6N tratados in vitro con el carcinógeno DMBA y la línea celular PDVC57 deriva de un explanto de un tumor inducido por inoculación de células PDV en ratones singenéticos^{61,62}. Características tales como la inducción de tumores al ser inoculadas en animales experimentales, el número de copias del oncogen ras mutado, la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), la expresión de citoqueratinas asociadas a estados de indiferenciación celular aumentan de forma progresiva en la línea celular PDVC57 con respecto a la línea celular PDV⁶¹⁻⁶³.

Líneas derivadas de epitelio mamario humano

Las líneas celulares HBL100 y MCF-7 fueron gentilmente donadas por la Dra Elena Rivera (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina). Estas líneas derivan de epitelio mamario humano. La línea celular HBL-100 proviene de cultivo de leche mamaria de una mujer sana⁶⁴. Estas células presentan marcadores que indican que su origen es de células epiteliales de la glándula mamaria, presentan el antígeno SV40T y expresan normalmente la proteína p53. En pasajes tempranos, no es capaz de generar colonias en agar blando ni tumores al ser inoculadas en ratones nude⁶⁵. La línea celular MCF-7 proviene de un carcinoma mamario y es tumorigénica al ser inoculada en ratones nude^{66,67}.

Líneas celulares de diversos orígenes

Se utilizaron otras líneas celulares de diversos orígenes tisulares y de diferentes especies a fin de evaluar si los hallazgos descritos en este trabajo de tesis son representativos de un mecanismo general. Las líneas utilizadas fueron: MCA3D (células epidérmicas de ratón no tumorigénicas), Vero (células epiteliales de riñón de mono), F98 (células de glioblastoma de ratón, gentilmente donadas por el Dr. R. Barth), UMR106 (células de osteosarcoma de rata, gentilmente donadas por las Dras. S. B. Etcheverry y A.M. Cortizo) and PANC-1 (células de carcinoma de páncreas humano).

1.2.1.2 Condiciones de cultivo

Todas las líneas celulares crecieron a 37°C y 5% de CO₂. Las líneas celulares PDV, PDVC57, CH72-T4 y MCA3D se cultivaron en medio Ham-F12 (Gibco), la línea celular PB en medio S-MEM sin calcio (Gibco), las líneas celulares HBL-100, MCF-7 y PANC-1 en medio RPMI 1640 (Gibco) y las líneas Vero, F98 y UMR106 en medio D-MEM (Gibco). Los medios se complementaron con 10% de suero fetal bovino (FBS) y gentamicina 50 µg/ml. El calcio del suero adicionado al medio S-MEM fue previamente quelado con una resina de intercambio iónico Chelex 100 (BioRad).

1.2.2 Caracterización de la proliferación y de la tumorigenicidad de las líneas celulares

Los tumores pueden ser clasificadas en dos grandes categorías⁶⁸:

tumores benignos, las células poseen las características histológicas típicas del tejido de origen, son bien diferenciados, crecen lentamente y están separadas del tejido normal circundante por una cápsula de tejido conectivo bien definida.

tumores malignos: las células que lo forman poseen características anormales que las diferencian de las células que forman el tejido de origen. Han adquirido la capacidad de invadir el tejido circundante, pueden presentar variaciones en la forma, en el tamaño celular y nuclear, en el número de cromosomas, en el número de mitosis, así como también evidenciar la presencia de aberraciones cromosómicas y la aparición de figuras mitóticas anormales. Estos tumores no están delimitados por una cápsula de tejido conectivo bien definida.

Por otro lado, también existen criterios para la clasificación de tumores en grados de malignidad. Estos sistemas de clasificación, tienden a medir el grado de dediferenciación de las células que forman el tumor y están basados en criterios histológicos y citológicos. Los criterios histológicos están relacionados con modificaciones de la arquitectura normal del tejido así como también en cambios en la relación normal entre las células y con respecto al estroma. Los criterios citológicos están relacionados con cambios en el tamaño de las células, grado de hipercromatismo, número de mitosis y cambios de la ploidía.

Estos criterios por ejemplo, han sido tomados por Bloom y Richardson⁶⁹ para la clasificación de carcinomas mamarios en tres grados histológicos de malignidad y también por Fisher⁷⁰ quién además tiene en cuenta la atipia del núcleo para la clasificación de los tumores. De este modo, los tumores se pueden clasificar en grados de malignidad que se correlacionan con características histológicas definidas.

En el caso de las líneas celulares, existen ensayos que tienden a caracterizar el comportamiento de las células y evaluar su grado de transformación. Estos ensayos comprenden básicamente: el ensayo clonogénico que evalúa el porcentaje de células que son capaces de proliferar, las curvas de crecimiento para evaluar la tasa de duplicación de la línea celular, la capacidad de crecimiento en agar blando para evaluar la capacidad de las células de crecer independientemente del anclaje a un sustrato y la capacidad de generar tumores al ser inoculadas en animales experimentales. También existen ensayos que tienden a evaluar la capacidad de migración celular como las cámaras Transwell o ensayos que evalúan la capacidad de invasión celular en donde se utilizan membranas basales reconstituídas o matrigel.

A fin de caracterizar las líneas celulares utilizadas en este trabajo se realizaron los siguientes ensayos:

1.2.2.1 Ensayo clonogénico

Se sembraron 1×10^3 células de cada línea celular en placas de 60 mm de diámetro. Al cabo de 10 días las células se fijaron con metanol:acético (3:1) y se tiñeron con violeta cristal 0.5 % en metanol 25 %. Se contaron las colonias con más de 50 células.

1.2.2.2 Curvas de crecimiento

Todas las líneas celulares se sembraron a una densidad de 5×10^4 células en placas de 35 mm de diámetro. Las células se contaron cada 24 hs, durante 96 hs. En las curvas de crecimiento, los datos se expresaron como: $(N^\circ \text{células día } x) - (N^\circ \text{ células día } 0) / (N^\circ \text{ células día } 0)$, considerando día 0 como el número de células que había a las 24 hs de la siembra. Para determinar el tiempo de duplicación (TD), se utilizó la ecuación $N_t = N_0 (2^{t/TD})$, siendo N_t el número final de

células, N_0 el número inicial de células, t el tiempo de duración del cultivo y f la frecuencia de duplicación por unidad de tiempo. TD se calculó como $TD = 1/f$.

1.2.2.3 Ensayo de formación de colonias en agar blando

Se utilizó la técnica descrita por Hamburger y Salmon⁷¹. Esta técnica evalúa la capacidad de la célula de crecer en forma independiente de anclaje. Consiste en utilizar una doble capa de agar, una capa inferior al 0.5%, y una capa superior de agar blando al 0.3% conteniendo las células. Brevemente, se agregó un volumen de 4 ml mezclando partes iguales de medio de cultivo 2X y agar base 1% en placas de 60 mm de diámetro. Una vez solidificada la capa inferior se agregó la capa superior, mezclando un tercio de agar base 1%, un tercio de medio 2X y un tercio de medio de cultivo conteniendo 10^5 células. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 semanas. Se contaron las colonias conteniendo más de 40 células en un microscopio de contraste de fase.

1.2.2.4 Test de tumorigenicidad

Se evaluó la capacidad tumorigénica de las diferentes líneas celulares en ratones nude. Para realizar este ensayo con las líneas PB, CH72-T4, PDV y PDVC57, se inyectaron 10^6 células en forma subcutánea en ambos lados de la zona dorsal interescapular de cada ratón. Para las líneas HBL-100 y MCF-7, se inyectaron 5×10^6 células a ambos lados por debajo de cada mama inguinal, en animales suplementados con estrógenos en forma de pellets de 17 β -estradiol colocados subcutáneamente en la región interescapular al mismo tiempo que la inoculación de las células. Se obtuvieron datos relativos al tiempo de latencia y número de tumores/sitio de inyección.

1.2.3 Evaluación del sistema antioxidante y de la producción de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno en las líneas celulares

1.2.3.1 Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

1.2.3.1.1 Obtención de las muestras

Las líneas celulares fueron crecidas hasta alcanzar el 80% de confluencia. Se realizaron dos lavados con buffer fosfato en solución salina (PBS) y se levantaron mediante raspado en frío en 1 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7.8. La ruptura celular se realizó mediante congelado a -80 °C y descongelado. Las muestras se centrifugaron a 2×10^4 g a 4°C durante 10 min. Se separó el sobrenadante y se determinó su concentración proteica por la técnica de Lowry. Las muestras se conservaron a -80°C hasta la determinación bioquímica de las actividades enzimáticas.

1.2.3.1.2 Determinación de actividades enzimáticas

Superóxida dimutasa: se utilizó la técnica descrita por Beauchamp y Fridovich⁷². Esta técnica detecta indirectamente la actividad de superóxido dismutasa y está basada en la capacidad que tiene el anión superóxido de reducir al nitroblue tetrazolium (NBT). El NBT es una sal de tetrazolium de color amarillo que se reduce en presencia del anión superóxido generando diformazana, un compuesto de color azul, insoluble en agua que se puede detectar espectrofotométricamente a 560 nm. La generación de diformazana a partir de la reducción del NBT por anión superóxido puede ser inhibida competitivamente por la superóxido dismutasa que utiliza el anión superóxido como sustrato. Por lo tanto, el agregado de una muestra conteniendo SOD a una mezcla de reacción con NBT y un sistema generador de anión superóxido producirá una disminución de la intensidad de color azul. Las medidas se realizaron utilizando una mezcla de reacción conteniendo xantina 0,125 mM y xantina oxidasa (Sigma) 0,1 U/ml (capaz de producir un cambio de absorbancia de 0,02/min a 560 nm) como sistema generador de anión superóxido, NBT 70 μM y catalasa 1,25 U/ml (para eliminar el peróxido de hidrógeno que se genera en el sistema). El volumen final de cada determinación fue de 800 μl de buffer fosfato 50 mM, pH 7,8. Se agregaron

distintos volúmenes de los extractos celulares y se llevaron a un volumen final de 1 ml con buffer fosfato. La reacción se inició con el agregado de la xantina oxidasa. Las medidas de absorbancia se tomaron durante 10 min. Se calculó la pendiente para cada curva de absorbancia a partir de la regresión lineal de los datos obtenidos a partir de los 5 minutos de iniciada la reacción. Se calculó el porcentaje de inhibición para cada uno de los volúmenes de la muestra como porcentaje de la inhibición máxima obtenida en el blanco de reacción. Se construyó una curva de porcentaje de inhibición en función de la concentración de proteínas. Esta curva se ajustó a una curva hiperbólica utilizando el programa SIGMA PLOT. Los resultados se expresaron en unidades enzimáticas/mg proteínas (U/mg), definiéndose como 1 unidad enzimática a la cantidad de enzima capaz de inhibir en un 50% la reducción del NBT.

Catalasa: se utilizó la técnica descrita por Nelson y Kiesow⁷³. La actividad de catalasa se determinó espectrofotométricamente midiendo la velocidad de descomposición de H_2O_2 a 240 nm. Se utilizó una mezcla de reacción formada por buffer fosfato 50 mM, pH 7,8, H_2O_2 15 mM. La reacción se inició con el agregado de los extractos celulares. Las actividades enzimáticas se calcularon a partir de las pendientes obtenidas por regresión lineal. Se midieron varios volúmenes para cada muestra y se obtuvieron valores promedios. Los resultados se expresaron en unidades enzimáticas/mg proteínas (U/mg), definiéndose como una unidad enzimática a la cantidad de enzima capaz de producir la desaparición de 1 μmol de H_2O_2 /min a 25 °C. Se consideró un coeficiente de extinción molar de $43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Glutación peroxidasa: se evaluó indirectamente mediante la determinación espectrofotométrica de la velocidad de desaparición de NADPH a 340 nm en un sistema acoplado conteniendo glutatión y glutatión reductasa⁷⁴, enzima capaz de reducir el glutatión utilizando NADPH como dador de electrones. La glutatión peroxidasa reduce el peróxido de hidrógeno utilizando glutatión como dador de electrones, en este caso se utilizó el hidroperóxido de ter-butilo como sustrato de esta reacción. Se siguió el siguiente protocolo: a 900 μl de una mezcla de reacción conteniendo buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,6, 0,5 mM EDTA, 0,16 mM NADPH, 0,25 mM GSH y 1U/ml glutatión reductasa, se

agregaron distintos volúmenes de cada muestra como fuente de glutatión peroxidasa. Se llevó a un volumen final de 1 ml con buffer. La reacción se inició con el agregado de 10 μ l de hidroperóxido de ter-butilo (0,25 mM). Se tomaron los valores de absorbancia durante los tres primeros minutos de la reacción y se calcularon las pendientes de las curvas por regresión lineal. Los resultados se expresaron en unidades enzimáticas/mg proteínas, definiéndose como 1 unidad enzimática a la cantidad de enzima capaz de producir la desaparición de 1 nmol de NADPH/min. Se consideró un coeficiente de extinción molar de 6.22 mM⁻¹ cm⁻¹.

1.2.3.2 Determinación de la producción de peróxido de hidrógeno

La tasa de producción de peróxido de hidrógeno se determinó mediante el método escopoletina / peroxidasa de rábano (HPO) adaptado para células tumorales⁷⁵. La escopoletina (7-hydroxy-6-methoxycoumarin) fluoresce a 460 nm cuando es escitada con una longitud de onda entre 350 y 400 nm. En presencia de H₂O₂ y HPO se oxida dando origen a un producto no fluorescente. La escopoletina fluoresce con una intensidad directamente proporcional a su concentración, por lo tanto la caída de la fluorescencia durante la oxidación por la HPO es proporcional al aumento de la concentración de H₂O₂ en el medio. Se cultivaron células en placas de cultivo de 35 mm durante 24 hs, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 1 ml de medio de cultivo sin rojo fenol, 1 U de HPO y una concentración final de escopoletina de 65 μ M. La intensidad de fluorescencia se midió a las 2 hs y a las 4 hs de incubación en un espectrofluorómetro a 360 nm de excitación y 460 nm de emisión.

1.2.3.3 Determinación de la producción de anión superóxido⁷⁶

Las células crecidas durante 48 hs se incubaron con NBT al 0.1% durante dos horas. Se retiró el medio de cultivo, luego de varios lavados se fijaron con metanol. A fin de posibilitar la disolución completa de la sal de diformazana se agregó 250 μ l de KOH 2M y 750 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). Se determinó la absorbancia a 630 nm y las medidas se expresaron en función del número de células.

1.2.3.4 Evaluación de las especies reactivas del nitrógeno

Determinación de la producción de nitritos

La concentración de nitritos del medio se determinó utilizando el reactivo de Griess (sulfanilamida 1% en HCL 1N y N-(1-naftil)etilendiamina 0.02 %)⁷⁷. Se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 540 nm.

1.2.4 Modulación de la producción de peróxido de hidrógeno y evaluación de la proliferación celular.

1.2.4.1 Tratamientos con catalasa

Se sembraron 5×10^4 células en cápsulas de cultivo de 35 mm de diámetro. A las 24 hs de crecimiento, las células se incubaron con 0, 250, 500, 750, 1000 U de catalasa/ml. Se determinó la proliferación celular para cada condición y se expresó como porcentaje del control (0 U de catalasa/ml).

1.2.4.2 Evaluación de proliferación

Se evaluó la proliferación mediante los siguientes ensayos:

Ensayo de MTT. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) es una sal de tetrazolium cuya reducción origina un producto colorimétrico que se puede detectar espectrofotométricamente a 555 nm⁷⁸. Esta reducción está dada por productos del metabolismo oxidativo celular y es una medida indirecta del número de células.

Conteo celular. Se contó el número de células vivas en una cámara de Neubauer. Se expresó la inhibición de la proliferación como porcentaje relativo de crecimiento para cada dosis con respecto al control (dosis 0).

Determinación inmunohistoquímica de la incorporación de bromodeoxiuridina⁷⁹.

Se sembraron 25×10^3 células en Labtec (Nunc) desmontables de 4 pocillos. Luego de 48 hs de crecimiento se incubaron con bromodeoxiuridina (BrdU) 20 μ M durante 2 hs. Las células se fijaron con metanol:acético (3:1) durante 10 min y posteriormente se incubaron en formamida (Sigma) al 70 % durante 2hs a

65°C. Los preparados se lavaron 2 veces con PBS durante 5 min. Luego se incubaron 1 hora a 37 °C con el primer anticuerpo contra bromodeoxiuridina (Sigma) diluido 1:100. Posteriormente, se realizaron dos lavados de 5 minutos y se incubó con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa (dilución 1:100) durante 1 hora a 37° C. Se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS y se reveló con H₂O₂ y diaminobenzidina (DAB). Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas.

1.2.4.3 Determinación de los niveles de peróxido de hidrógeno en función de la concentración de catalasa en el medio extracelular

A fin de evaluar si existe correlación entre la concentración de catalasa utilizada en los distintos tratamientos y los niveles de H₂O₂ en el medio extracelular, se utilizó la técnica de escopoletina / HPO descrita⁷⁵, con algunas modificaciones. Se sembraron 2x10⁴ células de las líneas celulares HBL-100 y MCF-7 en cápsulas de 35 mm de diámetro y a las 24 hs de la siembra se le agregaron conjuntamente las diferentes concentraciones de 250, 500, 750, 1000 U de catalasa/ml, escopoletina a una concentración final de 100 µM y 0.5 U/ml de peroxidasa de rábano. Se realizaron blancos en las mismas condiciones pero en ausencia de peroxidasa de rábano. La caída de fluorescencia se determinó luego de 24 hs de tratamiento.

1.2.4.4 Recuperación de los tratamientos con catalasa

A fin de determinar posibles efectos tóxicos de los tratamientos con catalasa se evaluó la capacidad de recuperación de las células luego de los tratamientos. Se sembraron 25x10³ células/pocillo en placas de 24 pocillos. A las 24 hs de la siembra, las células se trataron con 500 y 1000 U de catalasa/ml. Se evaluó la proliferación mediante la técnica de MTT luego de un tiempo equivalente al tiempo de duplicación de cada línea celular. Placas tratadas en las mismas condiciones continuaron su crecimiento luego de la extracción del medio, un lavado con PBS y el agregado de medio fresco sin catalasa. Se evaluó la recuperación de las células en estas placas mediante el ensayo de MTT luego de un tiempo equivalente al tiempo de duplicación de cada línea celular.

1.2.4.5 Evaluación de apoptosis

Se evaluó mediante las técnicas de tinción con Hoechst⁸⁰ y electroforesis en gel de agarosa (DNA laddering)⁸⁰. Como control positivo se utilizaron células tratadas con genisteína 100 μ M.

1.2.5 Modelos de estudio *in vivo*

Animales

Se utilizaron hembras de ratones nude y de ratones SENCAR. Los ratones nude⁸¹ son atímicos congénitamente, por lo tanto carecen de linfocitos T y son incapaces de rechazar aloinjertos así como también inóculos de células tumorales. La cepa de ratones SENCAR⁸² fue originalmente desarrollada por cruce de hembras de la cepa CD-1 con machos Rockland variedad STS (skin tumor susceptible). Esta variedad fue desarrollada por selección artificial de ratones con mayor susceptibilidad a la inducción de tumores mediante un protocolo de iniciación – promoción, durante ocho generaciones. Los animales fueron criados en el bioterio de la Comisión Nacional de Energía Atómica, donde fueron alojados en un ambiente controlado de humedad y temperatura, con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad y recibiendo agua y alimentos *ad libitum*.

1.2.6 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno *in vivo* y evaluación del crecimiento tumoral

1.2.6.1 Experimento con ratones nude

Un total de 60 ratones fueron inoculados subcutáneamente en ambos lados de la zona dorsal con 1×10^6 células de la línea celular CH72-T4. Al cabo de 5 días los animales fueron divididos en 3 grupos experimentales: a) animales tratados con catalasa, b) controles tratados con catalasa inactivada y c) controles con PBS. Los animales del grupo (a) fueron inyectados en forma subcutánea en la proximidad del tumor con una solución de catalasa en PBS (dosis final: 1 mg de catalasa/gramo de peso). Los animales controles del grupo (b) fueron inyectados con catalasa inactivada con calor (3min en

baño de agua hirviendo) y los del grupo (c) con el vehículo (PBS). Se tomaron medidas del crecimiento del tumor cada 3 días aproximadamente, durante un total de 15 días. El volumen tumoral se determinó usando la ecuación de un elipsoide: $V = 4/3\pi \cdot D_M / 2 \cdot (D_m / 2)^2$, siendo D_M el diámetro mayor y D_m el diámetro menor. El crecimiento de cada tumor se refirió al tamaño que presentaba al día 0 del tratamiento.

1.2.6.2 Experimento con ratones SENCAR

Se prepararon los ratones hembras de la cepa SENCAR para el protocolo de carcinogénesis química, afeitándoles el dorso con una rasuradora quirúrgica dos días antes de la iniciación del protocolo. Sólo los ratones que se encontraban en la fase de descanso del ciclo de los folículos pilosos fueron utilizados. La iniciación se realizó mediante una única aplicación tópica de una solución de DMBA (20 nmoles en 0,2 ml de acetona pura). Luego de 10 días de la iniciación se prosiguió con la promoción mediante la topicación con TPA (3,25 nmoles en 0,2 ml de acetona pura) dos veces por semana durante 16 semanas. A las 12 semanas, tiempo de aparición de los primeros tumores, los animales fueron divididos en 3 grupos experimentales con un total de 20 animales por grupo: (a) tratados con catalasa, (b) controles con catalasa inactivada y (c) controles con PBS. En el grupo (a) se comenzó la inyección de catalasa tres veces por semana (1mg/ gramo de peso del ratón) en días alternados con los tratamientos de promoción y en los controles (b) con catalasa inactivada y (c) con PBS. Se siguió el crecimiento de los tumores una vez por semana. El volumen tumoral se determinó usando la ecuación de un elipsoide $V = 4/3\pi \cdot D_M / 2 \cdot (D_m / 2)^2$, siendo D_M el diámetro mayor y D_m el diámetro menor. El crecimiento se refirió al tamaño que presentaban los tumores al día 0 del tratamiento. El tratamiento con catalasa se llevó a cabo durante 30 días, luego de los cuales los animales fueron sacrificados.

1.2.7 Transfección del cDNA de la catalasa humana en las células MCF-7⁸³

1.2.7.1 Subclonado del cDNA de la catalasa humana en un vector de expresión en células eucariotas.

El vector LK440 conteniendo el cDNA de la catalasa humana fue gentilmente donado por el Dr. Y.S. Ho (Institute of Chemical Toxicology, Wayne State University, Detroit, USA). El cDNA de la catalasa humana se encontraba clonado en el sitio de restricción SalI del plásmido LK440. Este inserto fue liberado luego de la digestión con esta enzima (1 µl de enzima de restricción Sal I (Roche), 1 µg de ADN en un volumen final de 20 µl de buffer TE, pH 8 durante 1 hora a 37°C). Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TE y conteniendo bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Se obtuvo una banda de 1,8 Kb que se corresponde con el tamaño del cDNA de la catalasa humana. Se realizaron varios ensayos de restricción a fin de verificar la integridad del cDNA.

Transformación de bacterias competentes

Se transformaron bacterias competentes de la cepa DH5a mediante el siguiente protocolo: a 100 µl de bacterias competentes (10^8 células/ml, OD₆₀₀ = 0,4 en la fase de crecimiento exponencial) se le agregaron 50 ng de ADN (LKK40 conteniendo el cDNA de la catalasa humana). Las bacterias se dejaron 30 min en hielo, luego 1.5 minutos a 42°C y finalmente se dejaron nuevamente 10 min en hielo. Se añadieron 900 µl de LB bajo mechero y se incubaron 1 hora a 37°C y 1000 rpm de agitación. Posteriormente las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en 100 µl de LB y finalmente se sembraron en placas preparadas con agar-LBA, ampicilina (100 µg/ml). Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C.

Selección de los clones positivos y obtención del cDNA de la catalasa humana.

Se seleccionaron 12 clones y se crecieron en 3 ml medio LB ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche. Se aisló el ADN mediante el siguiente protocolo: se centrifugaron 1.5 ml del cultivo de bacterias 5 min a 6000 rpm. Los pellet se resuspendieron en 100 µl de la solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM pH8, Tris 25 mM pH 8), se dejaron reposar 5 min a TA, y posteriormente se añadieron 200 µl de solución II (10% de NaOH 2 M y 10% SDS 10X). Las muestras se agitaron manualmente y luego se añadieron 150 µl de la solución III

(acetato de potasio 3 M, pH 4,8). Las muestras se agitaron nuevamente manualmente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 min. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se le agregaron 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo:isoamílico 24:1 y se centrifugaron 5 min a 13000 rpm. Se extrajeron los sobrenadantes y se agregó 1 ml de etanol 100% frío para precipitar el ADN. Se centrifugó nuevamente y se hicieron 3 lavados con etanol 70%. Se secaron los restos de etanol a 37 °C, las muestras se resuspendieron en 30 µl de buffer TE 1X y se incubaron con RNAasa (0,5 µg/ µl) durante 30 min a 37 °C. Se realizaron ensayos de restricción con la enzima Sal I como se explicó anteriormente y se seleccionó uno de los clones conteniendo el inserto de 1,8 Kb. Se realizó un cultivo del clon seleccionado en medio LB-ampicilina durante toda la noche y se extrajo el ADN de un cultivo de 250 ml (Plasmid-Maxikit (25), G1AGEN). Se corrieron aproximadamente 5 µg de ADN en un gel de agarosa 1 % y se purificó la banda correspondiente a 1,8 Kb (DNA and Gel Band Purification kit, Amersham Pharmacia, Biotech).

Subclonado del vector de expresión eucariota

Se eligió el vector pBABE (5,1 Kb) para subclonar el cDNA de la catalasa humana a fin de poder expresarlo en células eucariotas. El vector fue digerido con Sal I, y desfosforilado para evitar la religación de los extremos protruyentes del vector (1 hora a 37 °C en presencia de 0.2 U de fosfatasa alcalina de intestino de cabra (CIP) (Roche)). Posteriormente se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se aisló y purificó la banda correspondiente al tamaño de dicho vector (DNA and Gel Band Purification kit, Amersham Pharmacia, Biotech). Posteriormente se ligó el cDNA de la catalasa humana purificado con el vector pBABE mediante el siguiente protocolo: se incubó el cDNA de la catalasa junto al vector pBABE en una relación de 3:1 en presencia de 1 U de la enzima T4 DNA ligasa (Roche) durante toda la noche a 16 °C. Se transformaron bacterias con el producto de ligado y se aislaron 12 clones de los cuales se extrajo el ADN mediante los protocolos descritos anteriormente. Se hicieron mapas de restricción para evaluar la direccionalidad de la inserción de los clones positivos y se seleccionaron aquellos conteniendo el cDNA de la catalasa sentido y antisentido.

1.2.7.2 Transfección y selección de las células MCF-7

Se transfectaron células MCF-7 con vectores retrovirales conteniendo el cDNA de la catalasa humana y el cDNA antisentido. La transfección se realizó mediante el uso de lípidos catiónicos (LIPOFECTAMINE 2000, GIBCO). Previamente se intentó la transfección por precipitación con fosfato de calcio pero no fue exitosa. Las células MCF-7 crecidas al 90 % de confluencias fueron transfectadas de la siguiente manera: se disolvieron 5 µg del vector retroviral conteniendo el inserto y 10 µl de LIPOFECTAMINE 2000 en 500 µl de medio de cultivo sin FBS. La preparación se dejó reposar durante 20 min para permitir la formación de complejos de ADN con los lípidos catiónicos, que luego se agregó suavemente sobre las células. Se adicionaron 2 ml de medio de cultivo complementado con 10% FBS, se dejó reposar durante 4 hs a 37 °C y 5% CO₂ y finalmente se agregaron 3 ml de medio de cultivo complementado. Las células fueron sometidas a presión de selección con el antibiótico genética G418 (0,5 mg/ml) a la 48 hs. La concentración de antibiótico se aumentó gradualmente (incrementos de 0,1 mg/ml por semana) hasta llegar 0,7 mg/ ml. Se seleccionaron clones estables de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa y el cDNA antisentido.

1.2.7.3 Determinación de la actividad de catalasa en las células transfectadas

Se determinó la actividad de catalasa como se describió anteriormente .

1.2.7.4 Caracterización de las células transfectadas

A fin de caracterizar las células transfectadas con el cDNA sentido y antisentido de la catalasa humana se realizaron ensayos clonogénicos, curvas de crecimiento, determinación de incorporación de bromodeoxiuridina, y ensayos de crecimiento de colonias en agar blando como se describió anteriormente.

1.2.8 Estudio de los posibles mecanismos involucrados en la inhibición de la proliferación mediante el secuestro de peróxido de hidrógeno

Dado que existen evidencias experimentales de que el óxido nítrico tiene capacidad citostática, en este trabajo de tesis se lo ha postulado como posible vía involucrada en la inhibición de la proliferación celular mediada por el secuestro de peróxido de hidrógeno. Con este fin, se evaluó si existen variaciones en la producción de óxido nítrico mediante la determinación indirecta de la producción de nitritos en células tratadas con catalasa.

Por otro lado, se analizó la posible reversión de la inhibición de la proliferación mediada por catalasa mediante la incubación simultánea de las células con catalasa y con un inhibidor de la NOS: L-NG-nitroarginina metil ester (L-NAME) por un lado y con un inhibidor de la guanilato ciclasa: 1H-(1,2,4)oxodiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-ona (ODQ) por otro.

1.2.8.1 Determinación de la producción de nitritos en células tratadas con catalasa.

Se sembraron todas las líneas celulares a una densidad de 25×10^4 células en placas de 35 mm. A las 24 hs de crecimiento, se cambió el medio de cultivo por medio sin rojo fenol y se adicionaron 1000 U de catalasa/ml. Al cabo de 48 hs. se evaluó la producción de nitritos mediante la técnica previamente descrita.

1.2.8.2 Experimentos de inhibición de la NOS

Se sembraron 25×10^4 células de todas las líneas celulares en cápsulas de 35 mm. A las 24 hs, se cambió el medio de cultivo y las células se incubaron con CAT(1000-U/ml) y concentraciones crecientes del inhibidor de la NOS, L-NAME (0.01, 0.1, 0.5 y 1 mM). Se evaluó la proliferación a las 24 hs mediante conteo de células.

1.2.8.3 Experimentos de inhibición de la guanilato ciclasa

Se sembraron 25×10^4 células de todas las líneas celulares en cápsulas de 35 mm. A las 24 hs, se cambió el medio de cultivo y las células se incubaron con CAT (1000 U/ml) y concentraciones crecientes del inhibidor de la guanilato

ciclasa, ODQ (0.5, 1 y 5 μ M). Se evaluó la proliferación a las 24 hs mediante conteo de células.

1.2.8.4. Determinación de la producción de nitritos y de la proliferación en presencia de L-NAME y de ODQ en las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana

Se sembraron 25×10^4 células de los clones transfectadas con el cDNA de la catalasa humana (clon 2) y con el cDNA antisentido (clon 12) en cápsulas de 35 mm. A las 24 hs de crecimiento, se cambió el medio de cultivo por medio sin rojo fenol y se las incubó con 0.01, 0.1, 0.5 y 1 mM de L-NAME y con 0.5, 1 y 5 μ M de ODQ. Las células se incubaron durante 48hs, luego de las cuales se determinó la producción de nitritos y se evaluó la proliferación celular por conteo tal como se explicó anteriormente.

1.2.9 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media $\pm$ sd. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias fueron consideradas significativas para $p < 0.01$.

RESULTADOS I

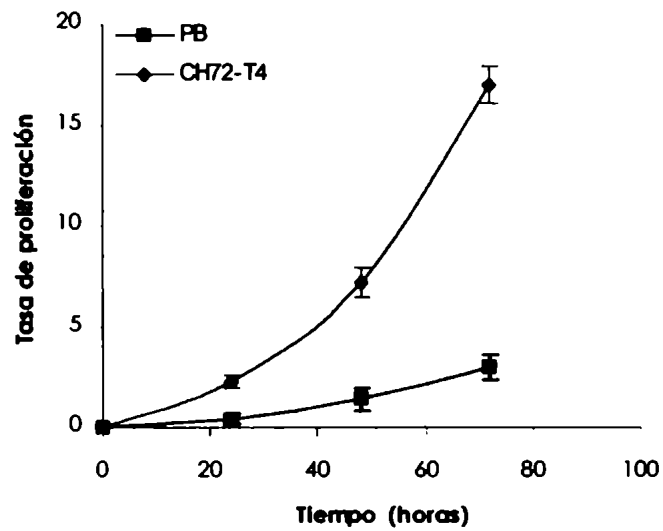
1.3.1 Caracterización de la proliferación y la malignidad de las líneas celulares

En primer lugar en este trabajo, se caracterizaron las líneas celulares utilizadas como modelo de estudio. A pesar de las sucesivas transformaciones que sufre una célula creciendo *in vitro*, y la pérdida de muchas de las características genéticas originales es importante destacar la importancia del "background" genético al comparar las líneas celulares. Cabe señalar entonces, que se tuvo en cuenta el tejido y organismo de origen de las líneas celulares en las comparaciones. Se caracterizó la tasa de crecimiento, la capacidad de formar colonias, la capacidad de crecer independientemente del sustrato y de generar tumores al ser inoculadas en ratones atímicos, a fin de verificar la existencia de diferencias en el grado de malignidad entre las líneas celulares.

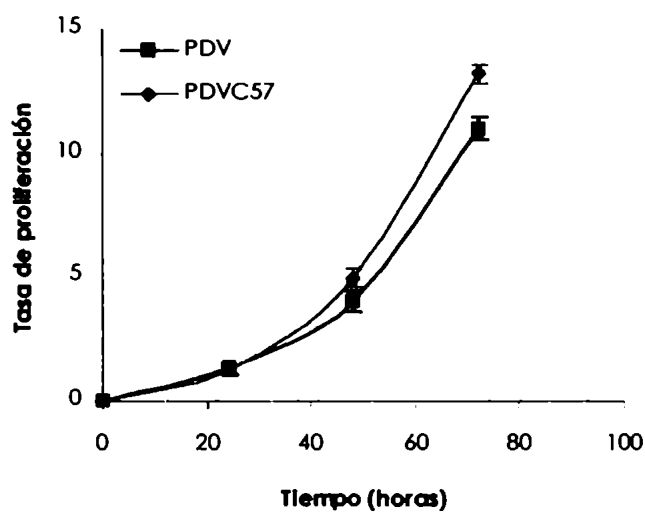
1.3.1.1 Curvas de crecimiento

Se evaluaron las curvas de crecimiento para las líneas celulares utilizadas en este trabajo. Las líneas PB y CH72-T4 difieren significativamente en su tasa de duplicación. La línea celular PB posee un tiempo de duplicación de 35 hs, mientras que el de la línea celular CH72-T4 es de 15 hs. Las líneas celulares PDV y PDVC57 no difieren en su tasa de proliferación, ambas poseen un tiempo de duplicación de 18,6 hs. Las líneas HBL-100 y MCF-7 difieren significativamente en su tasa de duplicación, teniendo la línea HBL-100 un tiempo de duplicación de 30 hs y la línea MCF-7 un tiempo de 25 hs (Figura I.13).

A



B



C

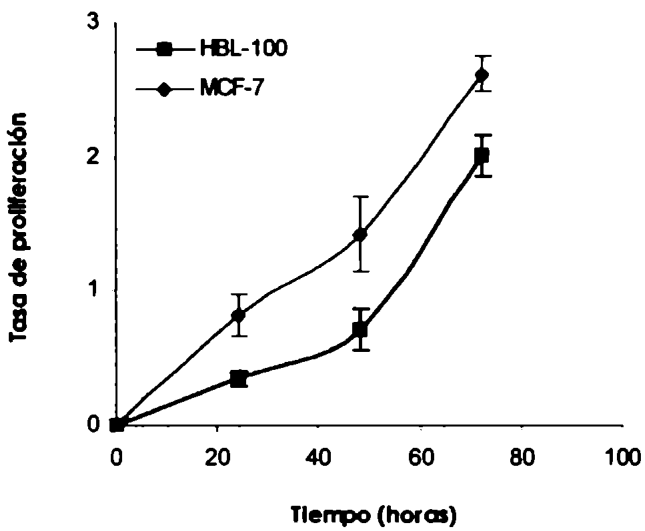


Figura I.13 Curvas de crecimiento de las líneas celulares PB y CH72-T4 (A), PDV y PDVC57 (B), HBL-100 y MCF-7 (C).

1.3.1.2 Ensayo clonogénico y formación de colonias en agar blando

Se evaluó la capacidad de formar colonias mediante el ensayo clonogénico y la capacidad de crecimiento independiente del anclaje a un sustrato mediante el ensayo de formación de colonias en agar blando. Las líneas PB y CH72-T4 mostraron diferencias significativas en ambos ensayos. Las líneas PDV y PDVC57 mostraron diferencias significativas sólo en el ensayo de formación de colonias en agar blando. Las líneas HBL-100 y MCF-7 mostraron diferencias significativas en ambos ensayos (Tabla I.1).

Línea celular	Ensayo clonogénico (colonias formadas/10 ³ células sembradas)	Colonias en agar blando (colonias formadas/10 ⁴ células sembradas)
PB	10 ± 2	0
CH72-T4	350 ± 23	52 ± 5
PDV	380 ± 35	2,3 ± 0,5
PDVC57	401 ± 21	22,5 ± 3
HBL-100	90 ± 17	9,2 ± 2
MCF-7	180 ± 20	65,6 ± 5

Tabla I.1. Ensayo clonogénico y formación de colonias en agar blando de las líneas celulares PB,CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7.

1.3.1.3 Caracterización de la capacidad tumorigénica

Se evaluó la capacidad tumorigénica de las líneas celulares mediante la inoculación en ratones atímicos. Se observaron diferencias entre las líneas celulares CH72-T4 y la línea PB. Los resultados mostraron que la línea CH72-T4 tiene una alta capacidad tumorigénica con un tiempo de latencia de 6 días y un 100% de tumorigenicidad. La línea PB presentó un tiempo de latencia de 50 días y una tumorigenicidad del 50 % de incidencia. Las líneas celulares PDV y PDVC57 difirieron respecto a su capacidad tumorigénica, sin embargo las diferencias observadas no son tan amplias como las que presenta el par

anterior. El tiempo de latencia fue 30 y 20 días para la línea PDV y PDVC57 respectivamente. En la línea PDV se observó la aparición de 8 tumores sobre un total de 14 sitios de inoculación mientras que para la línea PDV se observó la aparición de 12 tumores sobre 12 sitios de inoculación. Con respecto al par de líneas humanas, la línea MCF-7 mostró un 62% de tumorigenicidad observándose la aparición de 5 tumores sobre 8 sitios de inoculación, con un tiempo de latencia de 45 días mientras que la línea HBL-100 no desarrolló tumores hasta los 3 meses, tiempo durante el cual fue seguido el experimento (Tabla 1.2). Estos datos de tumorigenicidad coinciden con los datos bibliográficos mencionados en materiales y métodos.

Línea celular	Tiempo hasta la aparición de tumores de 50mm ³ (días)	Numero de tumores/ Sitios de inyección
PB	50	4/8
CH72-T4	6	8/8
PDV	30	8/14
PDVC57	21	12/12
HBL-100	--	0/8
MCF-7	45	5/8

Tabla 1.2 Capacidad tumorigénica de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7.

Estos resultados mostraron que existen diferencias fenotípicas entre los pares comparativos definidos, que pueden asociarse a diferencias en la malignidad celular y por lo tanto, confirmaron la validez del modelo de estudio.

1.3.2 Caracterización del sistema antioxidante y de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en líneas celulares con diferente grado de malignidad

1.3.2.1 Evaluación de los niveles de enzimas antioxidantes

1.3.2.1.1 Evaluación de enzimas antioxidantes en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57. Antecedentes experimentales

En estudios preliminares, realizados durante el trabajo de seminario de licenciatura, se evaluaron los niveles de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV y PDVC57 derivadas de epidermis de ratón. En ambas series comparativas (PB/CH72-T4 y PDV/PDVC57), se observó un aumento de la actividad de SOD y una disminución de los niveles de enzimas encargadas de la disipación del peróxido de hidrógeno. Esto último genera un desbalance enzimático entre los niveles de SOD y de las enzimas detoxificadoras de H₂O₂ que aumenta en función de la malignidad celular (Tabla I.3).

Línea celular	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GPX (U/mg prot)	SOD/ CAT	SOD/ GPX
Cultivo primario SENCAR	28 ± 1	18 ± 3.4	60,5 ± 2.5	1,55	0,46
PB	52 ± 2.4	16 ± 1.9	49 ± 2.5	3,25	1,06
CH72T4	102 ± 27	6.9 ± 1.3	7,8 ± 0.4	14,7	13
Cultivo primario C57BL/6N	61 ± 5.4	17 ± 9.8	46,5 ± 4.5	3,58	1,31
PDV	115 ± 9.5	1,8 ± 0.5	10 ± 0.01	63	11,5
PDVC57	220 ± 26	2,7 ± 0.2	6,2 ± 1.3	81	35,5

Tabla I.3 Niveles de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx de las líneas celulares PB, CH72T4, PDV y PDVC57

Los datos representan la media ± sd de por lo menos 3 experimentos con n = 3 por experimento.

Estos resultados sugieren la participación del H₂O₂ en el proceso de transformación maligna y sirvieron de base para generar las hipótesis que llevaron al desarrollo de este trabajo de tesis doctoral.

1.3.2.1.2 Evaluación de enzimas antioxidantes en las líneas celulares HBL-100 y MCF-7.

En concordancia con los resultados preliminares obtenidos en las células epiteliales de ratón (Tabla I.3), se observó un aumento de actividad de SOD en la línea celular tumorigénica MCF-7 con respecto a la línea celular no tumorigénica HBL-100. Con respecto a las enzimas disipadoras de peróxido de hidrógeno, CAT y GPx, disminuyeron sus niveles de actividad en las células tumorigénicas MCF-7 con respecto a las células no tumorigénicas HBL-100. El aumento de los niveles de SOD y la disminución de los niveles de CAT y GPx genera un desbalance enzimático que aumenta con la malignidad celular (Tabla I.4).

Línea celular	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GPX (U/mg prot)	SOD/ CAT	SOD/ GPX
HBL-100	20 ± 5	5,4 ± 1.8	20,8 ± 2.9	3,7	0,96
MCF-7	41,5 ± 11	1,4 ± 0.48	3,4 ± 0.7	29,2	12

Tabla I.4 Actividad de enzimas antioxidantes en las células HBL-100 y MCF-7

1.3.2.2 Evaluación de los niveles de peróxido de hidrógeno

Se evaluó la producción de peróxido de hidrógeno en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7 (Figura I.14 A,ByC). Los resultados mostraron una asociación entre el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno y el aumento de la malignidad celular. Las líneas celulares tumorigénicas CH72-T4, PDVC57 Y MCF-7 mostraron una mayor producción de peróxido de hidrógeno con respecto a la líneas celulares PB, PDV y HBL-100 respectivamente. El aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno en

función de la malignidad celular podría ser consecuencia del aumento del desbalance de las enzimas antioxidantes descrito anteriormente. Se observó que las líneas celulares humanas poseen una tasa de producción de peróxido de hidrógeno mayor en comparación con las líneas celulares derivadas de ratón.

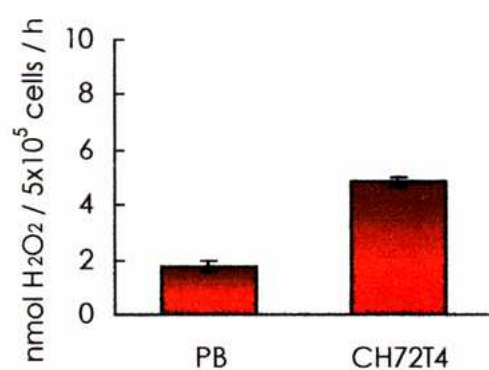
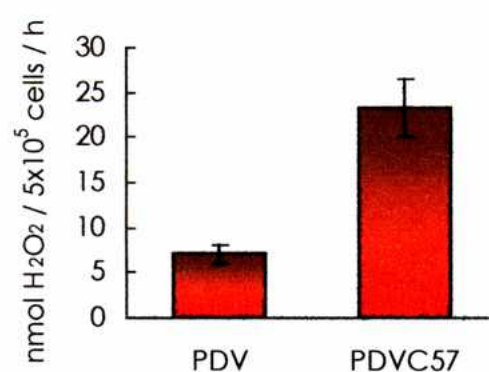
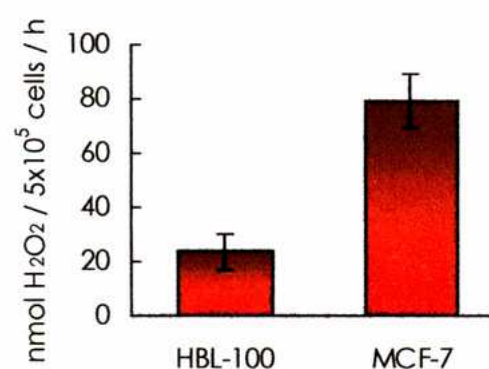
A**B****C**

Figura I.14 Producción de peróxido de hidrógeno de las líneas celulares PB, CH72-T4 (A), PDV, PDVC57(B), HBL-100 y MCF-7(C).

1.3.2.3 Evaluación de la producción de anión superóxido

Se observó una disminución de anión superóxido en las líneas celulares CH72-T4, PDVC57 y MCF-7 con respecto a las líneas PB, PDV y HBL-100 (Figura I.15). Esta disminución de los niveles de anión superóxido en las líneas celulares con mayor capacidad tumorigénica son consistentes con el aumento de los niveles de SOD descritos en estas líneas celulares (Tablas I.3 y I.4).

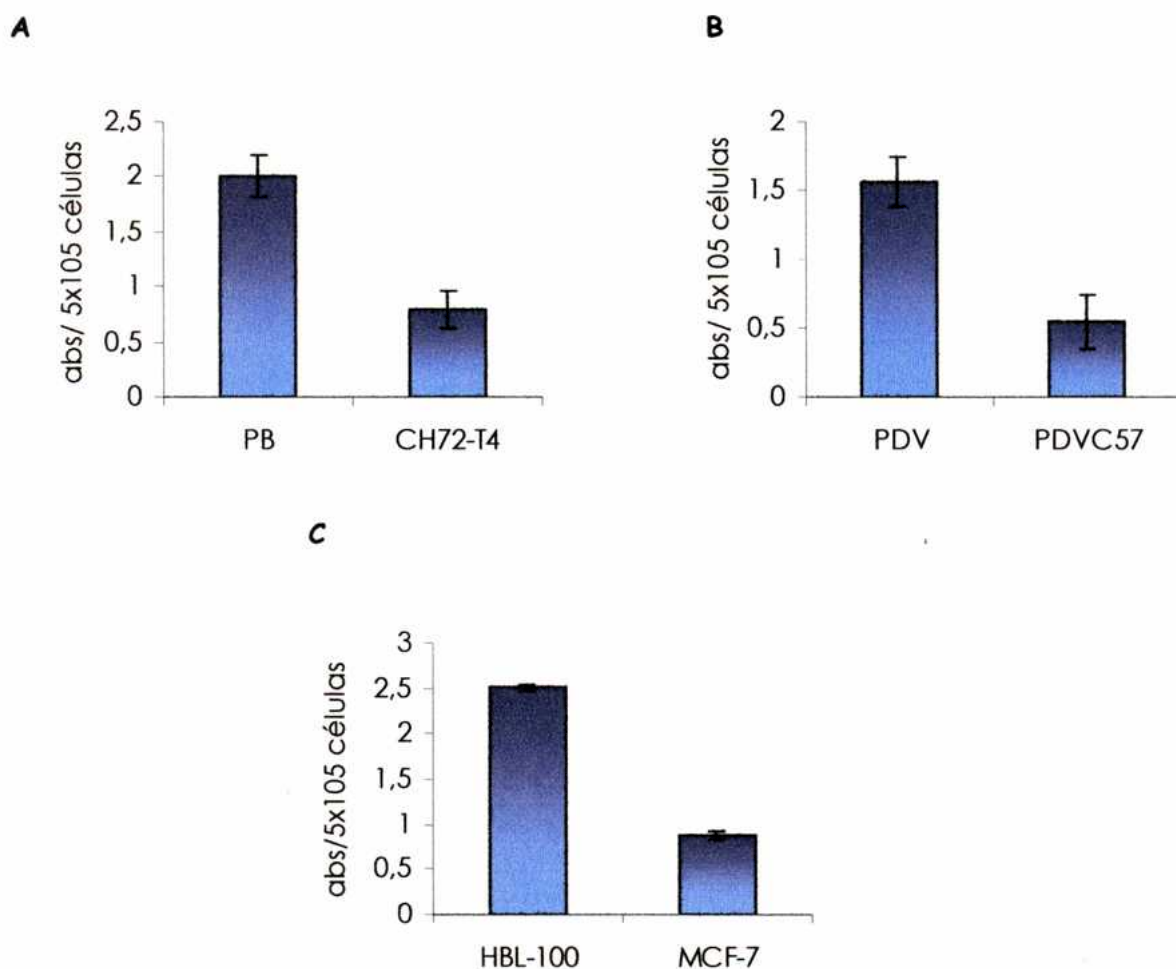


Figura I.15 Producción de anión superóxido de las líneas celulares PB, CH72-T4 (A), PDV, PDVC57(B), HBL-100 y MCF-7(C).

1.3.2.4 Evaluación de la producción de óxido nítrico

Medida de nitritos

Las determinaciones indirectas de la producción de óxido nítrico mostraron una disminución de la producción de nitritos en las líneas con mayor capacidad tumorigénica (Tabla I.5), aunque no se observaron diferencias significativas entre las líneas celulares PDV y PDVC57.

Línea celular	Producción de nitritos (nmoles/5x10 ⁵ células/48hs)
PB	7,5 ± 2,4
CH72-T4	3,4 ± 0,7
PDV	5,6 ± 1,3
PDVC57	8 ± 2
HBL-100	7 ± 0,8
MCF-7	4 ± 0,16

Tabla I.5 Producción de nitritos en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7

1.3.3 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno y evaluación de la proliferación celular.

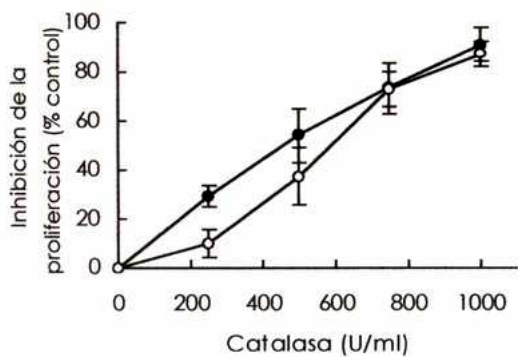
1.3.3.1 Tratamientos de las líneas celulares con catalasa y evaluación de la proliferación celular

A fin de poder evaluar la importancia del peróxido de hidrógeno en la proliferación, las líneas celulares se trataron con distintas concentraciones de catalasa extracelular durante 24 hs (0, 250, 500, 750, 1000 U/ml). La tasa de proliferación se evaluó utilizando el conteo de células, la técnica de MTT y mediante la determinación inmunohistoquímica de la incorporación de bromodeoxiuridina. En todas las líneas celulares se observó una inhibición de la proliferación dependiente de la dosis. (Figura I.16).

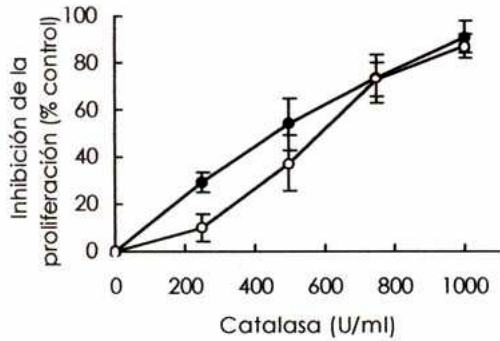
Se observó que con las mismas concentraciones de catalasa exógena aplicadas, se obtienen mayores porcentajes de inhibición de la proliferación en las líneas celulares PB, PDV y HBL-100 con respecto a las líneas celulares CH72-T4, PDVC57 y MCF-7 respectivamente.

1-Líneas celulares PB y CH72-T4

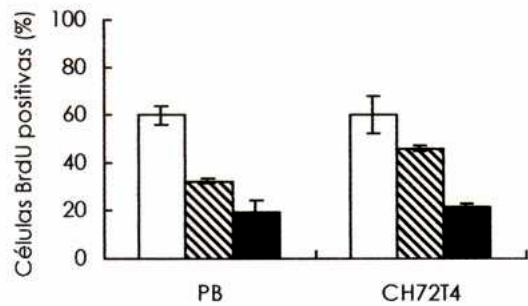
A1



B1

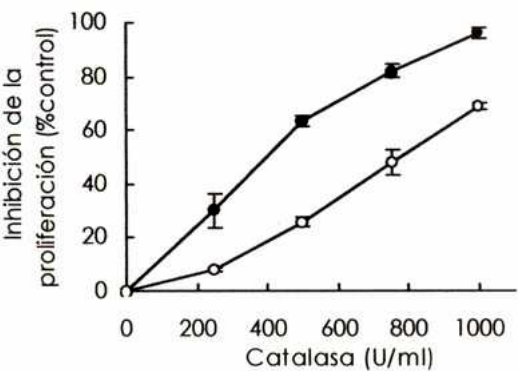


C1

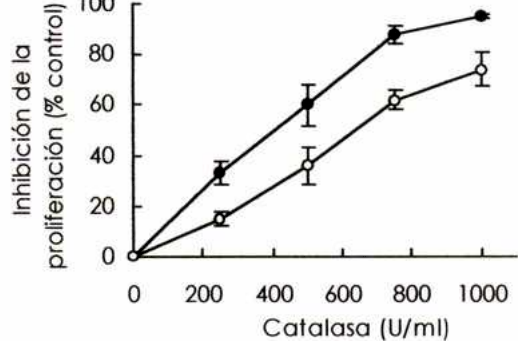


2-Líneas celulares PDV y PDVC57

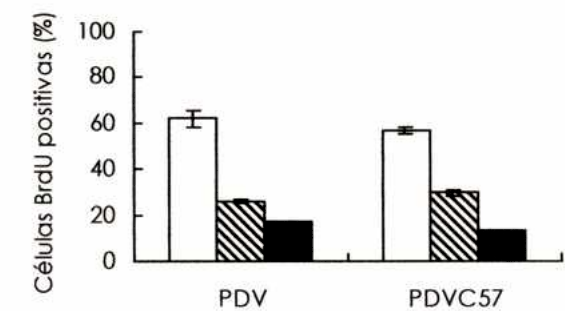
A2



B2

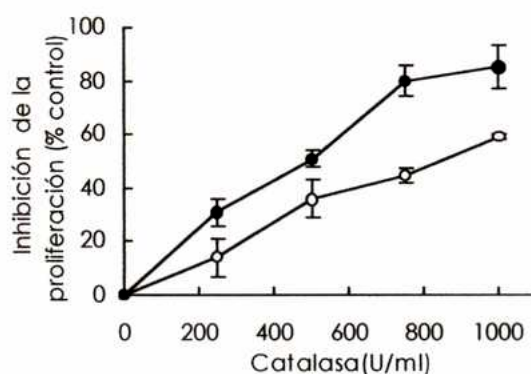


C3

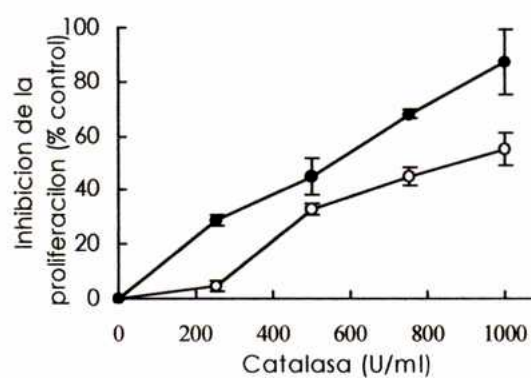


3-Líneas celulares HBL100 Y MCF-7

A3



B3



C3

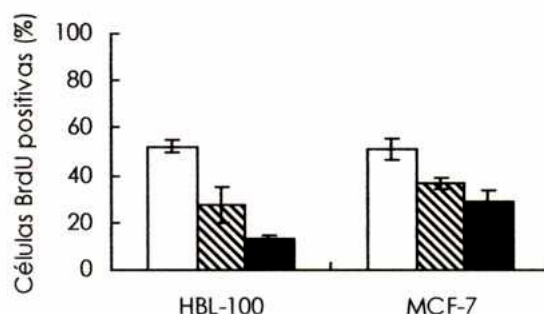
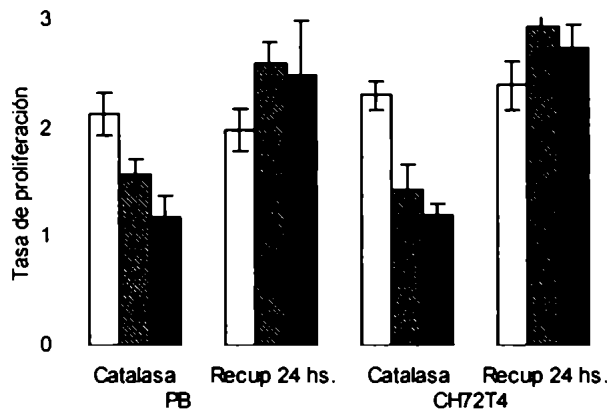


Figura I.16 Inhibición de la proliferación por tratamientos con distintas concentraciones de catalasa (0, 250, 500, 750 y 1000 U/ml) en los pares comparativos PB-CH72-T4 (1), PDV-PDVC57(2), HBL-100-MCF-7(3). La proliferación fue evaluada mediante MTT (A1,A2 y A3), conteo (B1, B2 y B3) e incorporación de bromodeoxiuridina (C1, C2 y C3). (A) y (B): (●) células PB, PDV y HBL-100 y (○) células CH72-T4, PDVC57 y MCF-7. (C) La incorporación de bromodeoxiuridina fue determinada a las 6 hs (▨) y a las 24 hs (■) luego del tratamiento con catalasa, (□) células control.

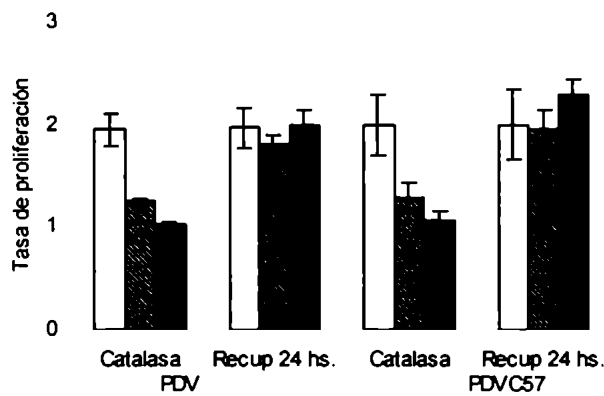
1.3.3.2 Recuperación de la proliferación celular

A fin de determinar un posible efecto citotóxico de la catalasa exógena, se evaluó la capacidad de recuperación de las células luego de los tratamientos con catalasa. Todas las líneas celulares recuperaron la capacidad de proliferar cuando el medio conteniendo catalasa fue cambiado por medio fresco (Figura I.16a)

A



B



C

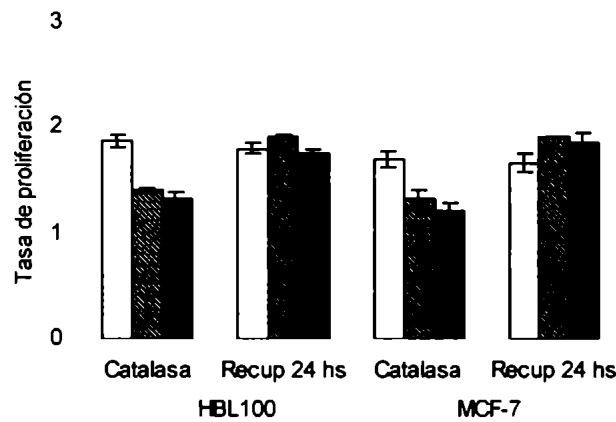


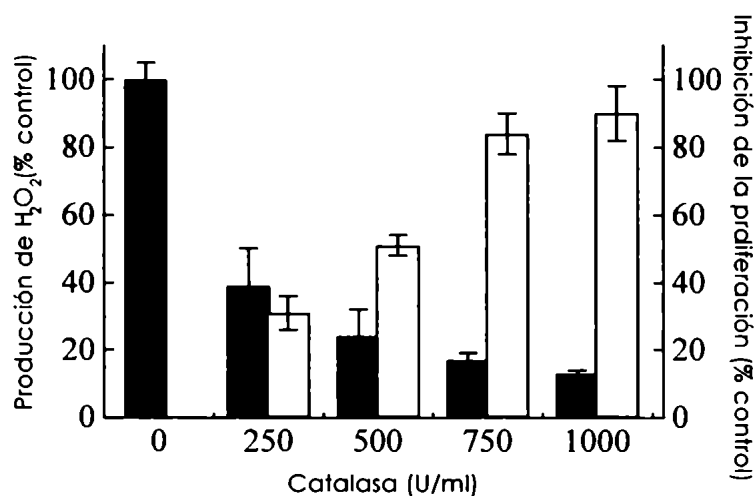
Figura I.16a Recuperación de la capacidad proliferativa de las líneas celulares PB, CH72-T4 (A), PDV, PDVC57 (B), HBL100 y MCF-7 (C) tratadas con catalasa (▨) 500 U/ml and (■) 1000 U/ml, (□) células control.

Este resultado estaría indicando que el secuestro del peróxido de hidrógeno, estaría provocando un efecto citostático sobre las líneas celulares.

1.3.3.3 Concentración de peróxido de hidrógeno en función de la dosis de catalasa

Se determinó la producción de peróxido de hidrogeno en las líneas celulares HBL-100 y MCF-7 en presencia de catalasa. Se evaluó la producción durante 24 hs en presencia de distintas concentraciones de catalasa. Se observó una disminución de la producción de peróxido de hidrógeno dependiente de la dosis de catalasa (Figura I.17).

A



B

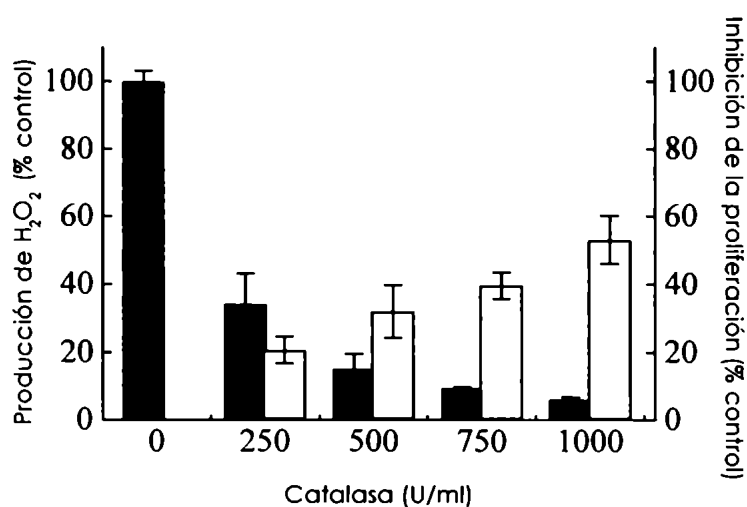


Figura I.17 Producción de peróxido de hidrógeno (■) e inhibición de la proliferación celular (□) en función de la concentración de catalasa presente en el medio extracelular en las líneas (A) HBL-100 y (B) MCF-7.

1.3.3.4 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno e inhibición de la proliferación en otras líneas celulares

A fin de determinar si la inhibición de proliferación celular inducida por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno es un fenómeno general, se evaluó el efecto del secuestro de peróxido de hidrógeno en líneas celulares provenientes de distintos tejidos y especies (Figura I.18).

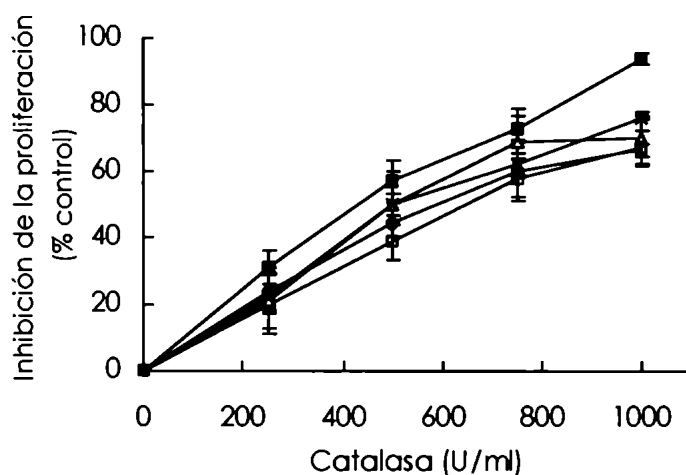
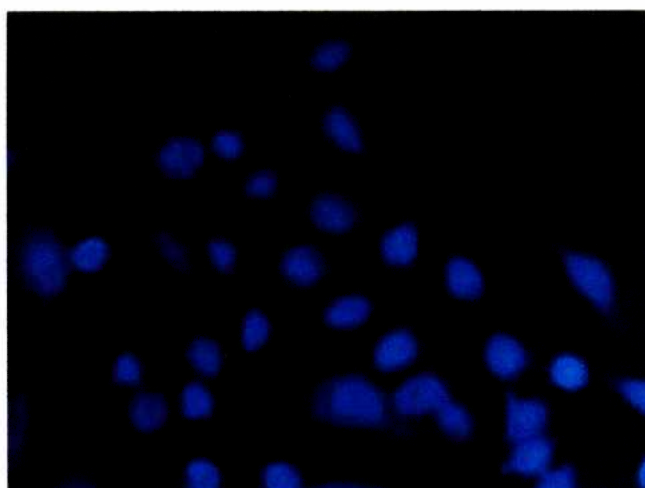


Figura I.18 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno e inhibición de la proliferación en otras líneas celulares. MCA3D (■), Vero (x), PANC1 (o), F98 (□) and UMR106 (Δ).

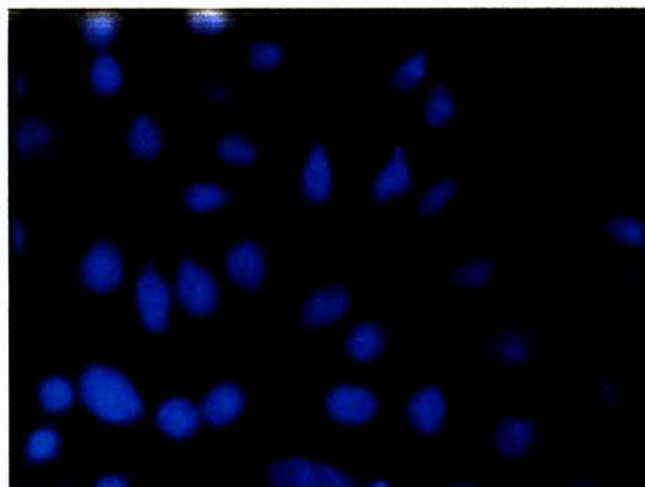
1.3.3.5 Determinación de apoptosis

Se evaluó la posible inducción de apoptosis en las células tratadas con catalasa, a fin de evaluar si la inhibición del crecimiento celular inducida por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno se debía a un aumento de la apoptosis. Los resultados mostraron que no hay aumento de la apoptosis en ninguna de las líneas celulares evaluadas (Figura I.19).

A



B



C

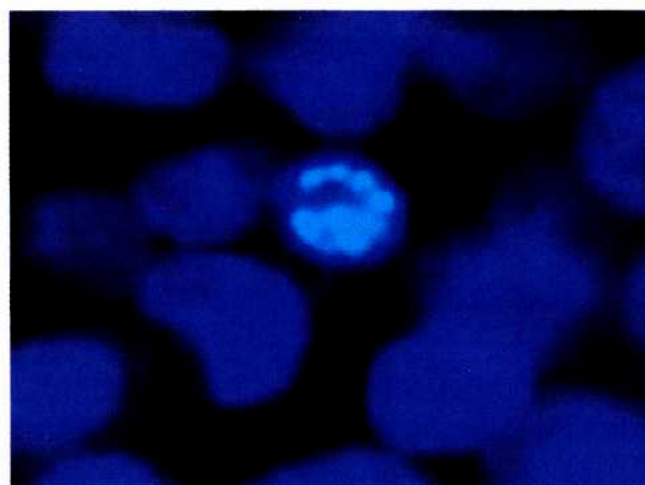


Figura I.19 . Determinación de apoptosis mediante la técnica de Hoechst en células PDV tratadas con catalasa. (A) Células sin tratar (500 X), (B) células tratadas con 1000 U/ml de catalasa (500 X) durante 24 hs, (C) control positivo de apoptosis, células tratadas con genisteína 100 μ M (1500 X).

1.3.4 Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno *in vivo* y evaluación del crecimiento tumoral.

1.3.4.1 Experimento con ratones nude

Se evaluó el efecto de la catalasa en ratones nude inoculados con CH72-T4 como se describió en materiales y métodos. Los animales tratados con catalasa presentaron una tasa de crecimiento tumoral significativamente menor que los controles. Los tumores de los grupos controles crecieron 10 veces más con respecto a los animales tratados con catalasa (Figura I.20). No se observaron diferencias entre los controles tratados con PBS y los tratados con catalasa inactivada.

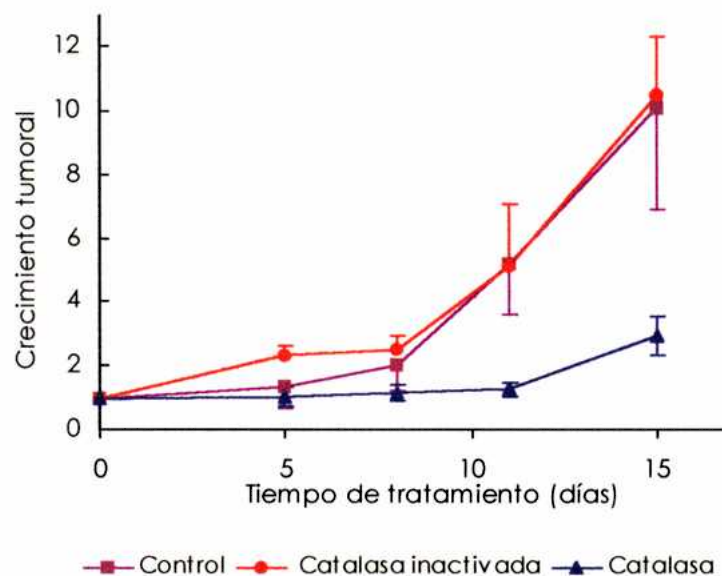


Figura I.20 Crecimiento tumoral en ratones nude tratados con catalasa

1.3.4.2 Experimento de carcinogénesis en ratones SENCAR

Se evaluó el efecto de la catalasa sobre tumores originados en ratones SENCAR a partir de un protocolo de carcinogénesis química. Luego de un mes de tratamiento se obtuvieron los siguientes resultados: se produjo una significativa inhibición del crecimiento de los tumores tratados con catalasa con respecto a ambos grupos control (Figuras I.21 y I.23). Los tumores de los controles crecieron 8 veces más que los tumores del grupo tratado con catalasa. No se observaron diferencias significativas entre los controles

tratados con PBS y los tratados con catalasa inactivada. En el grupo tratado con catalasa no aparecieron tumores nuevos, habiéndose detectado una leve regresión en el número de tumores con respecto al número inicial (Figura I.22).

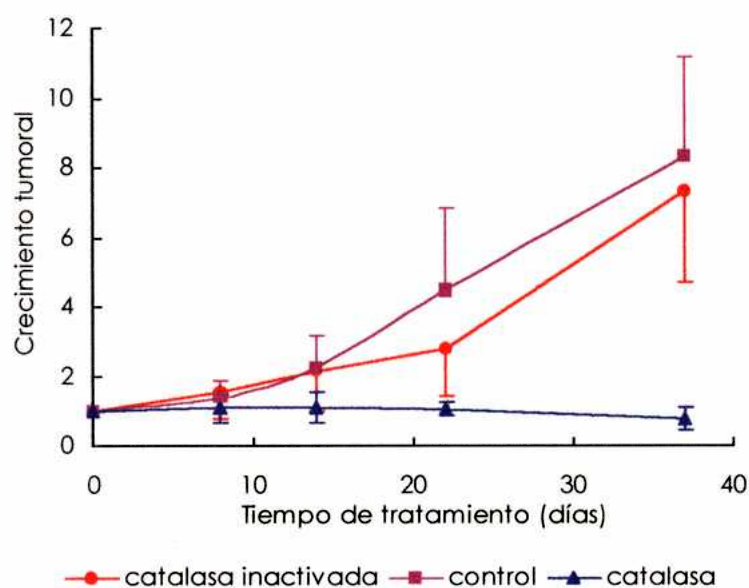


Figura I.21 Crecimiento de tumores en ratones SENCAR tratados con catalasa.

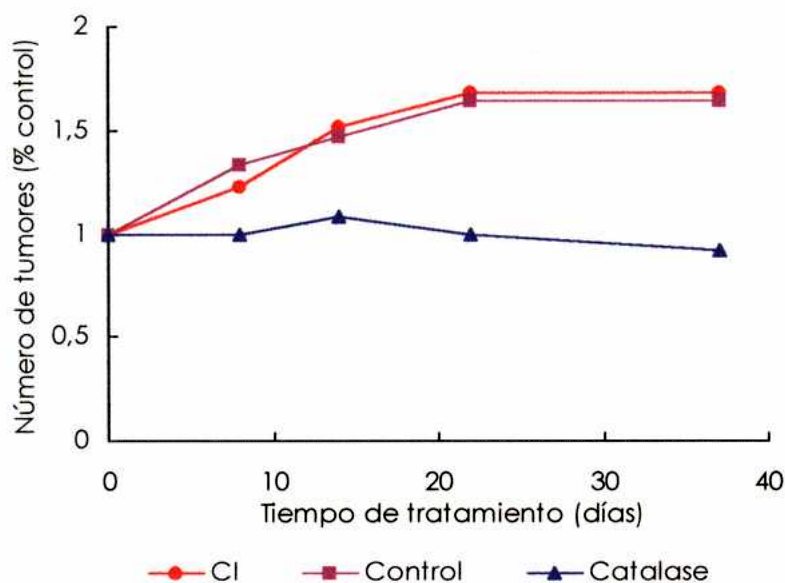


Figura I.22 Evolución del número de tumores de los animales tratados simultáneamente con el protocolo de carcinogénesis química y con catalasa

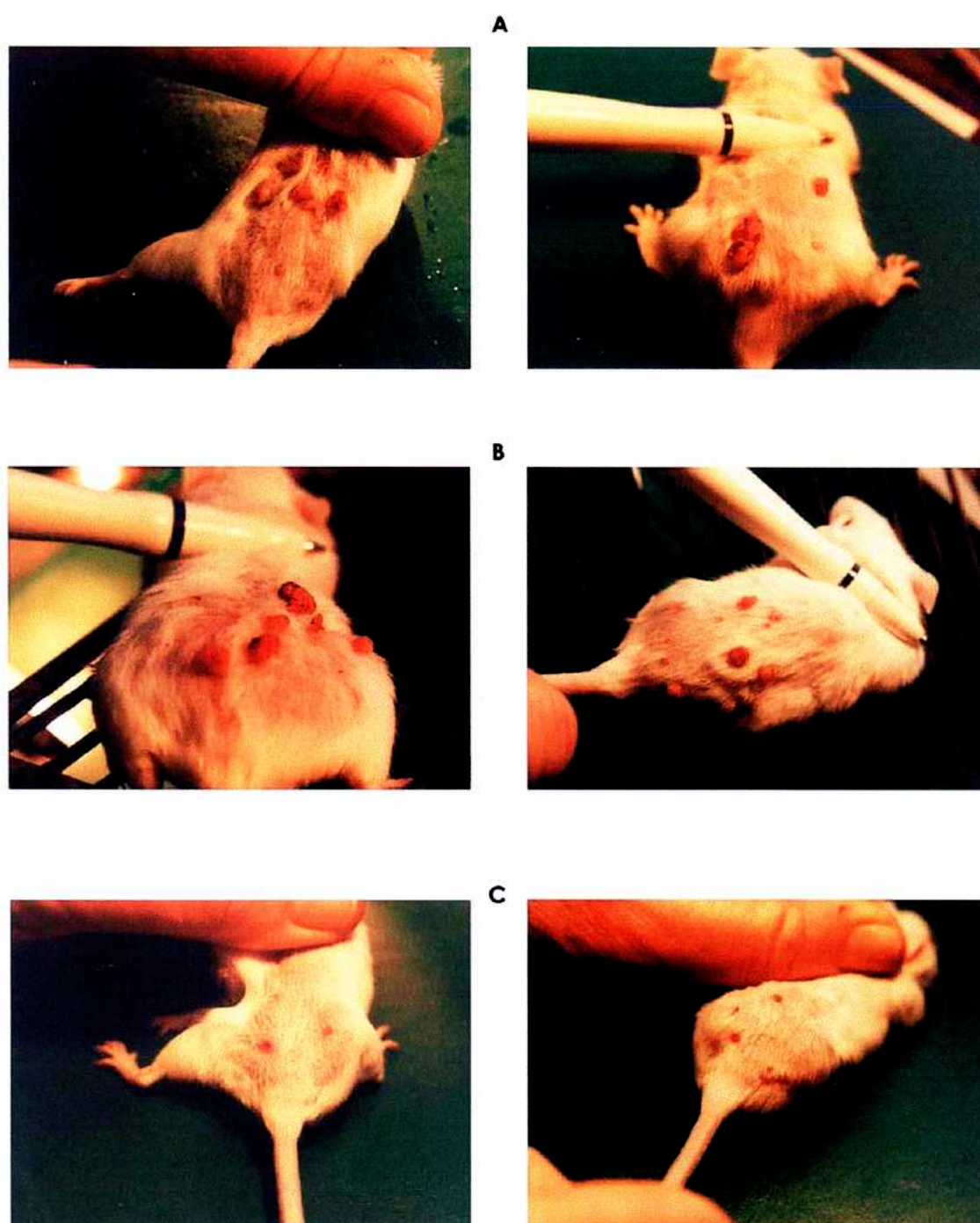


Figura I.23. Ratones SENCAR tratados con catalasa (1mg/gramo de peso) tres veces por semana durante un tratamiento de carcinogénesis química utilizando DMBA como agente iniciador y TPA como agente promotor. (A) Ratones controles inoculados con vehículo (PBS), (B) ratones controles inoculados con catalasa inactivada y (C) ratones tratados con catalasa.

1.3.5 Modulación de la proliferación celular por transfección del cDNA de la catalasa humana.

Las células MCF-7 fueron transfectadas con un vector retroviral conteniendo el cDNA de la catalasa humana y con el cDNA antisentido usado como control. Se seleccionaron clones que expresaron estos vectores de manera estable. Se evaluaron los niveles de catalasa a través de ensayos de actividad de la enzima así como también la producción de peróxido de hidrógeno por ensayos de escopoletina/HPO. Se realizaron ensayos clonogénicos, curvas de crecimiento, incorporación de BrdU y ensayo de crecimiento en agar blando.

1.3.5.1 Evaluación de la actividad de catalasa de los clones seleccionados

Los resultados mostraron que las células transfectadas con el cDNA de la catalasa poseen una actividad de catalasa significativamente mayor con respecto a las células controles (Figura I.24).

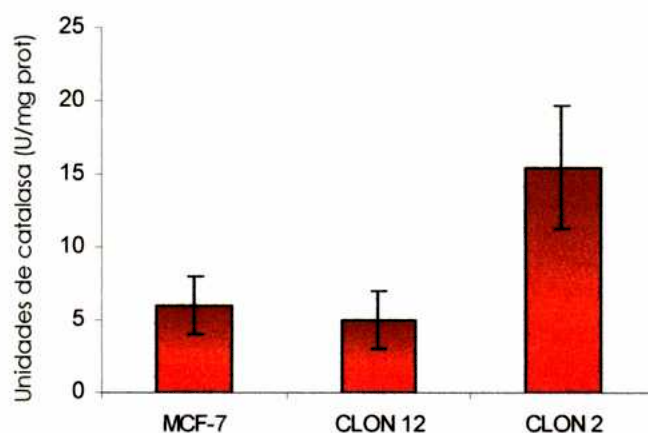


Figura I.24 Actividad catalasa de las células MCF-7 y de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana sentido (CLON 2) y antisentido (CLON 12).

1.3.5.2 Ensayo de clonogenicidad, curva de crecimiento e incorporación de bromodeoxiuridina.

Se evaluó la capacidad de formar colonias mediante el ensayo clonogénico, la curva de crecimiento y la incorporación de BrdU. En los tres ensayos se observaron diferencias significativas entre las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana y las células controles (MCF-7 y células transfectadas con el cDNA antisentido de la catalasa) (Figuras I.25, I.26 y I.27).

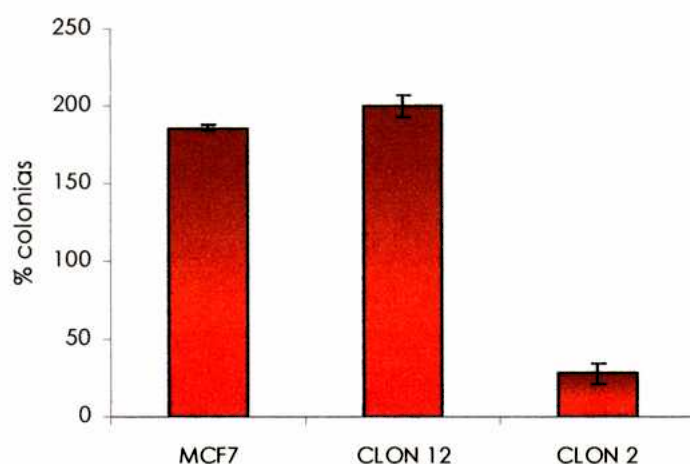


Figura I.25 Ensayo clonogénico de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana (clon 2) y las células controles (MCF-7 y transfectadas con el cDNA antisentido (clon 12)).

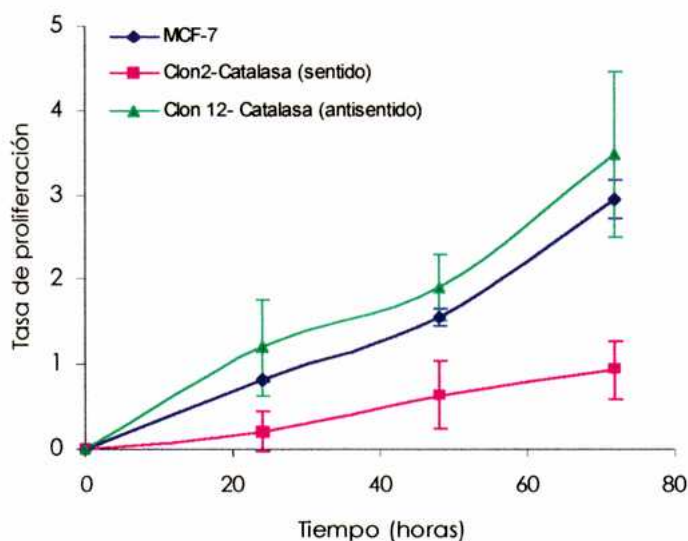


Figura I.26 Caracterización de la curva de crecimiento de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana y las células control (MCF-7 y transfectadas con el cDNA antisentido (clon 12)).

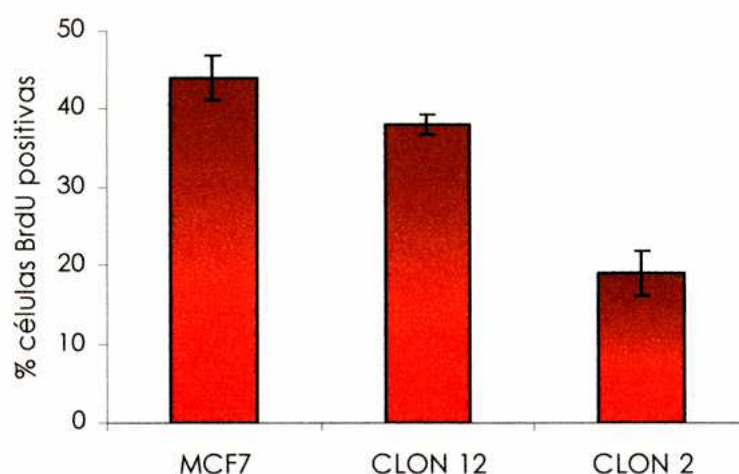


Figura I.27 Actividad proliferativa de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana y las células controles (MCF-7 y las células transfectadas con el cDNA antisentido)

1.3.5.3 Crecimiento independiente de anclaje: crecimiento de colonias en agar blando.

Se evaluó la capacidad de crecimiento independiente de anclaje. Se observaron diferencias significativas entre las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana y las células controles (MCF-7 y las células transfectadas con el cDNA antisentido de la catalasa (clon 12)) (Figura I.28).

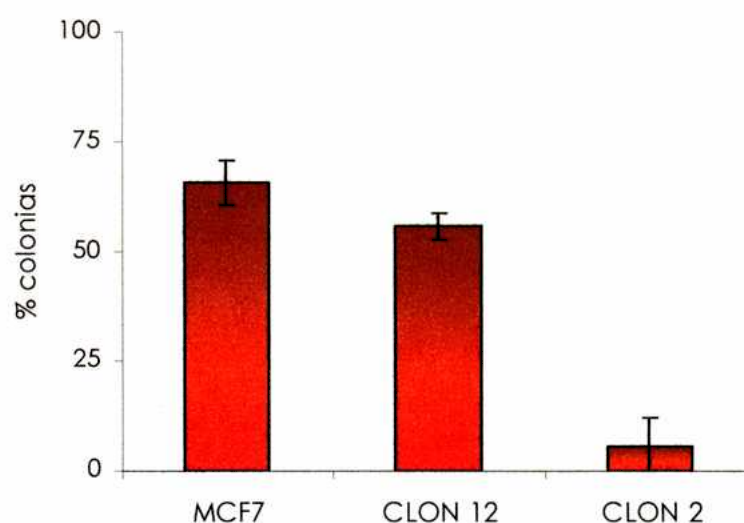


Figura I.28 Crecimiento de colonias en agar blando de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana y las células controles MCF-7 y las células transfectadas con el cDNA antisentido.

1.3.6 Posibles vías involucradas en la inhibición de la proliferación celular por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno

A fin de evaluar si el óxido nítrico está involucrado en las vías de transducción de señales relacionadas con la inhibición de la proliferación como consecuencia de la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno, se realizaron los siguientes experimentos:

1.3.6.1 Caracterización de la producción de óxido nítrico en las células tratadas con catalasa

Los resultados mostraron que todas las líneas celulares tratadas con catalasa aumentan los niveles de óxido nítrico evaluados como producción de nitritos (Tabla I.6). Los controles tratados con catalasa inactivada no mostraron aumento en la producción de nitritos.

Línea celular	Control (nmoles/48hs/5x10 ⁵ células)	Catalasa (nmoles/48hs/5x10 ⁵ células)
PB	7,5 ± 2,4	21,8 ± 3.5
CH72-T4	3,4 ± 0,73	10,8 ± 2
PDV	5,6 ± 1,3	27 ± 11,5
PDVC57	8 ± 2	35 ± 5
HBL-100	7 ± 0.8	29 ± 5
MCF-7	5,2 ± 0.16	10 ± 1

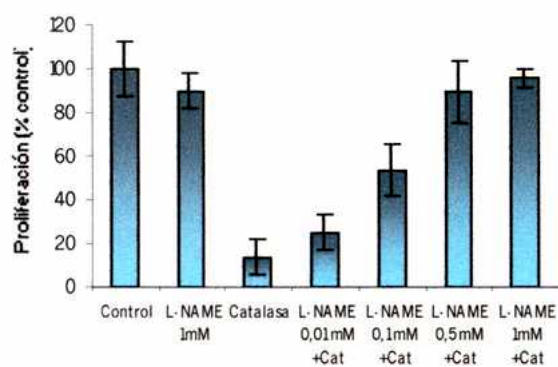
Tabla I.6: Producción de nitritos en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7 tratadas con catalasa (1000 U/ml)

1.3.6.2 Tratamientos de las células con un inhibidor de la NOS.

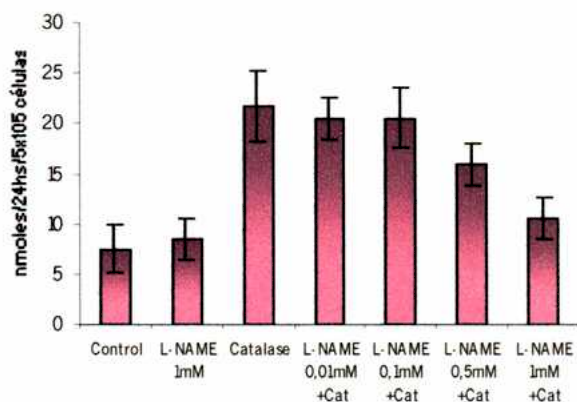
Si el óxido nítrico estuviera directamente relacionado con la inhibición de la proliferación celular inducida por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno, tratamientos de las líneas celulares con un inhibidor de la NOS deberían revertir la inhibición de la proliferación celular por tratamientos con catalasa.

Los resultados mostraron una reversión de la proliferación celular en todas las líneas celulares de forma dosis dependiente al ser tratadas con L-NAME, un inhibidor de la NOS (Figura I.29).

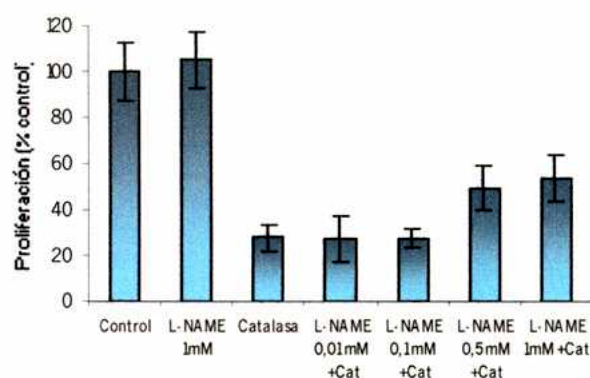
A1



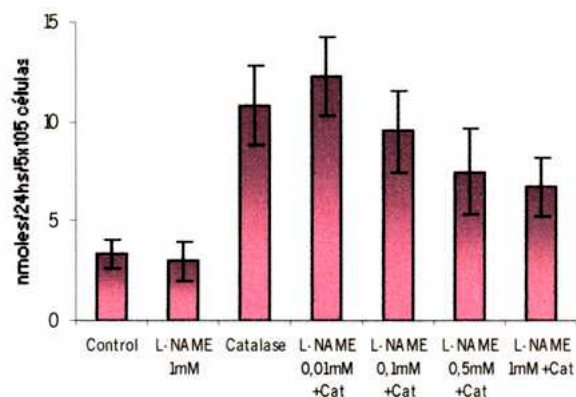
A2



B1



B2



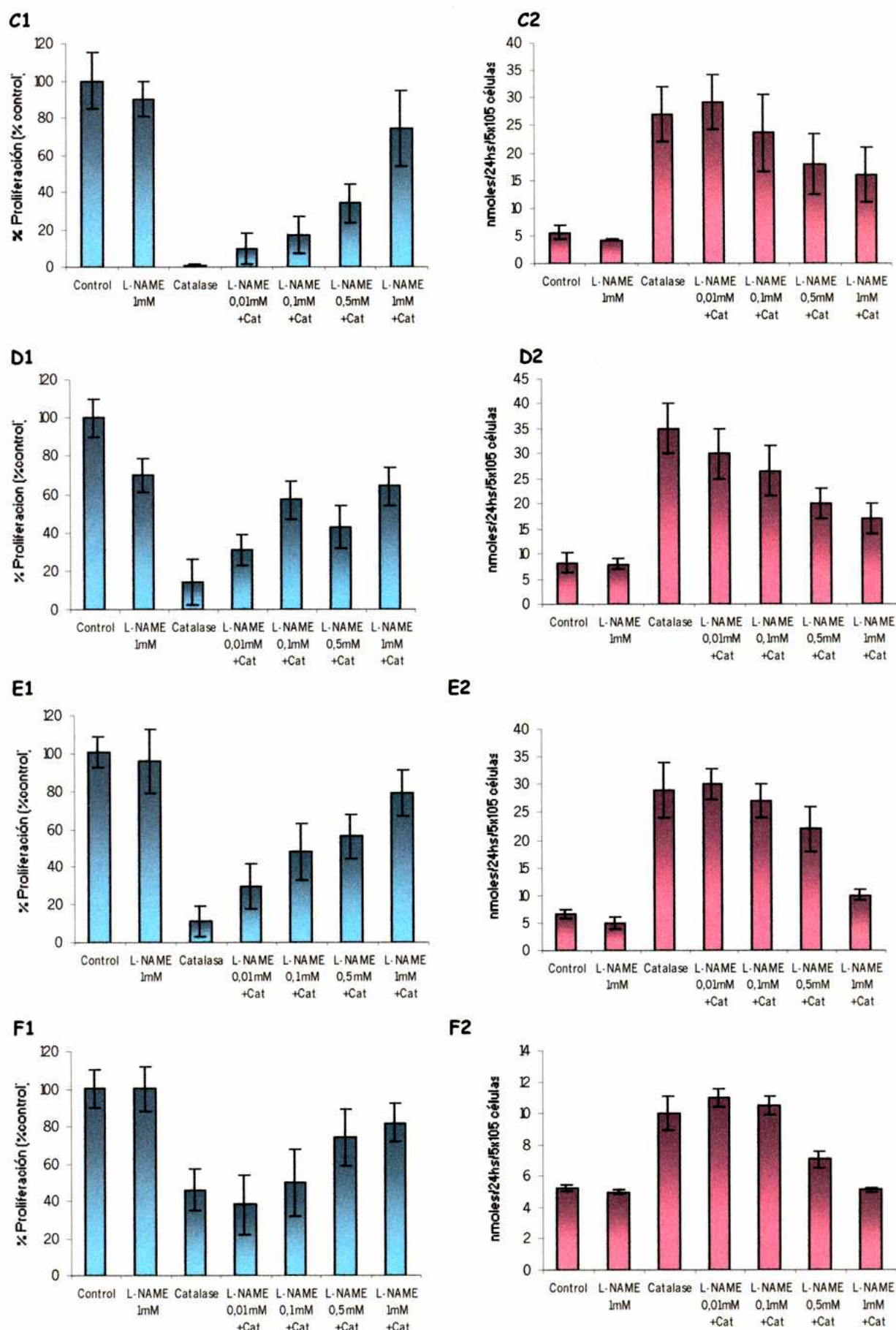


Figura I.29 Reversión de la inhibición de la proliferación (A1-F1) de las líneas celulares y producción de nitritos (A2-F2) en los distintos tratamientos. PB (A), CH72-T4 (B), PDV (C), PDVC57 (D), HBL-100(E) y MCF-7 (F) por tratamientos con L-NAME.

1.3.6.3 Tratamientos con un inhibidor de la guanilato ciclasa

Teniendo en cuenta los resultados de reversión de la inhibición de la proliferación por tratamientos con un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, y siguiendo la misma hipótesis de trabajo se inhibió la guanilato ciclasa, uno de los principales efectores del NO. Si la guanilato ciclasa estuviera involucrada en la inhibición de la proliferación se debería obtener el mismo efecto que en los experimentos anteriores. Los resultados mostraron una reversión total o parcial de la inhibición de la proliferación en todas las líneas celulares al ser tratadas con ODQ, un inhibidor de la guanilato ciclasa (Figura I.30).

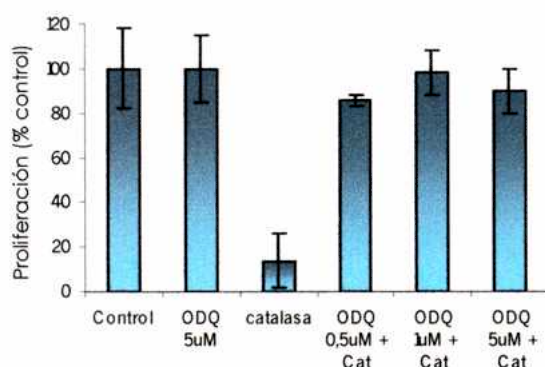
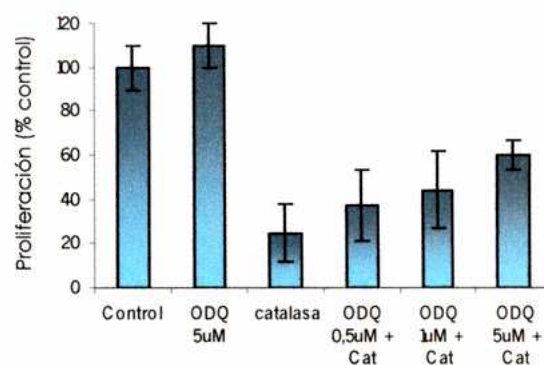
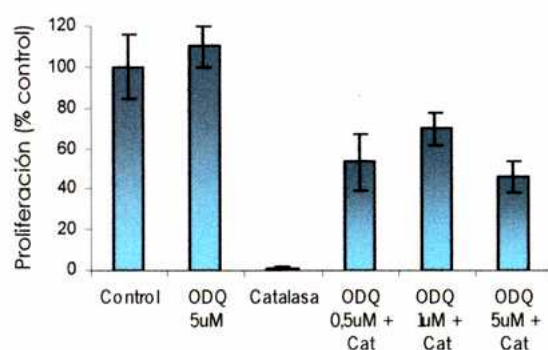
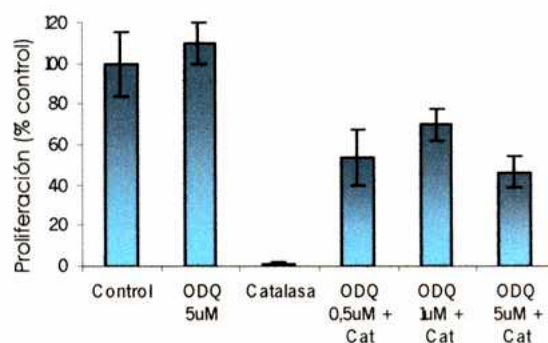
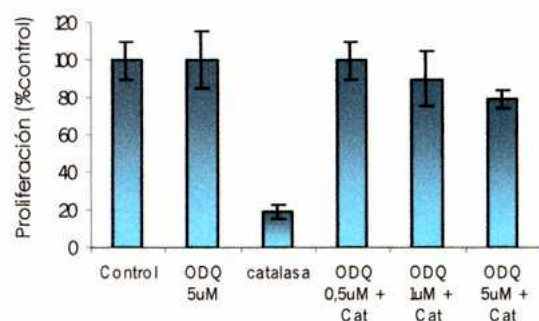
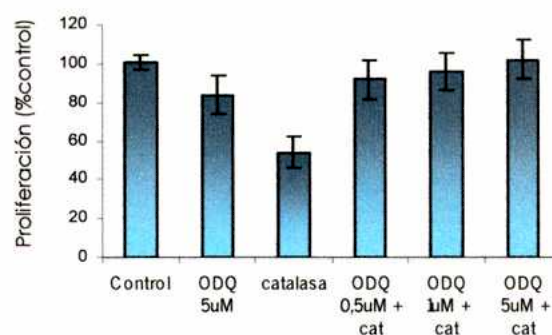
A Líneas PB**B Línea CH72-T4****C Línea PDV****D Línea PDVC57****E Línea HBL-100****F Línea MCF-7**

Figura I.30 Reversión de la inhibición de la proliferación en las líneas celulares PB (A), CH72-T4 (B), PDV (C), PDVC57 (D), HBL-100 (E) y MCF-7(F) por tratamientos con ODQ

Por otro lado, se evaluó la producción de nitritos en las células tratadas con el inhibidor de la guanilato ciclasa para todas las líneas celulares no observándose variaciones en la producción de nitritos. La Figura I.31 muestra la producción de nitritos en la línea MCF-7 a modo de ejemplo.

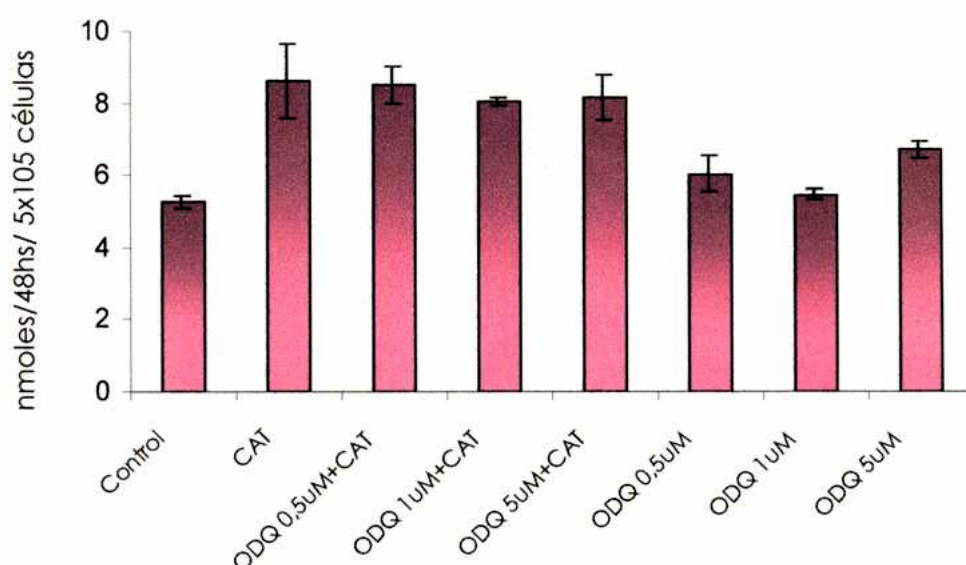


Figura I.31 Producción de nitritos en las células MCF-7 tratadas con catalasa y distintas concentraciones de ODQ

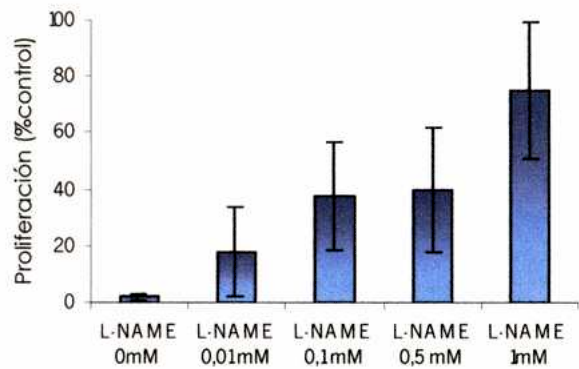
1.3.6.4 Caracterización de la producción de óxido nítrico, evaluación de la proliferación por tratamientos con un inhibidor de la NOS y de la guanilato ciclasa en las células transfectadas con el cDNA de la catalasa.

A fin de confirmar que el óxido nítrico estaría involucrado en la inhibición de la proliferación inducida por una disminución en la producción de H_2O_2 , se evaluó la producción de nitritos en las células transfectadas con la catalasa sentido (clon 2) y antisentido (clon 12). Por otro lado, también se evaluó la proliferación ante tratamientos con el inhibidor de la NOS, L-NAME y con el inhibidor de la guanilato ciclasa, ODQ. Se observó que la producción de nitritos en el clon 2 es significativamente superior que en el clon 12 (Tabla I.7). Con respecto a los tratamientos con L-NAME se observó un aumento de la proliferación en forma dosis dependiente en el clon 2 con respecto al clon 12. (Figura I.32). También se observó una disminución en la producción de nitritos en el clon 2 y no en el clon 12 (Figura I.32). Con respecto a los tratamientos con ODQ también se observó un aumento de la proliferación en el clon 2 con respecto al clon 12 (Figura I.33).

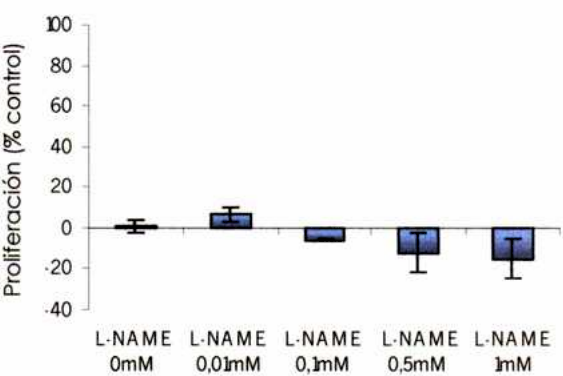
	Producción de nitritos nmoles/48 hs/5x10 ⁵ células
MCF-7	3,02 ± 1,44
CLON 2 (catalasa sentido)	7 ± 2,8
CLON 12 (catalasa antisentido)	2,8 ± 1,13

Tabla I.7. Producción de nitritos en la línea MCF-7 y en las células transfectadas con la catalasa sentido (clon 2) y antisentido (clon 12)

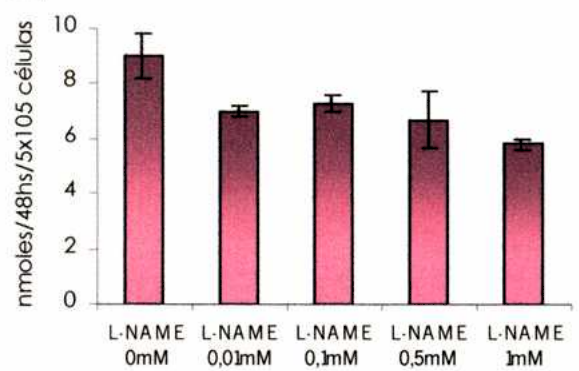
A1 Clon 2 (catalasa sentido)



A2. Clon 12 (catalasa antisentido)



B1.



B2.

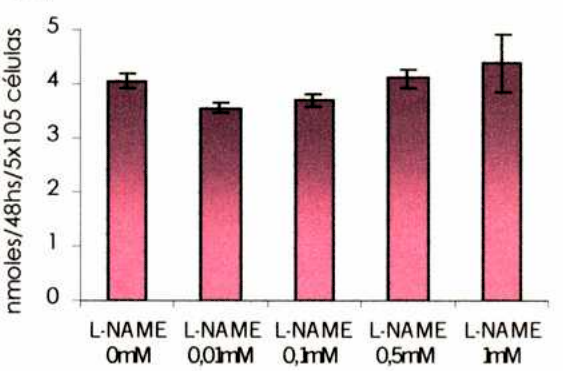


Figura I.32. A Proliferación de las células MCF-7 transfectadas con el cDNA de la catalasa sentido (A1) y antisentido (A2) tratadas durante 48 hs con distintas concentraciones de L-NAME (0,01, 0,1, 0,5 y 1 mM de L-NAME). B Producción de nitritos de los clones 2 (B1) y 12 (B2) durante los tratamientos con L-NAME.

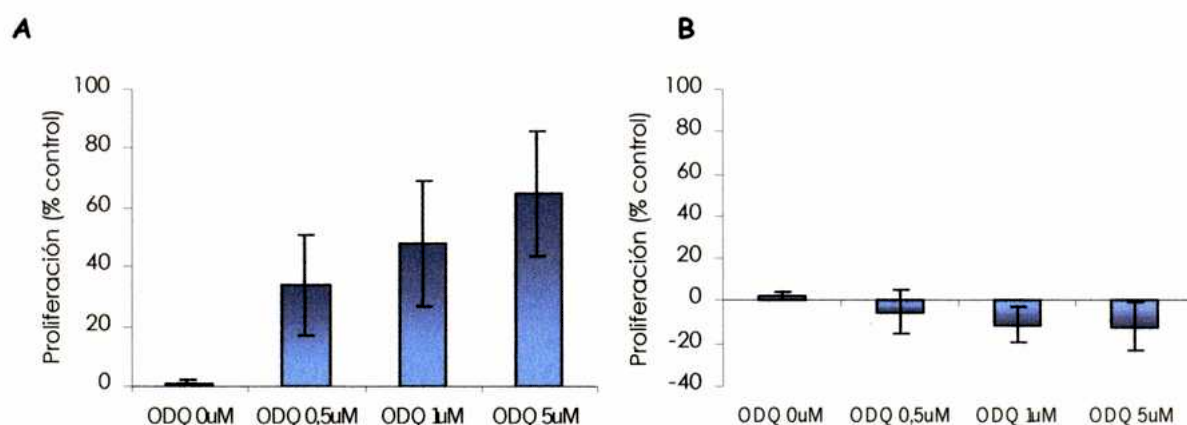


Figura I.33 Proliferación de las células MCF-7 transfectadas con el cDNA de la catalasa sentido (A) y antisentido (B) tratadas durante 48 hs con distintas concentraciones de ODQ (0,5, 1, 5 μ M de ODQ).

A modo de control se verificó la actividad de catalasa comercial en presencia del ODQ a fin de descartar una inhibición de esta enzima por el inhibidor de la guanilato ciclasa. No se observaron variaciones en la actividad de la catalasa comercial en presencia de ODQ.

DISCUSION I

Dado que existen numerosas evidencias que indican que las especies reactivas del oxígeno²⁹⁻³⁸ y del nitrógeno⁴³⁻⁵⁷ juegan un papel importante en la etiología del cáncer, en este capítulo se evaluó si existen modificaciones en los niveles de estas especies reactivas asociadas con la transformación celular, a fin de poder compensar específicamente estas alteraciones oxidativas y revertir el fenotipo maligno.

En primer lugar, se eligieron como modelos de estudio líneas celulares que difieren en su capacidad tumorigénica y se compararon entre sí teniendo en cuenta el tejido y el organismo a partir del cual fueron originadas. Los distintos ensayos realizados tendientes a la caracterización de la capacidad proliferativa y tumorigénica mostraron que los pares comparativos difieren en su grado de malignidad celular y pueden ser usados como modelos de distintos estadios de transformación celular. Los pares PB-CH72-T4 y HBL-100-MCF-7 difieren ampliamente en características fenotípicas relacionadas con la malignidad celular, coincidiendo con datos de la bibliografía⁶⁴⁻⁶⁷. En las líneas celulares PDV y PDVC57 las diferencias en las características fenotípicas asociadas al aumento de la malignidad celular no son tan marcadas como en los otros pares comparativos. Sin embargo, datos bibliográficos muestran que estas líneas difieren significativamente en la capacidad tumorigénica si son inyectadas en ratones singéneos (ratones C57BL/6N)^{61,62}: la línea PDVC57 muestra un 100% de tumorigenicidad a diferencia de la línea PDV que no desarrolla tumores. Por otro lado, características asociadas con el aumento de la capacidad tumorigénica, tales como el número de copias del oncogen ras mutado y los niveles de citoqueratinas de bajo peso molecular asociadas a estados de indiferenciación celular aumentan de forma progresiva en la línea celular PDVC57 con respecto a la línea celular PDV⁶¹⁻⁶³. Teniendo en cuenta estas evidencias bibliográficas también sería válida la utilización de este par comparativo como modelo de estudio.

Caracterización del sistema antioxidante y producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en líneas celulares con diferente grado de malignidad

Como se explicó anteriormente, la concentración de las distintas especies reactivas del oxígeno depende básicamente del balance entre la velocidad de su producción y la velocidad de su disipación. En este sentido, el sistema antioxidante juega un papel crucial en la regulación de la concentración intracelular de las especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, sutiles variaciones en sus componentes podrían ser una fuente potencial para la modificación de la concentración intracelular de estas especies reactivas.

Existen numerosos trabajos que describen variaciones en los niveles de enzimas antioxidantes asociadas con la transformación celular. Oberley y Buettner en 1979, propusieron que una disminución en las enzimas antioxidantes y el concomitante incremento de los niveles de radicales libres podrían explicar muchas de las propiedades de las células cancerosas⁸⁴. Esta hipótesis, esta basada principalmente en los bajos niveles de enzimas antioxidantes encontrados en tumores con respecto a sus contrapartes normales. Por otro lado, existen otras evidencias más recientes que sustentan esta hipótesis, tales como la disminución de los niveles de enzimas antioxidantes en otros tumores y líneas celulares^{85,86} y la depresión de los niveles de enzimas antioxidantes causada por la aplicación de promotores tumorales como el TPA⁸⁷ o de agentes carcinogénicos como la luz UV⁸⁸. Sin embargo, en la década de los 90 Cerutti postula que niveles de enzimas antioxidantes elevados otorgarían una ventaja selectiva contra la toxicidad generada en los procesos de estrés oxidativo⁸⁹. Este nuevo enfoque está basado en estudios comparativos de la respuesta de dos clones derivados de la línea celular JB6 a la aplicación de agentes oxidantes con capacidad promotora⁹⁰. Los compuestos oxidantes estimulan la expansión clonal en uno de los clones (lo que equivale a la etapa de promoción) mientras que se generan efectos citotóxicos en el segundo. Asociado a estas características, el clon promovible expresa mayores niveles de SOD y CAT comparado con el clon no promovible. De este modo, aquellas células con altos niveles de enzimas antioxidantes tendrían favorecida la expansión clonal durante la promoción tumoral. Actualmente esta hipótesis, también esta sustentada por otros trabajos más

recientes que describen elevados niveles de enzimas antioxidantes en líneas tumorales con respecto a sus contrapartes normales^{91,92}. Todos estos estudios muestran grandes controversias de resultados, que dificultan la comprensión del rol que cumplen las enzimas antioxidantes en la carcinogénesis. Una de las razones de esta disparidad de resultados reside en que el sistema antioxidante está formado por múltiples componentes que interactúan entre sí, siendo dificultosa la comprensión del papel biológico de cada uno de ellos de forma independiente. Otros factores importantes que contribuyen a la variabilidad de los resultados presentados en la literatura son por ejemplo, las comparaciones de los niveles de enzimas antioxidantes entre líneas celulares de orígenes diferentes en los modelos *in vitro*, y por otro lado las determinaciones de los niveles de enzimas antioxidantes en extractos de tumores. Estas medidas pueden no reflejar los valores reales de actividades enzimáticas de las células tumorales debido a la heterogeneidad del tejido tumoral, por ejemplo, los tumores generalmente poseen aumentada la secreción proteica de matriz extracelular y por lo tanto, los valores de actividad enzimática expresados por miligramo de proteínas totales estarían subestimando los niveles de actividad por célula.

Del análisis de los diferentes componentes del sistema enzimático antioxidante en función de la malignidad celular realizado en este trabajo de tesis, se demostró que existe un desbalance de las enzimas antioxidantes, que aumenta con la malignidad celular. Se observó un aumento de los niveles de SOD y una disminución de las enzimas disipadoras de peróxido de hidrógeno, CAT y GPx. Estos resultados concuerdan con trabajos previos, que describen un desbalance en el sistema antioxidante en células de melanoma con respecto a melanocitos normales⁹³ y en células cancerosas de pulmón en relación a su contraparte normal⁹⁴. Sin embargo, no hay trabajos que correlacionen el desbalance enzimático con un consecuente incremento de los niveles de peróxido de hidrógeno y el aumento de la malignidad celular. En este sentido, los resultados aquí descriptos mostraron que el desbalance enzimático se asocia con un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno y con el aumento de la malignidad celular en los tres modelos de líneas celulares comparativas.

El aumento de la producción de peróxido de hidrógeno en función de la malignidad celular podría ser consecuencia del aumento de los niveles de actividad de SOD y de la disminución de las enzimas disipadoras de peróxido de hidrógeno, CAT y GPx. Existen varios trabajos que describen un aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno como consecuencia de la sobreexpresión de SOD⁹⁵⁻⁹⁷, sin embargo existe un sólo trabajo hasta el momento que describe una disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno con un aumento de los niveles de SOD⁹⁸. Gardner et al, desarrolló un modelo matemático que explica como un aumento en la actividad de SOD puede llevar a un incremento o una disminución de la producción celular de H₂O₂⁹⁹, dependiendo del balance entre las distintas vías intracelulares de consumo de anión superóxido, que pueden llevar o no a la formación de H₂O₂. Además de la posible incidencia del aumento de la actividad de SOD sobre el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno, la disminución de las actividades enzimáticas de CAT y GPx, que son de gran importancia en la remoción del H₂O₂, contribuyen al incremento de los niveles de peróxido de hidrógeno en función de la malignidad. Por otro lado, Gardner en su trabajo también menciona que los incrementos de H₂O₂ son siempre menores a los aumentos de SOD, sin embargo, en este trabajo de tesis los incrementos de H₂O₂ son superiores a los incrementos de SOD. Esto último podría explicarse teniendo en cuenta que en el modelo descrito por Gardner se considera que no se modifica la disipación del peróxido de hidrógeno, variable que sí se modifica en los modelos celulares descritos en este trabajo por la disminución de las actividades de CAT y GPx.

Los resultados expuestos en este trabajo de tesis muestran la importancia de la relación entre los distintos componentes del sistema antioxidante en la transformación celular. Es importante recalcar que el desbalance aquí descrito es propio del proceso de transformación celular espontáneo o inducido por los protocolos de carcinogénesis, lo cual sugiere que las modificaciones en los niveles de enzimas antioxidantes podría ser uno de los mecanismos involucrados en generar las condiciones celulares que favorezcan la aparición del fenotipo maligno.

A pesar de que el aumento de SOD en función de la malignidad celular es consistente con el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno, los

niveles de SOD en las distintas líneas celulares y los incrementos en los niveles de SOD en función de la malignidad no se correlacionan comparativamente con la producción de peróxido de hidrógeno de las distintas líneas celulares. Las líneas PB-CH72-T4, y PDV-PDVC57 poseen altos niveles de SOD, sin embargo producen cantidades menores de H_2O_2 comparativamente a las líneas humanas que poseen cantidades menores de SOD y producciones mayores de H_2O_2 . Las variables que influyen en los niveles de peróxido de hidrógeno en una célula son diversas y no dependen solamente de los niveles de enzimas antioxidantes, sino que resultan del balance entre las fuentes de producción y todos los componentes del sistema antioxidante, enzimáticos y no enzimáticos. Variaciones en los niveles de otras moléculas relacionadas con el control del estado oxidativo celular, tales como el glutatión o las vitaminas C y E, o diferencias en el sistema de oxido-reducción del glutatión que lleve a valores diferentes de glutatión reducido / glutatión oxidado (GSH/GSSG) podrían contribuir de manera diferencial a los niveles celulares estacionarios de H_2O_2 en las distintas líneas celulares. Por lo tanto, el análisis simultáneo de todos los componentes del sistema antioxidante y su contribución relativa al estado oxidativo celular sumado a la caracterización de las fuentes que generan cada una de las especies reactivas del oxígeno, es de sumo interés para la mejor comprensión de la función fisiológica de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno y de su participación en condiciones patológicas, como el cáncer.

Con respecto a la producción de anión superóxido, se observó una disminución en las líneas celulares con mayor capacidad tumorigénica con respecto a sus pares comparativos. Esta disminución de los niveles de producción de anión superóxido en estas líneas es consistente con el aumento de actividad de SOD. Cuantitativamente se observa que en los tres pares comparativos, la actividad de SOD aumenta aproximadamente un 100% en la línea con mayor grado de malignidad respecto a su par comparativo mientras que los niveles de producción de anión superóxido disminuyen aproximadamente un 60% entre estas líneas.

Con respecto a las especies reactivas del nitrógeno, se ha evaluado la producción de nitritos como medida indirecta de la producción de NO $\cdot$. Los resultados mostraron una disminución en la producción de nitritos en función de la malignidad celular. Estos resultados son consistentes con datos bibliográficos que han descrito una disminución de los niveles de las distintas NOS en algunos tumores, por ejemplo en mama^{50,51}. Sin embargo, también se ha descrito un aumento de NOS en otros tipos de tumores^{52,53}. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el hecho de que según los niveles de concentraciones celulares de NO $\cdot$, este puede actuar como mediador intracelular, por ejemplo en vías antiproliferativas, o a altas concentraciones puede ser tóxico y mutagénico favoreciendo de esta manera los eventos de la transformación celular.

Se puede mencionar como primera conclusión de este capítulo que existe un aumento del desbalance de las enzimas antioxidantes y un consecuente incremento de los niveles de peróxido de hidrógeno asociados a un aumento de la malignidad celular. En este sentido, trabajos previos demostraron que el H $_2$ O $_2$ juega un papel importante en la proliferación celular. Estos trabajos se podrían clasificar en dos grupos, aquellos que modulan la proliferación celular mediante la adición exógena de peróxido de hidrógeno o mediante un aumento de peróxido de hidrógeno producido por determinados tratamientos bioquímicos y aquellos que modulan los niveles de peróxido de hidrógeno y la proliferación celular mediante manipulación genética (transfecciones celulares, ratones transgénicos o "knock out"). Dentro del primer grupo se encuentran los trabajos de Burdon, donde tratamientos con H $_2$ O $_2$ incrementan la proliferación de fibroblastos de hamsters (BHK/21)³⁴ y trabajos donde se demuestra que el peróxido de hidrógeno producido durante la actividad de gamma glutamil transpeptidasa está involucrado en la prevención de la apoptosis y mantiene la proliferación celular en monoblastos¹⁰⁰. Dentro del segundo grupo se encuentran los trabajos de Brown donde se inhibe la proliferación de células musculares lisas mediante la sobreexpresión del gen de la catalasa¹⁰¹ y los trabajos de Suh donde la sobreexpresión de Nox1¹⁰² (una NADPH oxidasa, que genera anión superóxido con generación secundaria de peróxido de hidrógeno) en células NIH3T3

produce un aumento de la proliferación que se asocia al aumento de los niveles de anión superóxido. Posteriormente, los mismos autores demuestran que la cotransfección de catalasa en las células transfectadas con Nox1 revierte el aumento de la proliferación demostrándose de este modo que este aumento se debe a un incremento de peróxido de hidrógeno y no de anión superóxido¹⁰³. Por otro lado, la sobreexpresión específica de catalasa en hígado inhibe la inducción de proliferación provocada por inductores de la proliferación de peroxisomas ¹⁰⁴.

Además de los trabajos citados que vinculan directamente al peróxido de hidrógeno con la proliferación celular, también existen evidencias indirectas que relacionan al peróxido de hidrógeno con vías de transducción de señales relacionadas con la proliferación celular. El peróxido de hidrógeno está involucrado en la regulación de la fosforilación de tirosinas kinasas y tirosinas fosfatasas independientemente de las señales extracelulares¹⁰⁵, modifica la unión al DNA de factores de transcripción, tales como p53, AP1, NFκB¹⁰⁶, por la óxido reducción reversible de sus sulfhidrilos, induce el acoplamiento de proteínas adaptadoras entre receptores tirosina quinasas y la proteína p21³⁸ y activa las MAPK ERK1 y ERK2 en células de músculo liso en arteria pulmonar³⁸. Recientemente se ha demostrado que el peróxido de hidrógeno induce transformación de hepatocitos activando el receptor de crecimiento epidérmico¹⁰⁷. Sin embargo, los trabajos de Oberley involucran al peróxido de hidrógeno en un papel totalmente opuesto. En sus trabajos, Oberley demuestra la inhibición de la proliferación celular en varios tipos celulares por la sobreexpresión de MnSOD^{108,109} o de Cu,Zn SOD¹¹⁰ y el aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno. Por otro lado, también demuestra que la cotransfección de GPx en las células transfectadas con MnSOD aumenta la proliferación celular por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno¹¹¹.

Cambios sutiles en los niveles de peróxido de hidrógeno pueden provocar efectos celulares muy diversos. Las especies reactivas del oxígeno se han vinculado en vías de transducción de señales relacionadas con distintos eventos fisiológicos¹¹²: Concentraciones de peróxido de hidrógeno del orden nanomolar son necesarias para la actividad de la ciclooxigenasa, para la

biosíntesis de prostaglandinas. Concentraciones apenas superiores, están relacionadas con la apertura de canales, fosforilación de tirosinas, activación de PKC, oxidación de catecolaminas, regulación de genes y procesos tales como la proliferación. En cambio, niveles del orden micromolar son tóxicos y provocan apoptosis o necrosis celular. Teniendo en cuenta esto último, los resultados obtenidos por Oberley y col.¹⁰⁸⁻¹¹¹ podrían explicarse de la siguiente manera: la transfección de MnSOD aumenta tres veces la concentración de H₂O₂ respecto al control, podría suceder que estos niveles elevados de peróxido de hidrógeno induzcan un aumento de la apoptosis en la células transfectadas. En lo que respecta al aumento de la proliferación provocado por la cotransfección de GPx¹¹¹ en estas células podría explicarse porque los valores de H₂O₂ en las células cotransfectadas son un 50% mayores que en las células controles, esta concentración de H₂O₂ podría ser la necesaria y suficiente para aumentar la proliferación celular en comparación con las células controles. Este análisis de los resultados obtenidos por el grupo de Oberley demuestra que no habría contradicciones con lo presentado en esta tesis, ya que las diferencias se deberían a las distintas concentraciones intracelulares de peróxido de hidrógeno en los modelos aquí descriptos comparativamente con los modelos de manipulación genética¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Finalmente podemos concluir que el estado prooxidativo leve que induciría a una célula normal a proliferar sugiere que una célula expuesta permanentemente a un estado oxidativo basal estaría sometida a una continua inducción de proliferación y esto podría ser un evento crucial para la transformación celular y la consecuente inducción del fenotipo maligno. Sun Y y col.⁸⁶ también resaltan la importancia del desbalance de enzimas antioxidantes como un factor importante y responsable de la malignidad celular, aunque en estos trabajos, los autores relacionan este desbalance con la exposición a concentraciones mutagénicas de especies oxidativas y no con la regulación de vías específicas de inducción de proliferación. Futuras investigaciones permitirán dilucidar si en el proceso de transformación celular ocurren eventos genéticos que induzcan aumento de la actividad de SOD y/o disminución de la actividad de las enzimas disipadoras de peróxido de hidrógeno con el consecuente flujo continuo y no regulado de peróxido de

hidrógeno o si un aumento del estrés oxidativo induce modificaciones génicas irreversibles en el sistema enzimático de defensa antioxidante. En cualquiera de los dos casos, donde el desbalance sería causa o consecuencia del proceso, el aumento de peróxido de hidrógeno parece tener un papel fundamental en la transformación maligna. Por último cabe destacar que las alteraciones oxidativas descritas en este trabajo están relacionadas con modificaciones endógenas y que se asocian a la transformación celular, no hubo manipulación bioquímica ni genética que modifique el estado redox y que culmine en una transformación celular como describen la mayoría de los trabajos citados, este sería un aporte importante de este trabajo de tesis.

Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno y evaluación de la proliferación celular

Dado el aumento del desbalance enzimático y de los niveles de H_2O_2 descrito, en esta parte del trabajo se evaluó si la compensación de este desbalance enzimático mediante la disipación de los niveles de H_2O_2 provocaban algún efecto en la proliferación celular.

Se puede mencionar como segunda conclusión de este capítulo que la disminución extracelular de los niveles de peróxido de hidrógeno inhiben la proliferación celular. Tratamientos con catalasa exógena disminuyen los niveles de peróxido de hidrógeno en forma dependiente de la dosis e inhiben la proliferación en todas las líneas celulares epiteliales estudiadas. Por otro lado, se ha demostrado que este es un fenómeno general, ya que se inhibió la proliferación de varios tipos celulares proveniente de distintos tejidos y de distintas especies. Los tratamientos con catalasa no indujeron apoptosis y se revirtió la inhibición de la proliferación al incubar las células sin catalasa. Cabe destacar que la disminución de la proliferación por tratamientos con catalasa exógena disminuye la concentración de peróxido de hidrógeno en el medio extracelular, esto sugiere que el peróxido de hidrógeno podría actuar autocrinamente o paracrinamente sobre receptores relacionados con vías relacionadas con la proliferación celular. En este sentido, es interesante tener en cuenta que receptores con vías de transducción de señales relacionados con la proliferación celular tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tienen grupos de cisteínas muy conservadas en la

evolución que podrían ser una llave en la regulación por estas especies oxidativas. Si este fuera el caso, se podría pensar en un efecto del H_2O_2 en células vecinas (efecto "bystander") que potencie el crecimiento de un tumor.

Por otro lado, también se ha demostrado que la modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en dos modelos experimentales. Se inhibió la aparición de tumores por tratamientos con catalasa en el protocolo de carcinogénesis química y disminuyó la tasa de crecimiento de los tumores en ambos modelos. Hasta el momento no se han descrito trabajos que modulen el crecimiento tumoral *in vivo* mediante la disipación de H_2O_2 por tratamientos compensatorios de alteraciones oxidativas, lo cual abre una perspectiva promisoría relacionada con la posible implementación de terapias antioxidantes.

Finalmente el rol fundamental del peróxido de hidrógeno en la proliferación y transformación celular fue confirmado a través de la transfección del cDNA de la catalasa en las células MCF-7. Las células transfectadas mostraron una actividad proliferativa significativamente menor y revirtieron algunas características del fenotipo maligno, tales como el crecimiento de colonias en agar blando.

En este caso, a diferencia de los trabajos descritos en la bibliografía cabe destacar que en este trabajo se ha secuestrado el peróxido de hidrógeno generado por las líneas celulares o por los tumores experimentales y no se ha compensado un aumento de peróxido de hidrógeno inducido experimentalmente.

Posibles vías involucradas en la inhibición de la proliferación por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno.

Dado que se ha descrito la capacidad citostática del óxido nítrico, principalmente por su afinidad por el grupo hemo de varias enzimas (en especial tiene alta afinidad por la ribonucleotido sintetasa) hemos analizado la hipótesis de que el óxido nítrico esté involucrado en las vías de inhibición de la proliferación mediada por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno. En este sentido, hemos demostrado un aumento de los niveles de NO . Por tratamientos con catalasa y una reversión de la inhibición de la

proliferación por tratamientos con un inhibidor de la NOS. Por otro lado, la inhibición de la guanilato ciclasa, uno de los principales efectores del óxido nítrico, también revirtió los efectos inhibitorios de la proliferación por catalasa. Estos resultados indican que la vía del óxido nítrico estaría mediando la inhibición de proliferación inducida por la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno.

Dado que el mecanismo de inhibición de la guanilato ciclasa por el ODQ está mediado por la unión del NO al grupo prostético se verificó que el efecto obtenido por el ODQ no se debía a una unión del mismo al grupo hemo de la catalasa.

Además de la asociación entre el aumento de la malignidad y el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno descrito, otro factor que podría estar involucrado en esta asociación serían posibles alteraciones en vías de señalización reguladas por los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular. Considerando que disminuciones de los niveles de peróxido de hidrógeno podrían activar vías de señalización relacionadas con la inhibición de la proliferación celular y que las células más malignas (CH72-T4 y PDVC57) no llegan a inhibiciones totales de la proliferación a dosis altas de catalasa, una hipótesis interesante a ser evaluada sería que estas líneas hayan perdido la capacidad de responder a esta vía de inhibición de la proliferación como parte del proceso de transformación maligna. En apoyo a esta hipótesis se pueden mencionar los experimentos que demuestran una baja producción de nitritos por estas líneas celulares y la falta de reversión completa de la inhibición de la proliferación al ser tratadas con un inhibidor de la guanilato ciclasa. Estos hallazgos podrían ser la manifestación de alteraciones en vías de señalización moduladas por las concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Finalmente, la hipótesis de la participación del óxido nítrico en vías de señalización relacionadas con la inhibición de la proliferación por disminución de los niveles intracelulares de peróxido de hidrógeno también está sustentada por los resultados obtenidos con las células transfectadas con el cDNA sentido y antisentido de la catalasa. Las células transfectadas con el cDNA de la catalasa muestran un incremento de la producción de nitritos, y aumentan la proliferación al ser tratados con un inhibidor de la NOS y de la guanilato

ciclasa. La última serie de experimentos realizados en este trabajo de tesis sugieren que la vía del óxido nítrico estaría involucrada en la inhibición de la proliferación por disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno, aunque es necesaria la realización de más experimentos para la profundización de este tema.

Como conclusión general de este capítulo podemos mencionar que se han hecho aportes interesantes sobre los mecanismos por los cuales las especies reactivas del oxígeno, y en particular el peróxido de hidrógeno, participan en la proliferación y transformación celular.

Con respecto a la posible aplicación de estos estudios, los resultados aquí obtenidos sugieren fuertemente la posibilidad de buscar terapias alternativas, tales como terapias génicas dirigidas a restablecer posibles alteraciones en el sistema antioxidante.

Por último, se han presentado evidencias de las posibles vías de transducción de señales relacionadas con la inhibición de la proliferación por variaciones del estado oxidativo celular y las posibles alteraciones de estas vías en el proceso de transformación maligna.

CAPÍTULO II

ESTUDIO DE LA RADIOSENSIBILIDAD INTRÍNSECA Y DE SU POSIBLE MODULACIÓN SELECTIVA EN FUNCIÓN DE LA MALIGNIDAD CELULAR

INTRODUCCION II

2.1.1 Origen y evolución de la radioterapia¹¹³

La radioterapia constituye junto a la quimioterapia una de las principales formas de tratamiento contra el crecimiento tumoral. Los primeros estudios radiobiológicos nacieron en 1896 luego del descubrimiento de los rayos X, aunque su utilización en clínica se hizo efectiva luego de los estudios sistemáticos realizados por Regaud en el Instituto Curie entre 1919 y 1930. A partir de estos trabajos, se concluye que si la dosis total necesaria para eliminar un tumor se administra de manera fraccionada se obtiene una mejor tolerancia en los tejidos normales y un mayor efecto terapéutico en el tumor. Esto se debe a que los mecanismos homeostáticos compensatorios del daño celular en los tejidos sanos son más rápidos y eficientes en comparación a los que posee el tumor. De esta manera, a diferencia de lo que ocurre en el tumor se permite una mayor reparación del daño celular y repoblación del tejido sano entre las fracciones de dosis. A partir de entonces, se comienzan a diseñar distintos protocolos de radioterapia, que actualmente se encuentran estandarizados.

Los rayos gamma son las radiaciones ionizantes que se utilizan en la mayoría de los protocolos de radioterapia convencionales, sin embargo estos resultan inadecuados para el tratamiento de algunos tumores, ya sea por la gran radiorresistencia a este tipo de radiación, por ejemplo neuroblastomas o melanomas, o por la ubicación del tumor en regiones cercanas a órganos críticos, lo cual no permite aplicar la dosis necesaria para esterilizar el tumor. Esto ha llevado a la búsqueda de otras modalidades radioterapéuticas utilizando otro tipo de radiaciones ionizantes alternativas, como por ejemplo el uso de haces de protones en la protonterapia¹¹⁴. Los protones como consecuencia de su carga, pueden ser acelerados, deflectados y focalizados, pudiendo de esta forma generar haces con una geometría apropiada para una irradiación localizada. En contraste con otros tipos de radiación (como gamma o neutrones), los protones tienen una profundidad de penetración bien definida denominada **rango**. Durante su recorrido, estas partículas van depositando su energía produciéndose una máxima deposición al final de su recorrido, generándose un pico de dosis conocido como **pico de Bragg**. La dosis más allá de este pico es esencialmente cero. Esta forma particular de

distribución espacial de la dosis permite localizar la máxima deposición de la dosis en el tumor y en consecuencia generar menor daño en el tejido sano circundante.

Por otro lado, además de la búsqueda de radiaciones ionizantes alternativas, otro objetivo clave de la radioterapia es explorar compuestos químicos o farmacológicos que incrementen el efecto letal de la radiación, esto es el uso de **radiosensibilizadores**. Uno de los principales problemas de los radiosensibilizadores es la falta de selectividad de efecto entre la célula tumoral y normal. Por lo tanto, la búsqueda de agentes radiosensibilizadores que actúen selectivamente sobre las células tumorales es de sumo interés.

Finalmente, el éxito de cualquier protocolo de radioterapia depende fundamentalmente de la radiosensibilidad intrínseca de las células tumorales, de la capacidad diferencial de recuperación entre la célula normal y la tumoral, del cálculo exacto de una dosis adecuada que mantenga la vitalidad de órganos críticos y de la minimización de los efectos tardíos que podrían aparecer como consecuencia del daño ocasionado en las células normales.

2.1.2 Clasificación de las radiaciones ionizantes

De acuerdo a su naturaleza, las radiaciones ionizantes se pueden clasificar en: electromagnéticas y particuladas.

2.1.2.1 Radiaciones electromagnéticas

Dentro del espectro de las radiaciones electromagnéticas, los rayos X y gamma pueden considerarse radiaciones ionizantes. Estos tipos de radiaciones no difieren en su naturaleza, los rayos X se producen extranuclearmente mientras que los rayos gamma se producen intranuclearmente y son emitidos por isótopos radiactivos. Alternativamente, las radiaciones X y gamma pueden considerarse como haces de fotones o paquetes discretos de energía.

2.1.2.2 Radiaciones particuladas

Haces de protones y de iones pesados. Formados por núcleos de elementos, tales como protones, deuterones, helio (partículas α), litio, carbono, neón o argón, entre otras. Estos haces son generados por aceleradores de partículas como ciclotrones, sincrociclotrones y aceleradores lineales (Figura II.1).

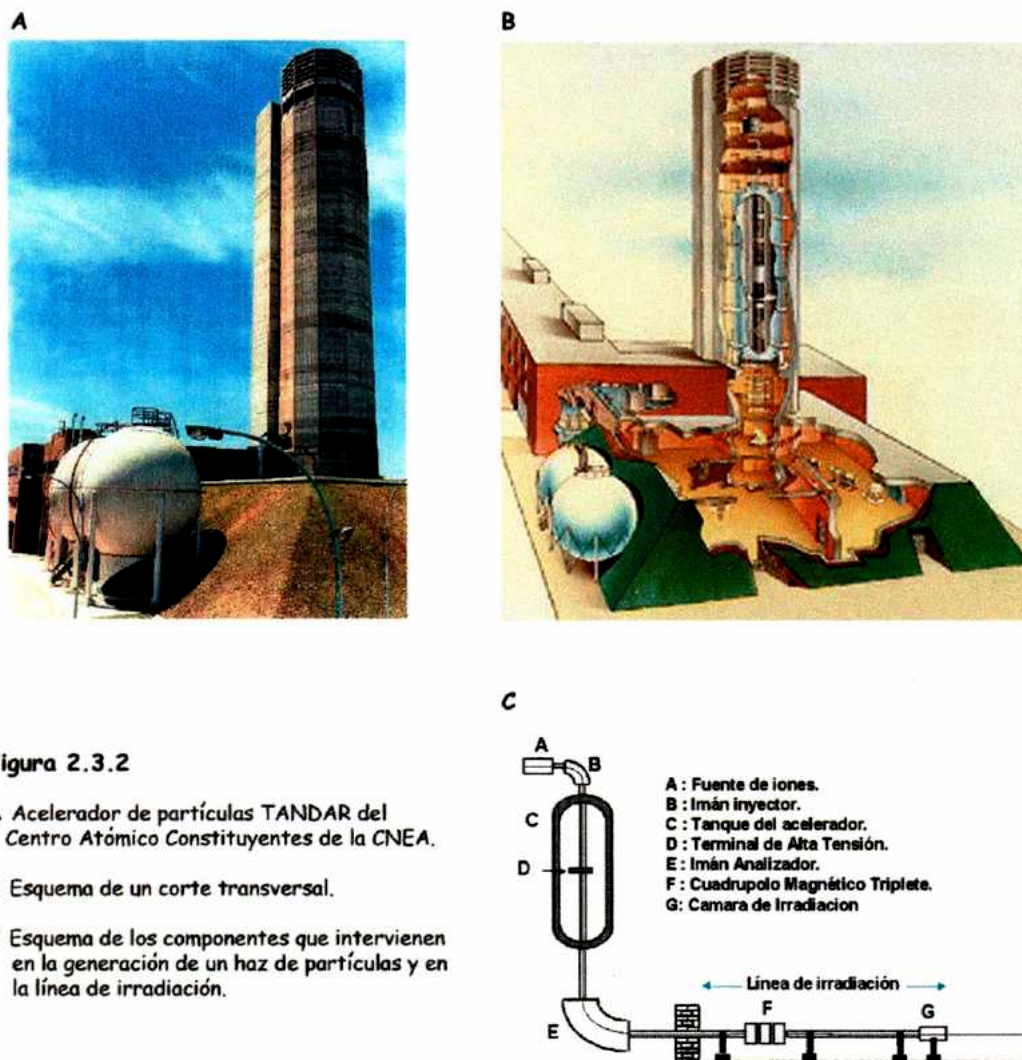


Figura II.1

Haces de electrones. Formados por partículas cargadas negativamente que pueden ser emitidos por núcleos de isótopos radioactivos (radiación beta) y que pueden ser aceleradas a altas energías en campos eléctricos en betatrones o en sincrociclotrones para electrones.

Haces de neutrones. Formados por partículas sin carga que pueden ser generados por aceleradores cuando una partícula cargada, como por ejemplo protones o deuterones, es acelerada a altas energías para luego impactar sobre blancos adecuados, como por ejemplo berilio. Por otro lado, también pueden generarse en reactores nucleares durante la fisión nuclear de isótopos radioactivos.

2.1.3 Interacción de las radiaciones ionizantes con la materia¹¹⁵

Las partículas cargadas tales como haces de electrones, protones, deuterones o iones pesados son radiaciones directamente ionizantes. El mecanismo de acción de estas partículas está basado en la interacción entre la partícula cargada y los electrones del medio. Entre estas dos partículas cargadas se generan fuerzas coulombianas de repulsión o atracción, que provocan ionizaciones en el medio, el detenimiento de la partícula ionizante y una consecuente absorción de energía en el material irradiado.

En cambio, los fotones, como los rayos gamma o X, y las partículas no cargadas, como los neutrones, son radiaciones indirectamente ionizantes. Los fotones actúan principalmente poniendo en movimiento electrones de átomos de bajo peso molecular y los neutrones ponen en movimiento núcleos de átomos de hidrógeno (protones), siendo estos los que dan origen a los eventos de ionizaciones.

2.1.4 Dosis, tasa de dosis y distribución de dosis de las radiaciones ionizantes¹¹⁵

Las excitaciones e ionizaciones de los átomos, que se producen cuando las radiaciones ionizantes interactúan con la materia, son las causas principales del daño biológico de la radiación. La cantidad y calidad de daño depende de la dosis de irradiación, de la tasa a la que se administra la dosis y de la distribución de la dosis en el tejido. Se denomina **dosis** a la cantidad de energía depositada por unidad de masa irradiada, $D = \Delta\epsilon / \Delta m$, donde $\Delta\epsilon$ es la energía media transferida por la radiación y Δm una porción de materia definida. También se puede considerar a la dosis, como la suma de las

ionizaciones, las excitaciones y la energía térmica transferida a Δm . La unidad de dosis absorbida aceptada en la Conferencia General de Pesos y Medidas en 1975 es el Gray (Gy), que se define como la absorción de 1 joule por kilogramo de masa irradiada (1J/kg). El daño producido sobre el material biológico irradiado no sólo depende de la dosis absoluta, sino también de la **tasa de dosis** con la cual se le ha administrado dicha dosis (Gy/h^{-1} , mGy/s^{-1}). Datos experimentales muestran que una dosis determinada, administrada a distintas tasas de dosis producen diferentes niveles de daño biológico. Este efecto diferencial puede ser explicado teniendo en cuenta que las células poseen la capacidad de reparar el daño originado por la radiación. De este modo, una célula irradiada a una baja tasa de dosis posee mayor probabilidad de que actúen los mecanismos de reparación celular que si la dosis es administrada a una tasa de dosis elevada.

Otro factor que influye en el efecto radiobiológico es la calidad de la radiación. En iguales condiciones de irradiación, el daño biológico producido por diferentes tipos de radiación, está determinado básicamente por la distribución de las ionizaciones a lo largo de la trayectoria de las radiaciones ionizantes. En una escala muy pequeña, del orden de μm , la energía absorbida no se distribuye de manera uniforme y en consecuencia las ionizaciones se producen de manera discontinua. La dosis es una expresión cuantitativa que no describe esta característica, sino que determina un valor global de ionizaciones producidas en una porción de masa suficientemente grande, de modo que estas fluctuaciones estadísticas son insignificantes. Se ha definido el concepto de **transferencia lineal de energía** (LET) para una determinada radiación ionizante como la energía absorbida por el medio por unidad de camino recorrido, siendo su unidad de expresión el kiloelectronvolt/ μm ($\text{keV}/\mu\text{m}^{-1}$). Entonces, radiaciones de alto LET producen mayor densidad de ionizaciones por unidad de camino recorrido y mayor daño biológico que las radiaciones de bajo LET. En términos generales, el LET de una radiación ionizante depende de la carga eléctrica de la partículas y de su energía.

A fin de poder relativizar y comparar el efecto que producen distintos tipos de radiaciones se ha definido el concepto de **eficacia biológica relativa** (RBE). Se define como RBE a la relación de dosis requerida para obtener un

mismo efecto biológico D_{ref}/D_{test} , donde D_{ref} es la dosis de radiación de una irradiación de referencia utilizada como patrón de comparación y D_{test} es la dosis de la radiación a testear. Por ejemplo, 1 Gy de neutrones ($d(50)+Be$) produce mayor efecto biológico que 1 Gy de rayos γ ^{60}Co (radiación de referencia), siendo el $RBE=1,9$ para el 10% de sobrevida de células de la cripta intestinal de ratón.

2.1.4.1 Distribución de la dosis para los distintos tipos de radiaciones ionizantes.

Radiaciones electromagnéticas

La dosis depositada está dada por los electrones secundarios puestos en movimiento por los fotones. La deposición de la dosis disminuye en profundidad, siendo máxima en la parte inicial del recorrido y disminuyendo progresivamente en profundidad a medida que la radiación penetra en el material biológico irradiado (Figura II.2).

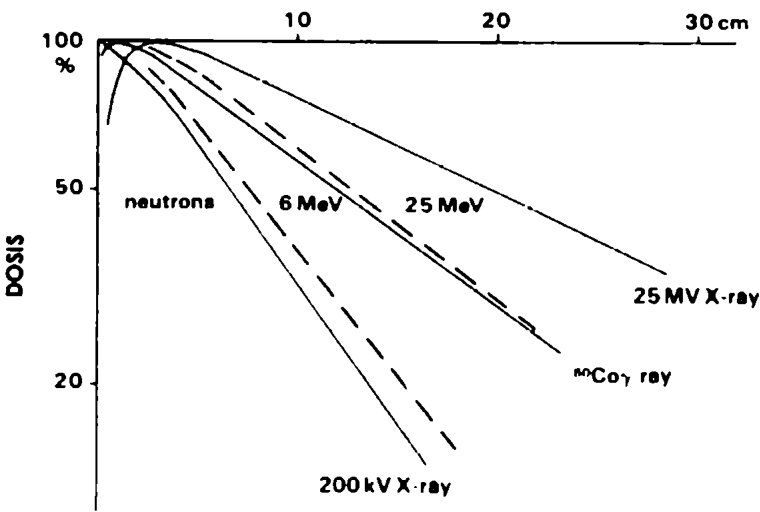


Figura II.2 Distribución de la dosis de las radiaciones electromagnéticas (rayos X y gamma) en función de la profundidad de penetración en la materia.

Radiaciones particuladas

Haces de protones y de iones pesados

Este tipo de radiaciones tienen trayectorias rectilíneas con rangos de recorrido definido que dependen de la naturaleza y energía cinética de la radiación considerada. El patrón de deposición de la dosis es característico para este tipo de radiaciones y puede ser descrito por la denominada **Curva de Bragg**, caracterizado por una región plana (plateau) y un pico agudo que se corresponde con la máxima deposición de la dosis (pico de Bragg). (Figura II.3).

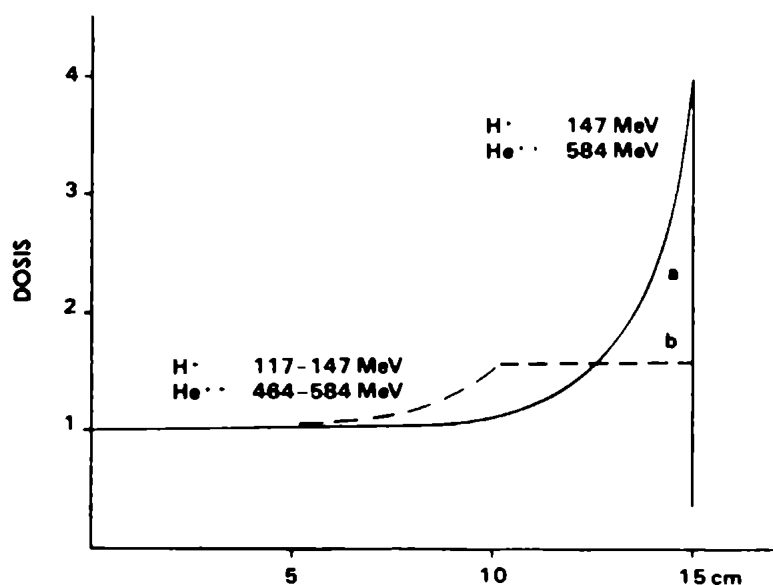


Figura II.3 Distribución de la dosis de un haz de partículas cargadas en función de la profundidad de penetración en la materia. Curva de Bragg para partículas monoenergéticas. La profundidad del pico depende de la energía y de la naturaleza de las partículas (curva a). Variando la energía de las partículas durante la irradiación, el pico se expande mostrando una distribución de dosis como la que se describe en la curva b.

Este patrón de deposición de la dosis, se puede explicar de la siguiente manera, cuando la velocidad de las partículas es alta la interacciones eléctricas con los átomos del medio es mínima (región del plateau), sin embargo a medida que las partículas van penetrando en la materia disminuyen su velocidad, aumentan las coaliciones e interacciones coulombianas con los electrones de átomos del medio, depositando en consecuencia prácticamente la totalidad de la dosis al final del recorrido (pico de Bragg).

Este tipo de radiaciones tienen la ventaja de tener un rango de recorrido definido que permite una selectividad espacial para la máxima deposición de la dosis.

Haces de electrones. La deposición de la dosis disminuye abruptamente en profundidad siendo el recorrido de los electrones poco definido.

Haces de neutrones. Los neutrones depositan su energía de manera indirecta al colisionar con los núcleos de hidrógeno del medio. De este modo, estos protones secundarios en movimiento son los responsables de las ionizaciones de los átomos del medio. La dosis depositada disminuye en profundidad siendo el patrón de distribución de dosis comparable al de los fotones (Figura II.2).

2.1.5 Acción directa e indirecta de la radiación^{113,115}

Los efectos biológicos de las radiaciones son el resultado de la deposición de energía en el material irradiado. Este fenómeno produce excitaciones e ionizaciones al azar de los átomos y moléculas del medio, dando origen a cambios fisicoquímicos que finalmente culminan en un efecto biológico. Si la energía de la radiación es suficiente para provocar ionizaciones se dice que la radiación es ionizante. Las radiaciones ionizantes pueden provocar excitaciones e ionizaciones en los átomos que componen las biomoléculas, ejerciendo de este modo una **acción directa**. Por otro lado, también provocan la descomposición o radiólisis de las moléculas de H_2O_2 en $HO\cdot$ y $H\cdot$, radicales libre capaces de difundir y provocar daño a moléculas biológicas. En este último caso, la radiación ejerce una **acción indirecta**, siendo este tipo de daño esencialmente similar al que resulta del estrés oxidativo (Figura II.4 A y B).

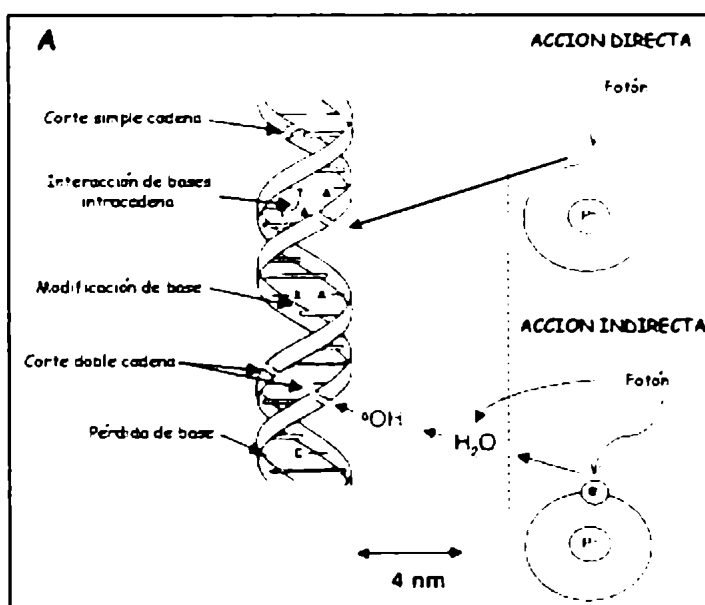


Figura 2.2

A Representación esquemática de la acción directa e indirecta de la radiación. Lesiones más comunes que se producen en el ADN.

B Radiólisis del agua por efecto de la radiación.

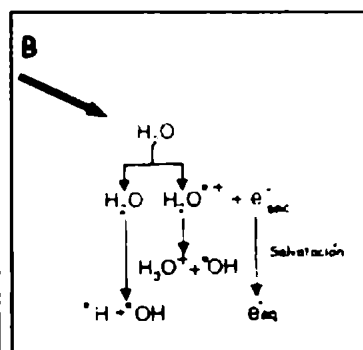


Figura 2.4

Los efectos biológicos de las radiaciones ionizantes resultan principalmente en daño al ADN, su blanco más sensible. Las lesiones que se producen son rupturas de simple y de doble cadena, alteraciones de bases, destrucción de azúcares y formación de dímeros¹¹⁶. Según el grado de severidad, estas lesiones pueden ser reparadas o en su defecto convertirse en irreparables originando desde mutaciones puntuales hasta aberraciones cromosómicas múltiples. A nivel celular, estos eventos pueden generar directamente la muerte celular por pérdida de la capacidad reproductiva, o alteraciones que van desde cambios en la expresión de genes⁶ con un consecuente alargamiento del ciclo celular^{117,118}, inducción de apoptosis¹¹⁹, inestabilidad genómica¹²⁰, transformación celular¹²¹ hasta efectos en las células vecinas a la zona irradiada¹²² (efecto "bystander").

Para una mayor profundización de los temas expuestos se recomienda consultar las referencias 113 y 115.

2.1.6 Modelos de estudio

Uno de los efectos más importante que provoca la radiación es la muerte celular reproductiva, definida como la pérdida irreversible de la capacidad de división celular. Esta definición es importante en radioterapia porque un tumor se considera controlado cuando todas sus células clonogénicas han perdido su potencial de proliferación. Por este motivo, es importante tener un método de medida de la proporción de células sobrevivientes luego de los efectos de un tipo de radiación determinada. El método más utilizado es el ensayo clonogénico diseñado por Puck y Marcus¹²³ en 1956, cuyo trabajo marca el comienzo de la radiobiología celular cuantitativa. Este ensayo evalúa si se ha alterado la capacidad reproductiva de una célula a través de su capacidad de formar una colonia en un medio adecuado para su crecimiento. A través de esta metodología sencilla es posible construir **curvas de sobrevida**, a través de las cuales se describe la relación entre la proporción de células sobrevivientes (S) y la dosis (D) de irradiación aplicada. Este ensayo se puede aplicar para estudiar la radiosensibilidad de líneas celulares o para evaluar la proporción de muerte celular de las células clonogénicas de tumores experimentales irradiados.

2.6.1 Modelos de curvas de sobrevida^{115,124}

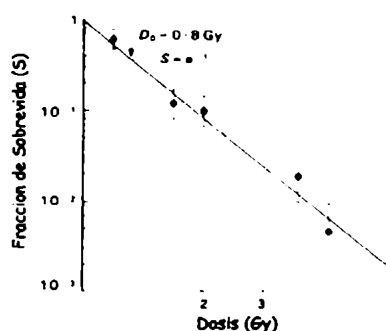
Los distintos sistemas biológicos describen básicamente dos tipos de curvas de sobrevida:

Curvas de sobrevida exponenciales. La relación entre la fracción de sobrevida y la dosis se ajusta a una ecuación del tipo exponencial $S=e^{-\alpha D}$. Los virus, bacterias, levaduras haploides, células de mamíferos hematopoyéticas, "stem cells" y células de mamíferos sincronizadas en M o G2 o irradiadas con radiaciones ionizantes de alto LET se ajustan a este tipo de curvas (Figura II.5 A).

Curvas de sobrevida con hombro. Cualitativamente la forma de la curva puede describirse de la siguiente manera, la parte inicial de la curva a bajas dosis es convexa, y es denominada hombro y a dosis altas generalmente tiende hacia una línea recta en coordenadas semilogarítmicas, aunque en algunos casos las curvas muestran una curvatura continua en todo el rango de dosis que se

estudia. La función matemática al cual se ajustan las curvas con hombro depende del modelo utilizado (Figura II.5 B1 y B2). Como puede observarse en la figura II.5 B, en general, las curvas de sobrevida con hombro presentan una pendiente negativa inicial. Las células de mamíferos irradiadas con radiaciones de bajo LET se ajustan generalmente este tipo de curvas de sobrevida.

A



B

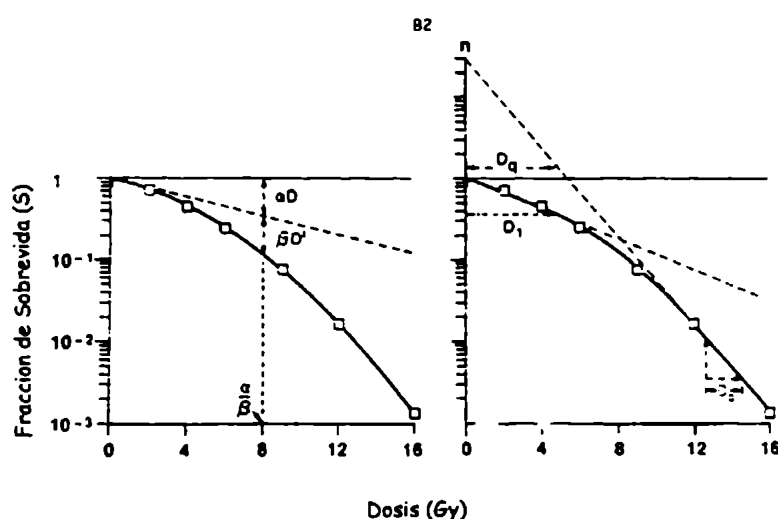


Figura II.5 A Curva de sobrevida exponencial ajustada a la función matemática $S=e^{-\alpha D}$, donde α es la pendiente de la curva. B Curvas de sobrevida con hombro. B₁ La curva de sobrevida está definida por los parámetros α y β , donde αD define la primera parte de la curva y es el componente de muerte celular proporcional a la dosis, siendo α la pendiente de la tangente al origen, y βD^2 es el componente de la muerte celular proporcional al cuadrado de la dosis, donde β define la convexidad de la curva. B₂ La curva de sobrevida está definida por los parámetros D_1 , que define la pendiente inicial, D_0 que define la pendiente final y donde n (número de extrapolación) y D_q (dosis cuasi-umbral) son parámetros relacionados con el ancho del hombro.

2.6.2 Modelos matemáticos y teorías del impacto y del blanco

A fin de interpretar la forma de las curvas de supervivencia se han descrito varios modelos matemáticos asociados a interpretaciones biofísicas y biológicas. La **Teoría del "hit" o impacto** es la más antigua que se ha desarrollado para interpretar las curvas dosis-respuesta y ha servido de base a las teorías posteriores y a los modelos que se utilizan actualmente. Esta teoría está basada en dos observaciones físicas y en un postulado:

- La radiación ionizante transfiere energía en paquetes discretos.
- Cada interacción (o "hit") de la radiación con un blanco ("target") es independiente y sigue una distribución de Poisson.
- El efecto biológico en estudio ocurre si un determinado blanco ha recibido un número definido de impactos. Se define como blanco a cualquier estructura biológica sensible del sistema biológico irradiado.

Las ecuaciones matemáticas que surgen de esta teoría y que representan las curvas dosis respuesta son el resultado de considerar diferentes cantidades de impactos necesarios sobre un blanco para inactivarlo y diferentes cantidades de blancos que deben ser inactivados para producir el efecto biológico.

La teoría del blanco introduce un concepto alternativo a la teoría del hit, esta teoría considera que el efecto ocurre cuando una mínima cantidad de energía determinada es transferida al sistema biológico por el pasaje de una partícula ionizante a través de una región sensible (blanco) y la probabilidad de que esta energía mínima sea transferida depende del tamaño del blanco. Por lo tanto, el volumen del blanco, o sea, el tamaño de las estructuras sensibles, es una medida de la radiosensibilidad intrínseca del sistema.

Estas teorías podrían ser adaptadas a lo que ocurre biológicamente considerando variaciones en los siguientes parámetros: número de impactos, número de blancos y volumen del blanco. Sin embargo, la variabilidad biológica no permite calcular de manera confiable estos tres parámetros, dado que diferentes combinaciones de por ejemplo número de impactos y número de blancos podrían dar curvas similares que podrían ajustarse a los mismos datos biológicos. Esto sumado a la dificultad de correlacionar estos tres parámetros con estructuras biológicas sensibles hace que estas teorías sean difíciles de interpretar desde el punto de vista radiobiológico. No obstante, los

modelos que se utilizan actualmente para el ajuste de curvas de sobrevida se basan en estos conceptos básicos. En la discusión se tendrán en cuenta estos conceptos y se comentarán otras teorías posteriores que tienen en cuenta otras características celulares relacionadas con la radiosensibilidad celular, como la capacidad de reparación del daño.

A continuación se describirán varios modelos que se han derivado de las teorías del impacto y del blanco (Figura II.6). La curva exponencial se ajusta a la función matemática $S=e^{-\alpha D}$ y se explica a través del **modelo del blanco simple** (únicos eventos letales en un único blanco) graficado en la Figura II.6 A. En este caso, se considera que cada partícula ionizante que atraviesa una célula puede provocar un evento letal, siendo éste un fenómeno de todo o nada. La producción de eventos letales es al azar y su número aumenta en función de la dosis.

Para el caso de las curvas con hombro, se han propuesto varias funciones matemáticas que surgen de diferentes modelos. Los dos modelos más utilizados, a los que mejor se ajustan los datos experimentales son los modelos de dos componentes que se describen a continuación:

➤ **modelo lineal cuadrático** (único impacto-único blanco + dos impactos-un blanco), $S=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$. Este modelo considera que la muerte celular se puede producir por un único evento letal, es decir por un impacto de la irradiación en un blanco sensible o también por la suma de dos eventos subletales independientes en un blanco sensible. De este modo, la ecuación que representa la sobrevida en función de la dosis tendría dos componentes, uno proporcional a la dosis (αD) y el otro proporcional al cuadrado de la dosis (αD^2) (Figura II.6 E).

➤ **modelo único impacto-único blanco + único impacto-múltiples blancos**. Este modelo considera que la muerte celular puede ocurrir por únicos eventos letales o por la acumulación de eventos subletales en n blancos y está caracterizado por tres parámetros: ${}_1D_0$, relacionado con la probabilidad de eventos letales, ${}_nD_0$, relacionado con la producción de eventos subletales y n sería el número de blancos.

Los modelos representados en la figura II.6 B y C no son adecuados para ajustar datos experimentales de sobrevida en función de la dosis debido a que sobreestiman la sobrevida a dosis bajas.

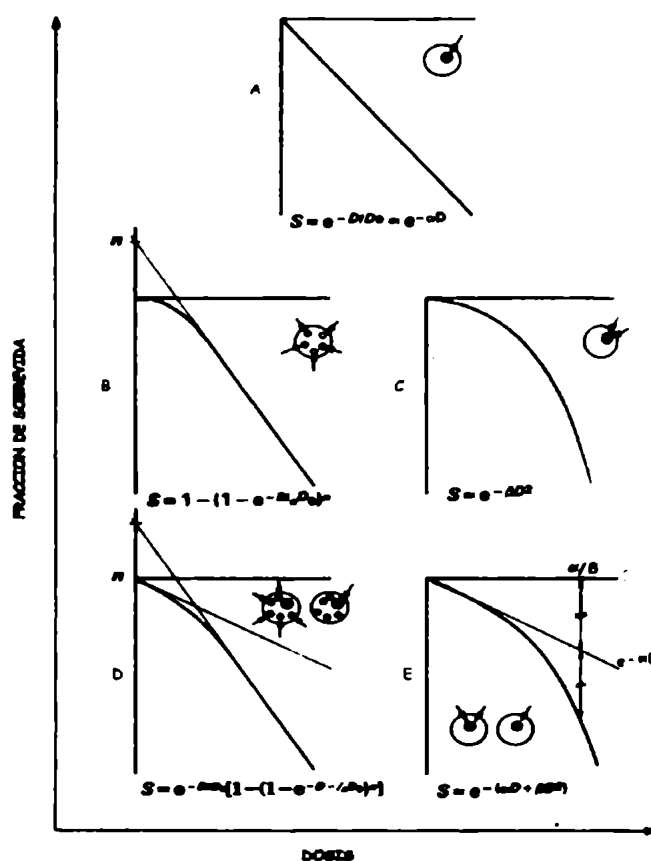


Figura II.6. Teoría del "hit" y curvas de sobrevivida

Modelo A. Unicos eventos letales y únicos blancos (teoría del blanco único). La muerte celular resulta del daño en blancos únicos por eventos letales únicos. La curva de sobrevivida es exponencial $S=e^{-\alpha D}$, donde $\alpha=1/D_0$ y D_0 es la dosis que corresponde a una sobrevivida del 37%.

Modelo B. Unicos eventos subletales y múltiples blancos. La muerte celular requiere del daño por únicos eventos subletales en n blancos celulares. La curva de sobrevivida es $S=1-(1-e^{-D/nD_0})^n$. La curva muestra un hombro seguido de una parte exponencial cuya pendiente es $-1/nD_0$.

Modelo C. Dos impactos y únicos blancos (modelo cuadrático). Los eventos letales resultan de la adición de dos eventos subletales independientes producido por el pasaje de dos partículas independientes. La fracción de sobrevivida esta dada por $S=e^{-\beta D^2}$.

Modelo D. Unicos eventos letales y únicos blancos más únicos eventos letales y múltiples blancos. La muerte celular se produce por daño letal en únicos blancos (modelo A) o por daños subletales en n blancos (modelo B). La ecuación $S= e^{-D/1D_0}(1-(1-e^{-D/nD_0})^n)$ es la función matemática a la que se ajusta la curva de sobrevivida. A altas dosis, la curva tiende a ser exponencial con una pendiente dada por $-(1/1D_0+1/nD_0)$ siendo n el número de extrapolación que se corresponde con el número de blancos.

Modelo E. Lineal cuadrático. La muerte celular resulta de únicos eventos letales (componente lineal) o de la adición de dos eventos subletales independientes (componente cuadrático). La fracción de sobrevivida está dada por la ecuación $S=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$

generación de radicales libres derivados de la radiólisis de las moléculas de agua. En consecuencia, el daño indirecto producido por acción de la radiación es esencialmente similar al que resulta del estrés oxidativo. Por otro lado, como se expuso en la primera parte de esta tesis existen numerosas evidencias que sostienen que durante la transformación celular aumenta el estado prooxidativo celular. Si a este estado prooxidativo de las células tumorales se le suma la acción de agentes que sean capaces de incrementar el estado prooxidativo basal, se potenciaría la acción de la radiación en las células tumorales.

Existen algunas evidencias experimentales que describen la capacidad radiosensibilizadora del óxido nítrico (NO). Se ha demostrado su efecto radiosensibilizador en bacterias¹²⁵ y en células de mamífero en condiciones hipóxicas¹²⁶⁻¹²⁸. A pesar de estas evidencias, no se ha descrito este efecto en condiciones aeróbicas, ni se ha estudiado su posible efecto radiosensibilizador diferencial en células malignas. El óxido nítrico podría aumentar el estado prooxidativo de las células tumorales pudiendo radiosensibilizarlas de manera selectiva.

OBJETIVOS

- 1- Evaluar las variaciones de la radiosensibilidad intrínseca en función del aumento de la malignidad celular.**
- 2- Comparar la respuesta de células tumorales a diferente tipo de radiaciones ionizantes: rayos gamma, haces de protones y de litio.**
- 3- Estudiar el efecto del óxido nítrico como posible agente radiosensibilizador selectivo sobre las células malignas.**

MATERIALES Y METODOS II

2.2.1 Modelo de estudio *in vitro*

2.2.1.1 Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7 cuyos orígenes y características se describieron en materiales y métodos del capítulo I.

2.2.1.2 Curvas de sobrevida

Para la evaluación de la radiosensibilidad intrínseca a distintos tipos de radiación y de su modulación en las líneas celulares mencionadas, se realizaron curvas de sobrevida mediante el ensayo clonogénico¹². Como se explicó en la introducción, una curva de sobrevida describe la relación entre la dosis de irradiación (D) y la proporción de células sobrevivientes (S).

2.2.1.3 Modelos de estudio *in vivo*

Se generaron tumores en ratones nude por inoculación de la línea CH72-T4 como se describió en materiales y métodos del capítulo I.

2.2.2 Estudio de la radiosensibilidad intrínseca de las líneas celulares

2.2.2.1 Irradiaciones con gamma

Condiciones experimentales

Las líneas celulares fueron sembradas teniendo en cuenta sus respectivas eficiencias de plaqueo. Las líneas celulares PDV, PDVC57 y CH72-T4 se sembraron a una densidad de 8×10^2 células/botella, la línea celular PB a una densidad de 5×10^3 células/botella y las líneas celulares HBL-100 y MCF-7 a una densidad de $1,5 \times 10^3$ células/botella de 25 cm². Las dosis de irradiación fueron entre 0.5 y 7 Gy. Las células se incubaron durante 10-15 días post-irradiación. Las colonias fueron fijadas con metanol-acético (3:1) y teñidas con violeta cristal 0.5 % en metanol 25 %. Las colonias con más de 50 células fueron contadas. Se realizaron entre 2 y 3 curvas de sobrevida por línea celular con

cada dosis por triplicado en cada experimento. Las curvas de sobrevida fueron ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D+\beta D^2)}$, utilizando el programa Origin para el procesamiento de los datos. Se analizaron los parámetros α , β , la relación α/β , la fracción de sobrevida a 2 Gy y se definió el factor de comparación de la sobrevida a 2 Gy (FCS2Gy) entre dos líneas celulares como la relación de dosis necesaria en ambas líneas celulares para obtener la fracción de sobrevida a 2 Gy de la línea usada como referencia.

Fuente de irradiación

Las células fueron irradiadas con una fuente γ de ^{137}Cs , en el Instituto Curie, Orsay, Francia y en CEBIRSA, Buenos Aires, Argentina.

2.2.2.2 Irradiaciones con haces de protones y de litio

Condiciones experimentales

Se realizaron irradiaciones de las líneas celulares PDV y PDVC57 con haces monoenergéticos de protones y de litio de distintas energías. Se utilizaron protones cuya energía se correspondía con la zona de plateu (17 y 20 MeV), del pico de Bragg (2,5 y 2,9 MeV) o de la porción distal (1,4 MeV) de la curva de Bragg y haces de ^6Li de 21,5 MeV y ^7Li de 6,9 MeV.

Las células fueron sembradas en cápsulas de cultivo de 60 mm de diámetro a una densidad de 8×10^2 células/cápsula. Al cabo de 6 hs de sembradas, se extrajo el medio de cultivo y se llevaron las placas a la sala de irradiación donde fueron dispuestas de manera vertical, perpendicular a la dirección de salida del haz. Las dosis de irradiación fueron entre 0.5 y 7 Gy. Las placas se incubaron durante 10-15 días post-irradiación y las colonias se fijaron con metanol: acético (3:1) y se tiñeron con violeta cristal 0.5 % en metanol 25 %. Se contaron las colonias con más de 50 células. Se realizaron tres experiencias de irradiación para cada línea celular con cada dosis por triplicado. Las curvas de sobrevida fueron ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D+\beta D^2)}$, utilizando el programa Origin para el procesamiento de los datos. Se analizaron los parámetros α , β y la fracción de sobrevida a 2 Gy. Se hicieron cálculos de RBE, definido como la relación de dosis requerida para producir un mismo efecto biológico con dos tipos de radiaciones distintas. En este caso se calcularon valores de RBE para protones y litio, utilizándose los datos obtenidos con la fuente de irradiación gamma como referencia.

Fuentes de irradiación

Los haces de protones y de litio fueron generados en el acelerador TANDAR, de la CNEA. Para hacer posible estos estudios radiobiológicos, haces externos de protones y de litio de energías del orden de 24 y 48 MeV respectivamente fueron producidos en el acelerador TANDAR por profesionales del Departamento de Física de la CNEA¹²⁹. En este trabajo se describe la caracterización de los haces de protones y de litio, demostrándose una uniformidad del haz del $98 \pm 2 \%$ en el plano de irradiación de las células. Por otro lado, un dispositivo de determinación dosimétrica on-line fue implementado.

2.2.3 Modulación de la radiosensibilidad. Tratamientos con dadores de óxido nítrico.

2.2.3.1 Experimentos *in vitro*

Irradiaciones con gamma

Las líneas celulares fueron sembradas como ya fue descripto. Las células se incubaron durante 6 hs para permitir la adhesión a la botella de cultivo. Se agregaron distintas concentraciones del dador de óxido nítrico, DETA (0,3 mM, 1 mM, 2 mM) durante 30 min antes de ser irradiadas para alcanzar niveles constantes de liberación de NO. Se realizaron controles tratados con iguales concentraciones de DETA. Las dosis de irradiación fueron entre 0.5 y 7 Gy. Luego de la irradiación se cambió el medio por medio fresco. Las placas se incubaron durante 10-15 días post-irradiación. Las colonias se fijaron con metanol: acético (3:1) y se tiñeron con violeta cristal 0.5 % en metanol 25 %. Se contaron las colonias con más de 50 células. Se realizaron entre 2 y 3 curvas de sobrevida por línea celular con cada dosis por triplicado en cada experimento. Las curvas de sobrevida fueron ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha+\beta D^2)}$, utilizando el programa Origin para el análisis de los datos. Se determinaron los parámetros α , β y la fracción de sobrevida a 2 Gy. Se calculó el parámetro SER como la relación de dosis para obtener un mismo efecto en ausencia y en presencia del radiosensibilizador.

Irradiaciones con haces de protones.

Se siguió el mismo protocolo que para las irradiaciones gamma pero sólo se irradiaron las líneas celulares PDV y PDVC57. Se utilizaron haces de protones cuya energía se corresponde la zona de plateau (17 y 20 MeV), pico (2,5 y 2,9 MeV) o porción distal (1,4 MeV) de la curva de Bragg

2.2.3.2 Experimentos *in vivo*

Se utilizó espermina como dador de óxido nítrico. Este liberador muestra un pico de liberación de óxido nítrico que dura alrededor de 20 min. Se eligió este tipo de liberador para evitar efectos colaterales adversos en el organismo. Se inyectaron 100 μ l de una solución de espermina preparada en PBS a una concentración de 500 μ M y 1 mM, inmediatamente se procedió a la irradiación con 5 y 10 Gy de radiación gamma y con haces de protones (plateau). Los animales fueron blindados con una cámara de plomo, exponiéndose solamente la zona del tumor. Se hicieron controles del efecto del compuesto en animales sin irradiar. Se siguió el crecimiento de los tumores a lo largo de 20 días. El volumen tumoral se determinó usando la ecuación de un elipsoide $V=4/3\pi.D_M/2(D_m/2)^2$, siendo D_M el diámetro mayor y D_m el diámetro menor. El crecimiento se refirió al tamaño que presentaban los tumores al día 0 del tratamiento.

2.2.4 Análisis estadístico.

La bondad del ajuste de las curvas de sobrevida al modelo lineal cuadrático se evaluó a través de test de X^2 . La comparación de los distintos parámetros de las curvas de sobrevida se realizaron mediante el test t de student.

2.3.1 Caracterización de la radiosensibilidad intrínseca de las líneas celulares con distinto grado de malignidad

2.3.1.1 Irradiaciones con rayos gammas

Se evaluó la radiosensibilidad intrínseca a la radiación gamma de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7. Se realizaron curvas de sobrevida para cada línea celular y los datos se ajustaron al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D+\beta D^2)}$. Se analizaron los parámetros α y β , así como también la relación α/β , la fracción de sobrevida a 2Gy (FS2Gy) y el factor de comparación entre líneas para la fracción de sobrevida a 2Gy (FCS2Gy). Las diferencias de radiosensibilidades serán posteriormente analizadas en la discusión, utilizando los distintos marcos teóricos que se han elaborado para interpretar los parámetros de las funciones matemáticas a las que ajustan las curvas de sobrevida.

Líneas celulares derivadas de la cepa SENCAR

Las líneas derivadas de la cepa SENCAR mostraron un aumento de la radorresistencia en función del aumento de la malignidad celular (Figura II.7 A). La curva de sobrevida de la línea celular CH72-T4 presentó un valor de α significativamente menor y una fracción de sobrevida a 2Gy significativamente mayor que la línea PB. La relación α/β también mostró diferencias significativas entre las líneas celulares, mientras que el parámetro β no varió significativamente (Tabla II.1).

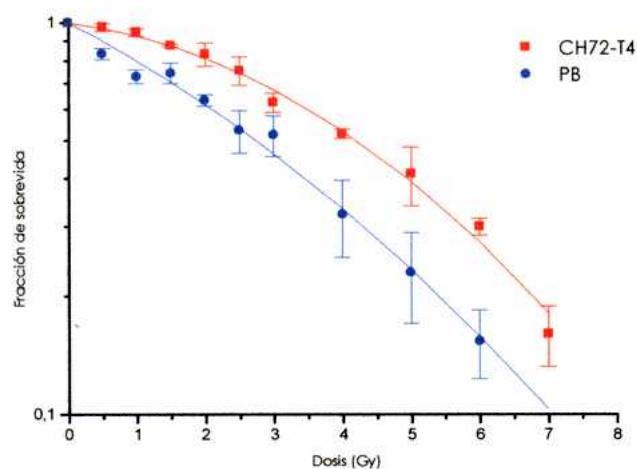
Líneas derivadas de la cepa C57BL/6N

El análisis comparativo de los parámetros de las curvas de sobrevida de las líneas celulares PDVC57 y PDV mostraron las mismas características que el par comparativo anterior. Se observó que existe una correlación entre un aumento de la radorresistencia y el grado de malignidad celular entre estas líneas celulares (Figura II.7 B). La asociación entre el aumento de la malignidad celular y el aumento de la radorresistencia se refleja a través de los valores de α , la FS2Gy y el FCS2Gy. La relación α/β también mostró diferencias significativas entre las líneas celulares, mientras que el parámetro β no varió significativamente (Tabla II.1).

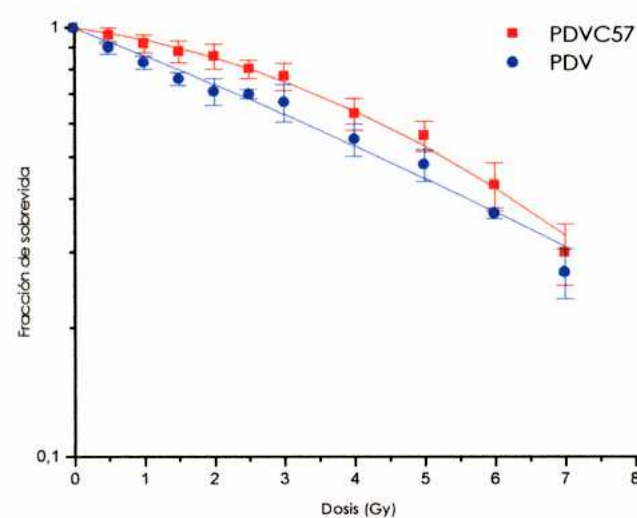
Líneas derivadas de epitelio mamario humano

Las líneas humanas HBL-100 y MCF-7, a diferencia de los pares comparativos anteriores mostraron una correlación inversa entre el aumento de la malignidad celular y la radiorresistencia (Figura II.7 C). Los valores de α fueron significativamente menores en la línea HBL-100 con respecto a la línea celular MCF-7. La FS2Gy, el FCS2Gy y la relación α/β también mostraron diferencias significativas entre estas líneas celulares. Sin embargo, a diferencia de los pares comparativos anteriores, el parámetro β difiere significativamente entre estas líneas celulares (Tabla II.1).

A. Líneas PB y CH72-T4



B. Líneas PDV y PDVC57



C. Líneas HBL-100 y MCF-7

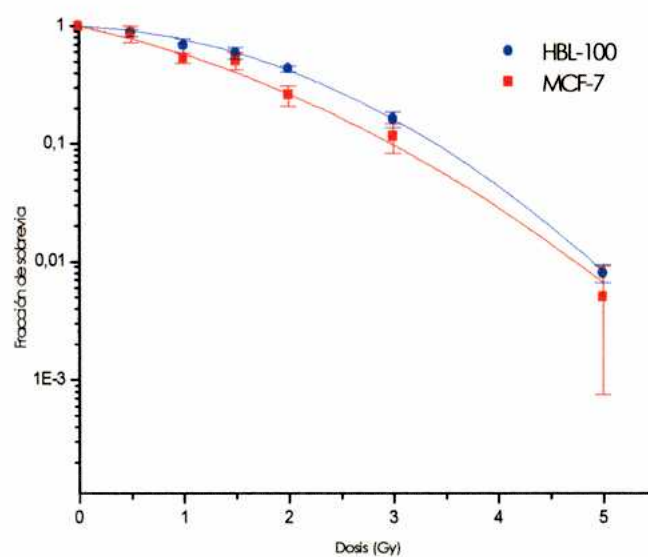


Figura II.7 Curvas de supervivencia de las líneas celulares PB y CH72-T4 (A), PDV y PDVC57 (B), HBL-100 y MCF-7(C) irradiadas con rayos gamma (^{137}Cs) y ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$.

Línea celular	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	α/β (Gy)	FS 2Gy	FCS2Gy
PB	0,18 ± 0,021	0,027 ± 0,002	6,66 ± 0,89	0,64	1
CH72-T4	0,049 ± 0,011	0,028 ± 0,002	1,75 ± 0,41	0,81	0,64
PDV	0,13 ± 0,016	0,006 ± 0,003	21,6 ± 11	0,75	1
PDVC57	0,049 ± 0,008	0,015 ± 0,002	3,26 ± 0,68	0,85	0,66
HBL-100	0,076 ± 0,025	0,176 ± 0,0075	0,43 ± 0,14	0,41	1
MCF-7	0,43 ± 0,073	0,11 ± 0,028	3,90 ± 1,16	0,27	1,34

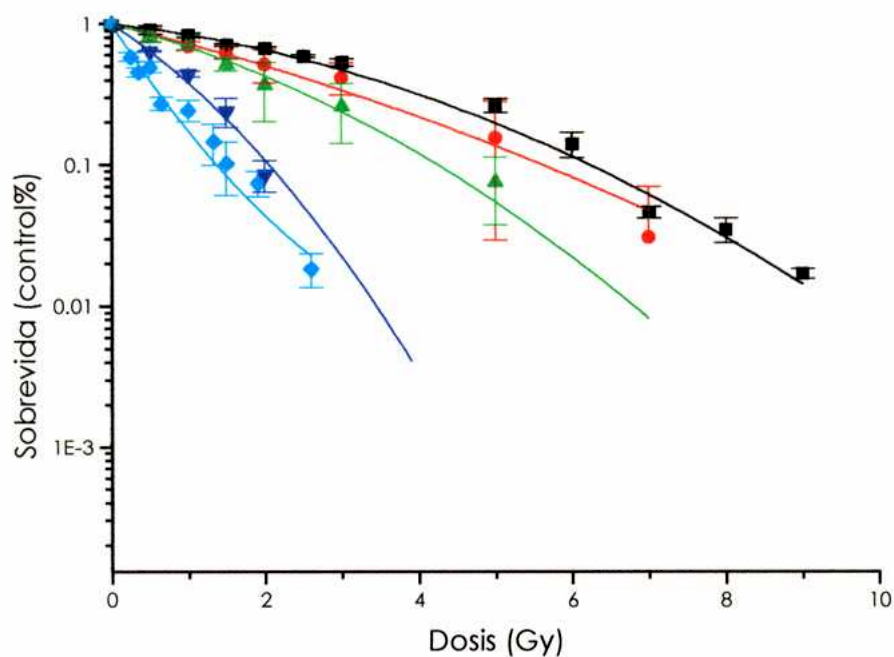
Tabla II.1 Parámetros matemáticos α y β , relación α/β , la FS2Gy y el FCS2Gy de las curvas de sobrevida de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7 irradiadas con rayos gamma (¹³⁷Cs) y ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$.

2.3.1.2 Irradiaciones con haces de protones y de litio

Dadas las dificultades y costo que representa hacer irradiaciones con el acelelador de partículas TANDAR, se realizaron curvas de sobrevida solamente para las líneas celulares PDV y PDVC57, fundamentalmente por ser el par comparativo que presenta mayor facilidad de crecimiento y manipulación.

Las líneas celulares se irradiaron con haces de protones de distintas energías que se correspondieron con las distintas porciones de la curva de Bragg y con haces de litio con energía correspondiente a la zona de plateau (Figura II.8 A y B). En ambas líneas celulares, se observó una disminución del hombro de las curvas de sobrevida en función del aumento del LET de las partículas. El hombro disminuyó progresivamente en las curvas obtenidas con los protones pertenecientes a la zona de plateau, pico, y porción distal de la curva de Bragg, obteniéndose una curva totalmente exponencial en las irradiaciones hechas con los haces de litio.

A Línea PDV



B Línea PDVC57

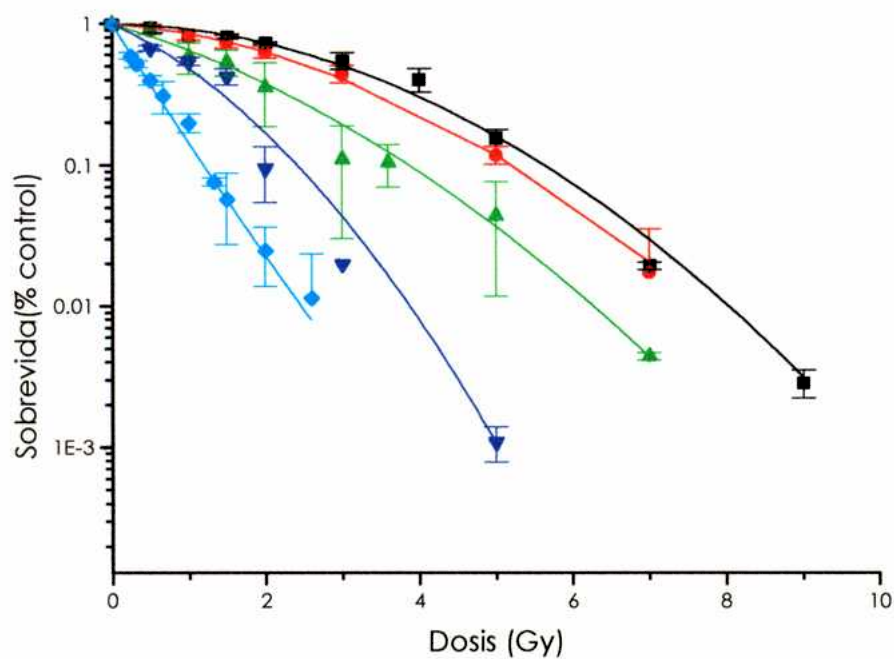


Figura II.8 Curvas de sobrevivencia de las líneas PDV(A) y PDVC57(B) irradiadas con rayos gama ^{137}Cs (■), protones 20.2 ± 0.2 MeV (plataforma) (●), protones de 2.9 ± 0.1 MeV (pico de Bragg) (▲), protones de 1.5 ± 0.1 MeV (porción distal)(▼) y litio de 21.5 ± 0.7 MeV (◆).

El aumento de radiosensibilidad en función del aumento del LET de las partículas se observa también a través del aumento del parámetro α y la disminución de FS 2Gy (tabla II.2) y en los valores de RBE (tabla II.3).

En cuanto a la comparación entre líneas, la línea celular PDVC57 mostró ser más radiorresistente que la línea PDV sólo para las irradiaciones realizadas con protones correspondientes a la zona de plateau (tabla II.2 A y B). El parámetro α mostró valores significativamente menores para la línea PDVC57 con respecto a la línea celular PDV y la FS2Gy mostró valores mayores. No hay diferencias significativas entre las líneas celulares PDV y PDVC57 en las curvas de sobrevida obtenidas con las irradiaciones con haces de protones de la zona de pico de Bragg, de la zona distal y con haces de litio.

La tabla II.3 muestra valores de RBE (α_t/α_x), RBE (FS2Gy) y el RBE para el 10% de sobrevida para las irradiaciones con haces de protones y de litio. Los resultados mostraron un aumento del RBE en función del aumento del LET de las partículas (Tabla II.3 A y B, Figura II.8 A y B). Los valores de RBE (α_t/α_x), RBE (FS2Gy) mostraron diferencias entre las líneas celulares a dosis bajas y para las irradiaciones con partículas de alto LET, estas diferencias se hacen menores si se comparan los RBE calculados para una sobrevida del 10%. Este resultado se muestra más detalladamente en la Figura II.10 A y B donde se grafican los valores de RBE para cada fracción de sobrevida.

A.Línea celular PDV

	Energía Media (MeV)	LET (keV/μm)	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	FS 2Gy (ajustado)
GAMMA ¹³⁷ Cs	0,662	0,2	0,13 ± 0,02	0,04 ± 0,004	0,66
PROTONES PLATEAU	17,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	0,31 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,49
PROTONES PICO DE BRAGG	2,5 ± 0,1	15,6 ± 0,1	0,32 ± 0,04	0,05 ± 0,01	0,43
PROTONES DISTAL	1,4 ± 0,1	26 ± 2	0,69 ± 0,13	0,26 ± 0,11	0,089
⁶ LITIO	21,5 ± 0,8	100 ± 7	1,47 ± 0,08	*	0,053
⁷ LITIO	6,9 ± 0,3	269 ± 14	1,72 ± 0,17	*	0,032

B Línea celular PDVC57

	Energía Media (MeV)	LET (keV/μm)	α (Gy ⁻¹)	β (Gy ⁻²)	FS 2Gy (ajustado)
GAMMA ¹³⁷ Cs	0,662	0,2	0,004 ± 0,015	0,078 ± 0,003	0,72
PROTONES PLATEAU	20,2 ± 0,07	2,69 ± 0,08	0,14 ± 0,02	0,044 ± 0,005	0,63
PROTONES PICO DE BRAGG	2,9 ± 0,1	14 ± 1	0,32 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,41
PROTONES DISTAL	1,4 ± 0,1	26 ± 2	0,67 ± 0,12	0,23 ± 0,08	0,1
⁶ LITIO	21,5 ± 0,8	100 ± 7	1,59 ± 0,07	*	0,041
⁷ LITIO	6,9 ± 0,3	269 ± 14	1,88 ± 0,03	*	0,023

Tabla II.2 Parámetros matemáticos α, β, FS 2Gy de las curvas de sobrevida de las líneas celulares PDV y PDVC57 irradiadas con haces de protones y de litio ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$.

*Valor tendiente a cero

A.Linea celular PDV

	Energía Media (MeV)	LET (keV/μm)	RBE (α/α)	RBE (FS2Gγγ)	RBE (FS 0,1)
GAMMA ¹³⁷ Cs	0,662	0,2 KeV/μm	1	1	1
PROTONES PLATEAU	17,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,38	1,63	1,12
PROTONES PICO DE BRAGG	2,5 ± 0,1	15,6 ± 0,1	2,48	1,82	1,42
PROTONES DISTAL	1,4 ± 0,1	26 ± 2	5,3	4	3,18
⁶ LITIO	21,5 ± 0,8	100 ± 7	11,3	7,14	3,91
⁷ LITIO	6,9 ± 0,3	269 ± 14	13,2	8,33	4,61

B Línea celular PDVC57

	Energía Media (MeV)	LET (keV/μm)	RBE (α/α)	RBE (FS2Gγγ)	RBE (FS 0,1)
GAMMA ¹³⁷ Cs	0,662	0,2 KeV/μm	1	1	1
PROTONES PLATEAU	20,2 ± 0,07	2,69 ± 0,08	2,85	1,27	0,93
PROTONES PICO DE BRAGG	2,9 ± 0,1	14 ± 1	6,53	2,27	1,32
PROTONES DISTAL	1,4 ± 0,1	26 ± 2	13,67	4,65	2,67
⁶ LITIO	21,5 ± 0,8	100 ± 7	32,4	9,7	3,75
⁷ LITIO	6,9 ± 0,3	269 ± 14	38,3	11,56	4,42

Tabla II.3 RBE calculado como relación de α/α, FS2Gγγ y FS 0,1 de las curvas de sobrevida de las líneas celulares PDV y PDVC57 irradiadas con haces de protones y de litio ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$.

En la figura II.9 se muestra el aumento del RBE calculado como relación de α/α (RBE α/α), para la fracción de sobrevivencia a 2Gy gamma (RBE 2Gy γ) y para la fracción de sobrevivencia de 0,1 (RBE 0,1) en función del LET de las partículas.

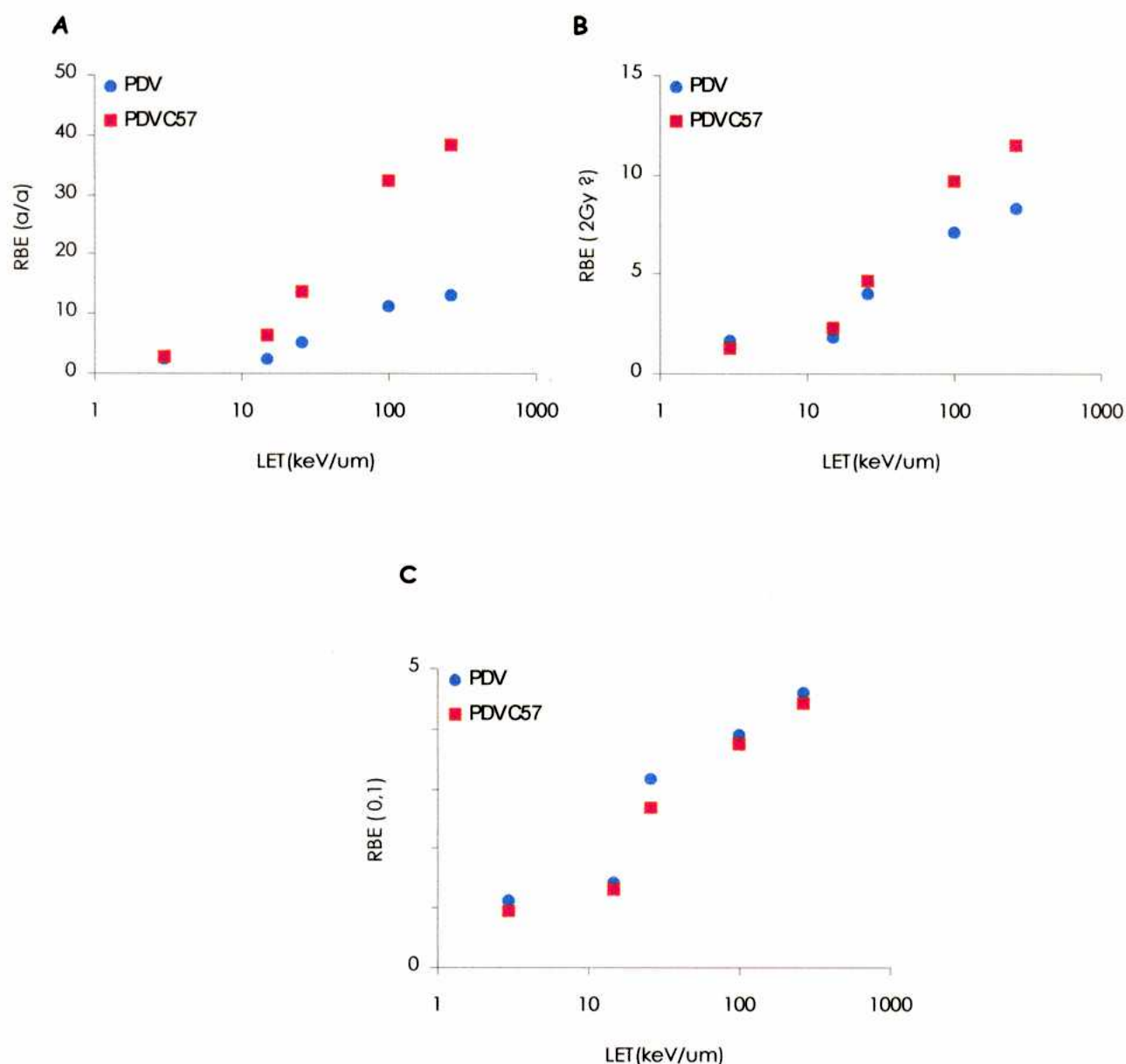
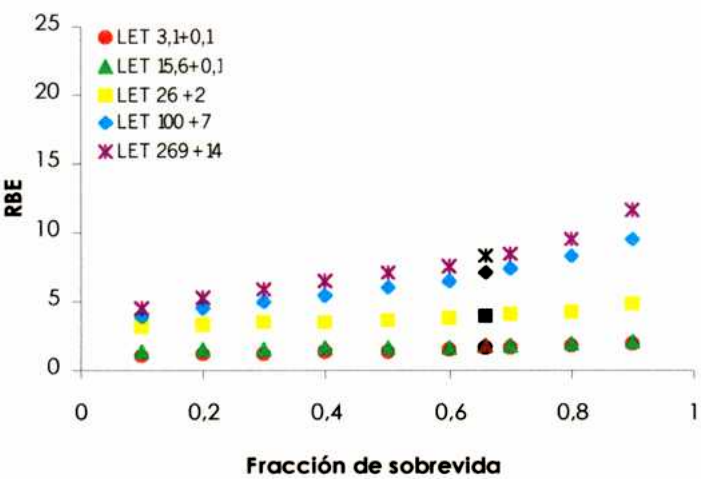


Figura II.9 Variación del RBE en función del LET de las partículas calculado como de α/α (RBE α/α) (A), para la fracción de sobrevivencia a 2Gy gamma (RBE 2Gy γ) (B) y para la fracción de sobrevivencia de 0,1 (RBE 0,1) (C) en las líneas celulares PDV y PDVC57 irradiadas con haces de protones y de litio ajustadas al modelo lineal cuadrático $S=e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$.

A PDV



B PDVC57

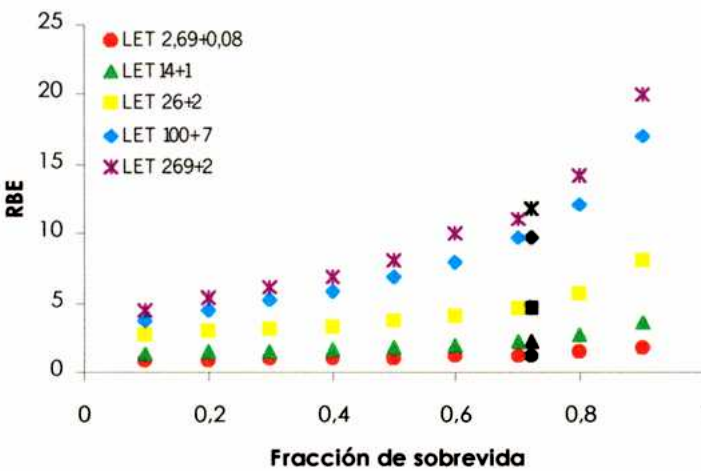


Figura II.10 Variación del RBE calculado para valores de fracciones de sobrevida comprendidos entre 0,1-0,9 para las líneas PDV (A) y PDVC57 (B) irradiadas con haces de protones de la zona de plateau (●), del pico de Bragg (▲), de la región distal (■) ⁶litio (◆) y ⁷litio (×).

2.3.2 Modulación de la radiosensibilidad por óxido nítrico

2.3.2.1 Evaluación del efecto de un dador de óxido nítrico *in vitro*

Irradiación gamma

A fin de evaluar un posible efecto radiosensibilizador selectivo del óxido nítrico en las líneas celulares con mayor capacidad tumorigénica las líneas celulares se trataron con DETA, un dador de óxido nítrico de liberación constante y prolongada.

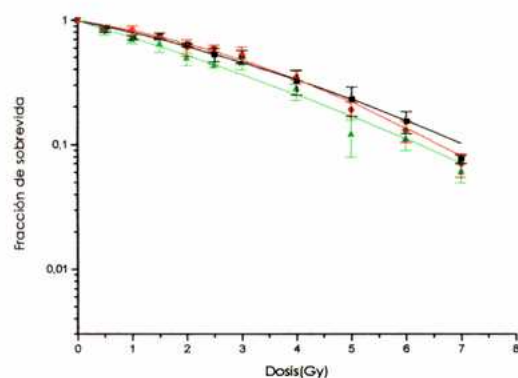
Todas las líneas celulares fueron radiosensibilizadas con DETA. Las líneas con mayor grado de malignidad CH72-T4, PDVC57 MCF-7 presentaron mayor radiosensibilidad que sus pares comparativos PB, PDV y HBL-100 respectivamente (Figura II.11)

Las líneas celulares CH72-T4 y PDVC57 mostraron una toxicidad mayor al 20% al ser tratadas con DETA 2 mM, por esta razón no se consideraron estas curvas.

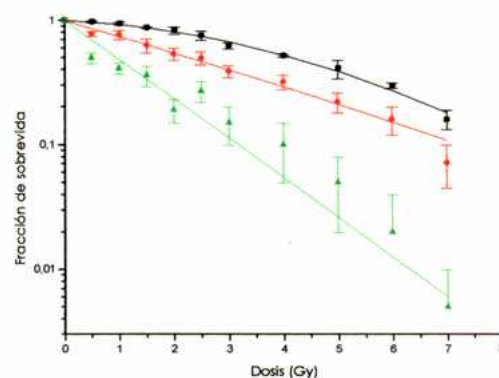
En la tabla II.4 se muestran las variaciones de los parámetros α y β y la fracción de sobrevida a 2 Gy.

La dosis necesaria para obtener un mismo efecto en ausencia (D) y en presencia (Dm) de un sensibilizador se define como $SER=D/D_m$. Este parámetro también se puede calcular como la relación de α_1/α_0 , donde α_1 pertenece a la curva de sobrevida de las células tratadas y α_0 corresponde a la curva de las células controles.

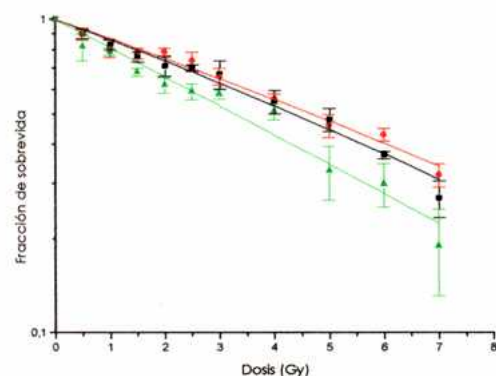
A Línea celular PB



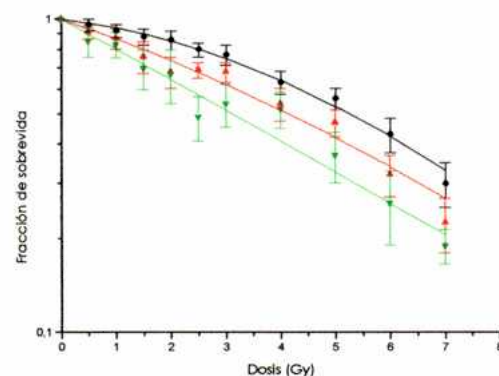
B Línea celular CH72-T4



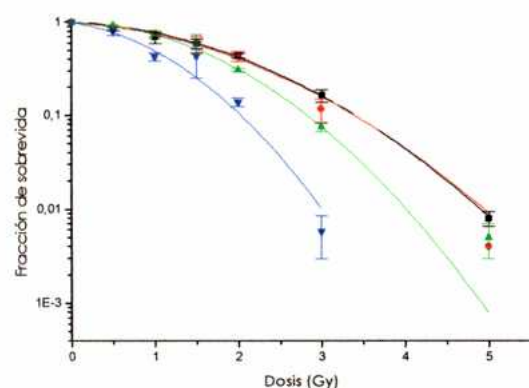
C Línea celular PDV



D Línea celular PDVC57



E Línea celular HBL-100



F Línea celular MCF-7

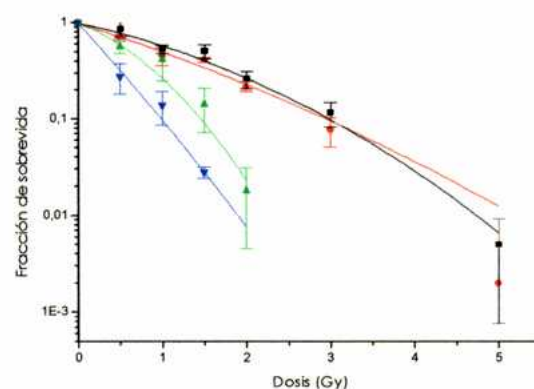


Figura II.11 Radiosensibilización de las líneas celulares PB (A), CH72-T4 (B), PDV (C), PDVC57 (D), HBL-100 (E) y MCF-7 (F) irradiadas con γ y pretratadas con diferente concentraciones de DETA (● 0 mM DETA, ● 0,3 mM DETA, ● 1 mM DETA, ● 2 mM DETA).

	PB			CH72-T4		
DETA	0 mM	0,3 mM	1 mM	0 mM	0,3 mM	1 mM
α (Gy ⁻¹)	0,17 ± 0,021	0,13 ± 0,016	0,30 ± 0,018	0,049 ± 0,014	0,28 ± 0,024	0,54 ± 0,035
β (Gy ⁻²)	0,027±0,003	0,03 ± 0,004	0,014 ± 0,004	0,003 ± 0,002	0,008 ± 0,005	*
FS (2Gy)	0,64	0,64	0,53	0,81	0,54	0,26
SER ($\alpha T/\alpha 0$)	1	0,76 ± 0,17	1,76 ± 0,24	1	5,7± 1,7	11 ± 3,2
SER (FS2Gy)	1	0,88	1,49	1	2,73	5,12

	PDV			PDVC57		
DETA	0 mM	0,3 mM	1 mM	0 mM	0,3 mM	1 mM
α (Gy ⁻¹)	0,13 ± 0,016	0,13 ± 0,016	0,20 ± 0,025	0,049 ± 0,008	0,12 ± 0,017	0,2 ± 0,03
β (Gy ⁻²)	0,006 ± 0,003	0,003 ± 0,003	0,0002 ± 0,005	0,015 ± 0,0017	0,011 ± 0,0038	0,005 ± 0,005
FS (2Gy)	0,75	0,76	0,65	0,85	0,75	0,66
SER ($\alpha T/\alpha 0$)	1	1 ± 0,17	1,5 ± 0,26	1	2,4 ± 0,51	4,1 ± 0,91
SER (FS2Gy)	1	0,96	1,60	1	1,65	2,56

	HBL-100				MCF-7			
DETA	0 mM	0,3 mM	1 mM	2 mM	0 mM	0,3 mM	1 mM	2 mM
α (Gy ⁻¹)	0,08± 0,02	0,1 ± 0,06	0,2 ± 0,05	0,29±0,19	0,43 ±0,07	0,63 ± 0,09	2,3 ± 0,5	2,2 ± 0,5
β (Gy ⁻²)	0,02 ±0,70	0,16 ±0,03	0,2 ± 0,02	0,41±0,10	0,11 ± 0,03	0,05 ± 0,06	*	*
FS (2Gy)	0,41	0,40	0,30	0,171	0,26	0,22	0,023	0,008
SER ($\alpha T/\alpha 0$)	1	1,5 ± 0,91	2,9 ± 1,15	3,8 ± 2,78	1	1,5 ± 1,70	5,3 ± 1,40	5,1 ± 1,42
SER (FS2Gy)	1	1	1,22	1,72	1	1,07	3,44	3,27

Tabla II.4 Parámetros α , β , fracción de sobrevida a 2Gy y valores de SER calculados como relación de $\alpha T/\alpha 0$ (SER $\alpha T/\alpha 0$), correspondiendo αT a la curva tratada con el radiosensibilizador y $\alpha 0$ a la curva control, y para la fracción de sobrevida obtenida con 2Gy en las células sin tratamiento: SER (FS2Gy), para las curvas de sobrevida de las líneas PDV y PDVC57ajustadas al modelo lineal cuadrático tratadas con 0, 0.3, 1 y 2 mM DETA e irradiadas con gamma

* Valor tendiente a 0.

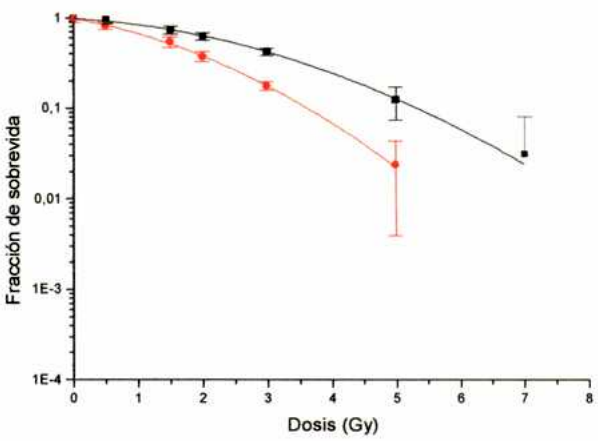
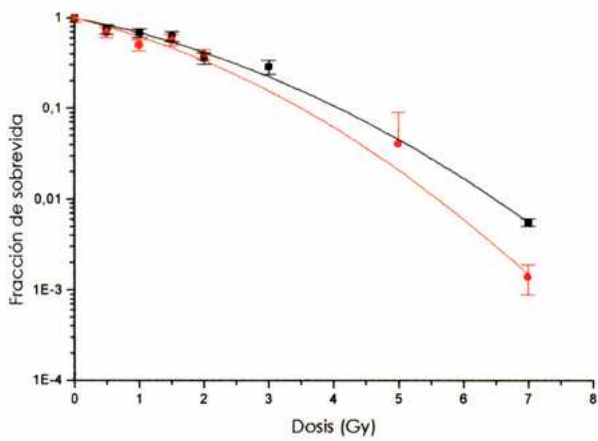
Irradiación con haces de protones

El dador de óxido nítrico mostró un efecto radiosensibilizador sólo en la línea celular PDVC57 irradiada con protones correspondientes a la zona de plateau (Figura II.12, A). No se observa radiosensibilización en la zona de pico y porción distal de la curva de Bragg ni con los haces de litio. El aumento de la radiosensibilidad con DETA se refleja en la variaciones del parámetro α (Tabla II.5, B).

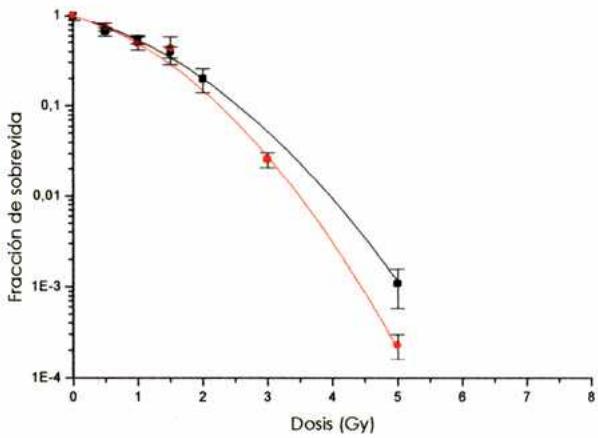
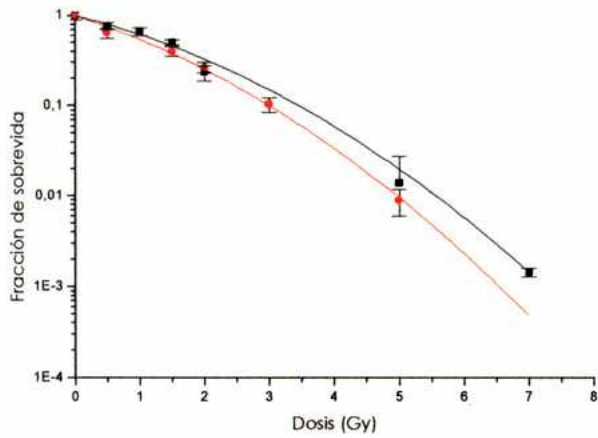
Línea PDV

Línea PDVC57

A Plateau



B Pico de Bragg



C Porción distal

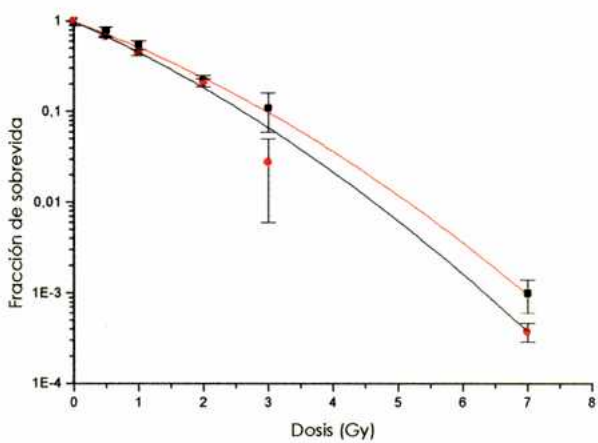
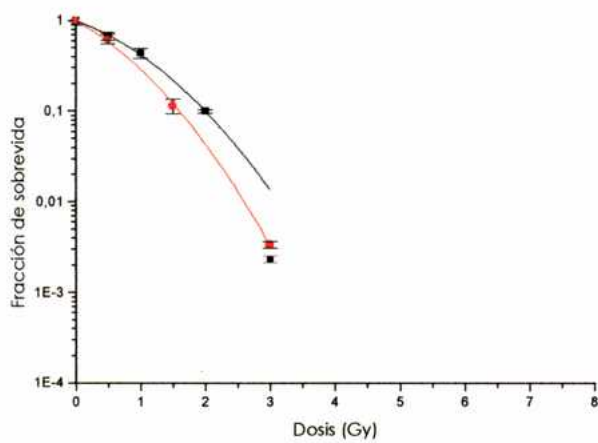


Figura II.12 Efecto de la radiosensibilización con DETA con protones de distinta energía pertenecientes a la diferentes porciones de la curva de Bragg: plateau (A), pico de Bragg (B) y porción distal (C) en las líneas celulares PDV y PDVC57. (● 0 mM DETA, ● 1 mM DETA).

A Plateau

	PDV		PDVC57	
DETA	0 mM	1 mM	0 mM	1mM
α (Gy ⁻¹)	0.316 ± 0,054	0.380 ± 0,086	0,100 ± 0,015	0,290 ± 0,022
β (Gy ⁻²)	0,060 ± 0,008	0,078 ± 0,016	0,062 ± 0,0052	0,094 ± 0,008
FS (2Gy)	0,51	0,34	0,63	0,38
SER ($\alpha T/\alpha 0$)	1	1,2 ± 0,33	1	2,9 ± 0,48
SER (FS2Gy Plateau)	1	1,48	1	1,74

B Pico de Bragg

	PDV		PDVC57	
DETA	0 mM	1 mM	0 mM	1mM
α (Gy ⁻¹)	0.402 ± 0,055	0.517 ± 0,063	0,448 ± 0,063	0,430 ± 0,078
β (Gy ⁻²)	0,076 ± 0,008	0,082 ± 0,018	0,247 ± 0,0168	0,182 ± 0,024
FS (2Gy)	0,33	0,25	0,15	0,20
SER ($\alpha T/\alpha 0$)	1	0,78 ± 0,13	1	0,96 ± 0,21
SER (FS2Gy Bragg)	1	1,19	1	0,90

C Porción distal

	PDV		PDVC57	
DETA	0 mM	1 mM	0 mM	1mM
α (Gy ⁻¹)	0.59 ± 0,061	0.88 ± 0,1	0,73 ± 0,041	0,61 ± 0,037
β (Gy ⁻²)	0,28 ± 0,031	0,33 ± 0,003	0,055 ± 0,009	0,055 ± 0,008
FS (2Gy)	0,100	0,046	0,18	0,19
SER ($\alpha T/\alpha 0$)	1	1,49 ± 0,22	1	0,83 ± 0,068
SER (FS2Gy Distal)	1	1,23	1	0,88

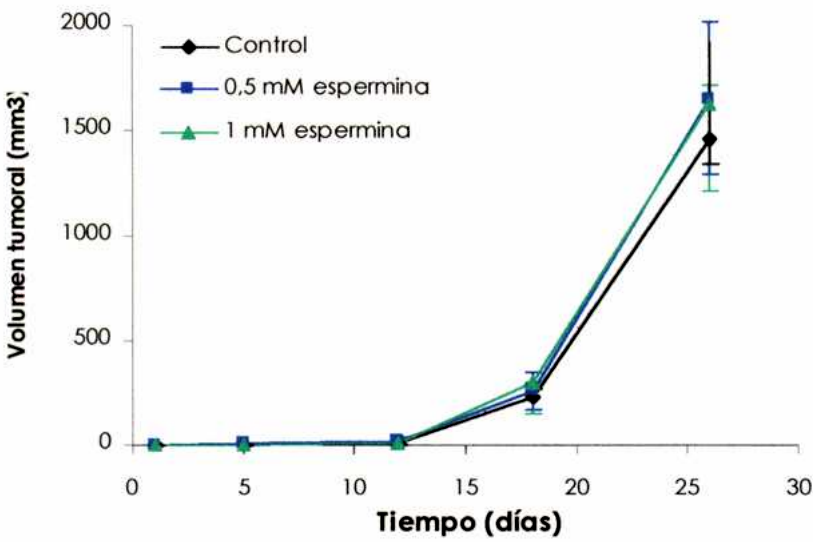
Tabla II.5 Parámetros de la curva de sobrevida α , β , FS 2Gy y SER de las líneas celulares PDV y PDVC57 irradiadas con haces de protones en zona de plateau (A), en el pico (B) y porción distal (C) de la curva de Bragg en presencia y ausencia del radiosensibilizador DETA (1 mM). Los valores de SER se calcularon como $SER(\alpha T/\alpha 0)$ donde αT corresponde a la curva tratada con 1 mM DETA y $\alpha 0$ corresponde a la curva sin tratar y como SER (FS2Gy sin tratamiento)

2.3.2.2 Evaluación del efecto de un dador de oxido nítrico *in vivo*

Irradiación con gamma

Se demostró un efecto radiosensibilizador del óxido nítrico en tumores experimentales. Los tumores tratados con 0,5 y 1 mM de espermina como dador de óxido nítrico, fueron radiosensibilizados al ser irradiados con 10 Gy de radiación gamma. Los tumores tratados con las mismas concentraciones de espermina y no irradiados crecieron de manera indistinguible con respecto a los tumores controles inoculados con vehículo (Figura II.13).

A Controles



B Tratados con espermina

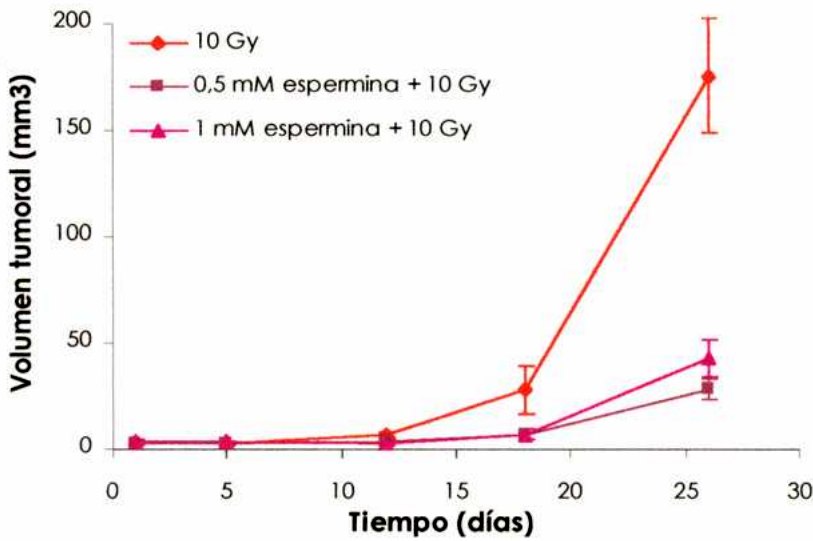


Figura II.13 Tumores experimentales tratados con espermina e irradiados con una única dosis de radiación gamma controles (A), tratados con el radiosensibilizador (B)

Irradiación con haces de protones

Los tumores tratados con espermina e irradiados con haces de protones en la zona de plateau de la curva de Bragg mostraron menor crecimiento con respecto a los tumores controles y a los irradiados en ausencia del dador de óxido nítrico. (Figura II.14).

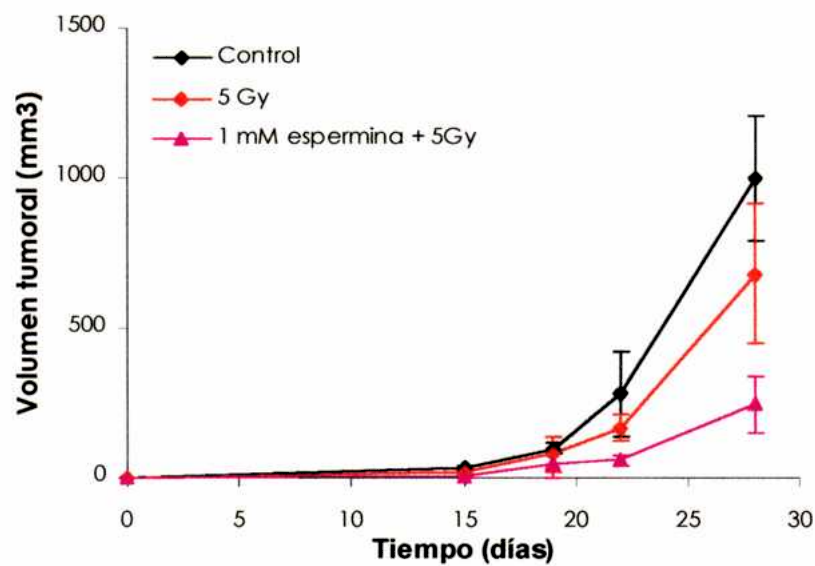


Figura II.14 Curvas de crecimiento de tumores experimentales tratados con espermina e irradiados con una única dosis de protones de energía que se corresponde con el plateau de la curva de Bragg.

DISCUSION II

Como se mencionó en la introducción, uno de los principales problemas de la radioterapia es la radiorresistencia que presentan algunos tumores. Una posibilidad para comprender los mecanismos que participan en la radiorresistencia es estudiar la radiosensibilidad intrínseca de las células tumorales que forman dicho tumor. Además de esta última característica, factores tales como la cantidad de células hipóxicas y la capacidad de repoblación de las células tumorales entre las fracciones de irradiación, son variables importantes que definen la respuesta de un tumor a la radioterapia.

En la primera parte de este capítulo, se evaluó si la radiosensibilidad celular intrínseca varía en función del aumento del grado de malignidad celular. La primera pregunta que surge para este análisis es qué parámetros son buenos indicadores de la radiosensibilidad celular. Estudios realizados por Deacon y col.¹³⁰, demostraron que la respuesta clínica de los tumores a la radiación se correlacionaba con algunos parámetros de las curvas de sobrevida de líneas celulares originadas a partir de tumores de los mismos grupos histológicos. Se demostró que la respuesta radiobiológica hasta los 2-3 Gy de estas líneas celulares se correlacionaba con la respuesta clínica de los tumores a la radioterapia. El parámetro α de la ecuación lineal cuadrática y la sobrevida a 2 Gy son los parámetros que mejor caracterizan esta porción de la curva de sobrevida. La sobrevida a dosis mayores a 2-3 Gy, caracterizada básicamente por el parámetro β de la ecuación lineal cuadrática no se correlaciona con respuestas radiobiológicas obtenidas en la clínica.

El parámetro α , que matemáticamente representa la pendiente de la tangente al origen de la curva de sobrevida con hombro, contribuye de manera importante a la forma de la curva de sobrevida a dosis bajas y su valor, en el marco de la teoría del blanco, es un indicador de la muerte celular por únicos eventos letales, tal como se discutirá más adelante. La importancia de la sobrevida a 2 Gy como parámetro indicador de la radiocurabilidad de un tumor, está basado en la forma en que se administra la dosis total en los protocolos de radioterapia. La dosis total generalmente oscila entre 40 y 65 Gy y se administra de forma fraccionada en dosis de 2 Gy, 5 veces por semana. Estos protocolos están basados en estudios que muestran que la dosis máxima

para la cura de un tumor, sin comprometer el tejido normal circundante, no puede exceder ciertos valores de dosis total máxima. Por otro lado, se ha demostrado que se puede aumentar la dosis total sin comprometer el tejido sano circundante si la dosis total se administra de manera fraccionada. Con lo expuesto anteriormente y teniendo en cuenta que un tumor es controlado cuando todas sus células clonogénicas han sufrido muerte reproductiva y sabiendo que un tumor humano generalmente contiene entre 0,01 y 1 % de células clonogénicas se puede hacer el razonamiento que se describe a continuación. Un tumor de 100 gramos que contiene aproximadamente 10^{11} células y 1% de células clonogénicas tendría aproximadamente 10^9 células con capacidad proliferativa. Dependiendo del valor de sobrevida que se obtiene luego de una irradiación con 2 Gy, dicho tumor podría tener diferentes destinos luego de irradiarlo con 30 fracciones de esta dosis. Si la sobrevida luego de una irradiación con 2 Gy es de 0,4, al finalizar el tratamiento quedarán 10^{-12} células clonogénicas, lo que se corresponde con una alta probabilidad de cura, tal como sucede con el linfoma de Burkitts cuya fracción de sobrevida a 2Gy es aún menor, de 0,18. Sin embargo, si la sobrevida a 2 Gy es de 0,6 la cantidad de células sobrevivientes al cabo del tratamiento será de 10^{-7} , lo que implica una baja probabilidad de cura como ocurre en el caso de los melanomas. Este ejemplo muestra la utilidad del valor de sobrevida a 2Gy como indicador de la respuesta del tumor a la radiación.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es importante comprender los modelos que intentan explicar la forma de la curva de sobrevida y la interpretación biológica de los parámetros a los que se ajusta dicha curva, aunque es necesario enfatizar las limitaciones de la simplificación de los conceptos sobre los cuales están basados los modelos. La teoría del "hit", ya descrita en la introducción, es uno de los modelos más simples que ha surgido para explicar la muerte celular por efecto de la radiación. De manera simplificada el término α de la ecuación lineal cuadrática representaría la muerte celular producida por eventos letales únicos y el parámetro β estimaría la muerte por acumulación de eventos subletales. Cabe señalar, que una de las limitaciones de esta teoría es la dificultad de interpretar biológicamente lo que se define como blanco o target en el modelo

matemático. El target no define simplemente una estructura celular cuyo daño lleva a la muerte celular, sino que un target celular es un concepto que expresa la probabilidad de que cierto tipo de eventos lleven a la muerte celular. Teniendo en cuenta esto último, es importante analizar aquellos modelos que consideran la capacidad de reparación celular como un factor de fundamental importancia en la radiosensibilidad intrínseca de una célula^{131,132}. El rol fundamental que cumplen los mecanismos de reparación celular sobre el daño generado por las radiaciones ionizantes se evidencia a través de la disminución del número de rupturas generadas en el ADN en función del tiempo postirradiación¹¹⁵. A modo de ejemplo, se puede mencionar que de las aproximadamente 1000 rupturas en el ADN que sufre una célula luego de recibir una dosis de 1 Gy quedan aproximadamente 20 luego de pocas horas. En los modelos basados en la reparación celular se han definido dos tipos de lesiones, aquellas que son directamente letales y otras que son potencialmente letales pero que son susceptibles de reparación. En este marco, el hombro de la curva de sobrevida aparece cuando el sistema está completamente operativo, es decir a dosis bajas. Cuando el sistema está saturado, todas las lesiones se convierten en letales y la curva de sobrevida se convierte en exponencial. Por otro lado, es importante agregar que la probabilidad de reparación de una lesión depende de la cantidad de energía que se ha transferido en ese punto. Kellerer y Rossi¹³² consideraron datos provenientes de la microdosimetría además de la reparación celular como factor determinante de la radiosensibilidad celular. Una gran concentración de energía en un punto se puede ocasionar porque se produce una gran densidad de ionizaciones a lo largo de la trayectoria de la partícula ionizante o por la adición de los efectos que producen la trayectoria de distintas partículas en un mismo sitio. Por otro lado, se ha comprobado experimentalmente que los cortes de doble cadena que se producen en el ADN por efecto de la radiación están vinculados directamente con la muerte celular, mientras que los cortes de simple cadena poseen alta probabilidad de reparación. Además, la proporción de cortes de doble cadena aumenta directamente con la densidad de ionizaciones, es decir con el LET. De este modo, Kellerer y Rossi explican satisfactoriamente numerosos fenómenos biológicos tales como la variación del RBE en función del LET, el rol de la tasa de dosis y las variaciones

en la forma de la curva de sobrevida. Con lo expuesto, cabe resaltar finalmente la importancia de la reparación celular y el aporte de información de la microdosimetría en la comprensión de la respuesta celular al daño por radiación.

Comparación de la radiosensibilidad a la radiación gamma en función de la malignidad celular

Todas las líneas celulares analizadas mostraron curvas de sobrevida con hombro, típicas de las células de mamíferos. Las líneas celulares derivadas de epidermis de ratón PB-CH72-T4 y PDV-PDVC57 mostraron una asociación entre el aumento de la radiorresistencia y el aumento del grado de malignidad. Las líneas celulares CH72-T4 y PDVC57 fueron más radiorresistentes que las líneas celulares PB y PDV respectivamente. Esta conclusión surge de la comparación de los parámetros de las curvas de sobrevida que caracterizan la radiosensibilidad celular, tal como se explicó anteriormente. Los valores de α de las líneas celulares CH72-T4 y PDVC57 son significativamente inferiores en relación a los obtenidos en las líneas celulares PB y PDV respectivamente. En el marco de la teoría del "hit", la muerte celular se generaría mayoritariamente por únicos eventos letales en las líneas más radiosensibles mientras que en las líneas más radiorresistentes, la muerte celular ocurriría principalmente por acumulación de eventos subletales. Esto último, también se refleja comparando la relación α/β de las curvas de sobrevida. La relación α/β representa la dosis en donde la muerte celular por únicos eventos es igual a la muerte celular provocada por acumulación de eventos subletales y por otro lado refleja el tamaño del hombro de la curva de sobrevida es decir la capacidad de reparación. Valores altos de α/β estarían indicando curvas con hombros pequeños, básicamente con una forma exponencial donde la contribución de β es relativamente baja y valores bajos estarían indicando curvas con hombro considerable y con una mayor capacidad de reparación. Los valores de α/β en las líneas celulares de ratón con mayor grado de malignidad celular fueron menores que en las líneas celulares menos tumorigénica. De la comparación de la FS 2Gy y los valores de FCS 2Gy surgen las mismas diferencias de radiosensibilidad entre líneas que concuerdan con lo expuesto anteriormente.

Una de los factores conocidos relacionado con el aumento de la radiorresistencia en las células tumorales es la presencia de oncogenes activados. En particular, se ha descrito la vinculación de la expresión del oncogenen ras con el aumento de la radiorresistencia¹³³⁻¹³⁵. La transfección del oncogen ras aumenta la radiorresistencia *in vitro* en células NIH-3T3, fibroblastos embrionarios de rata, células de rabdomiosacoma y células de osteosarcoma entre otras. En el caso de las líneas celulares utilizadas en este trabajo se ha descrito que la relación de copias del oncogen ras mutado/ ras normal aumenta en la línea celular PDVC57 (2:1) con respecto a la línea celular PDV(1:2)⁶¹. En lo que respecta al par comparativo PB-CH72-T4, la línea celular PB expresa normalmente el gen ras⁶⁰, mientras que la línea celular CH72-T4 se originó de un carcinoma obtenido en un protocolo de carcinogénesis química en dos pasos y se ha descrito que la progresión tumoral en este modelo está asociada con el incremento del número de copias de Ha-ras mutado^{136,137}. Estas evidencias sugieren que los niveles de expresión del oncogen Ha-ras asociadas al aumento de la malignidad celular podría contribuir a las diferencias de radiosensibilidad descritas. Otro factor posiblemente involucrado en las diferencias de radiosensibilidad entre las líneas celulares derivadas de ratón podría ser la diferencia en los niveles de SOD entre las líneas celulares. Según lo expuesto en la primera parte de esta tesis, las líneas celulares con mayor capacidad tumorigénica aumentan los niveles de superóxido dismutasa. El aumento de SOD en las líneas celulares con mayor capacidad tumorigénica podría disipar más eficientemente el anión superóxido generado durante la irradiación y disminuir su efecto tóxico, aunque también habría que considerar el efecto que tendría en la radiosensibilidad el aumento de peróxido de hidrógeno descrito en estas líneas.

Con respecto a las líneas celulares humanas se observa una correlación inversa entre el aumento de la malignidad celular y la radiorresistencia. En este caso la diferencias en radiosensibilidad posiblemente se deba a factores diferentes a los mencionados para las líneas derivadas de ratón. Su y Little mostraron un aumento de la radiorresistencia en líneas transfectadas con SV40T¹³⁸. En este sentido, la línea HBL-100 muestra una expresión positiva para este antígeno mientras que no existen evidencias de expresión para las células

MCF-7. Por otro lado, posiblemente los altos niveles basales de producción de peróxido de hidrógeno en la línea MCF-7 estén potenciando el efecto indirecto de la radiación, mediado por radicales libres.

Caracterización de la radiosensibilidad de líneas celulares con distinto grado de malignidad con haces de protones y de litio.

Uno de los objetivos de la radioterapia es el estudio de radiaciones ionizantes alternativas dado que en algunas circunstancias los protocolos convencionales con radiación gamma resultan inadecuados. Algunos tumores como por ejemplo neuroblastomas o melanomas presentan una gran radiorresistencia a la radiación gamma, en otros casos la ubicación del tumor en regiones cercanas a órganos críticos radiosensibles no permite aplicar la dosis necesaria para esterilizar el tumor. La utilización de haces de protones, como terapia radiante alternativa, se utiliza en diversos centros médicos de distintos países del mundo con resultados muy efectivos^{114,139} especialmente para el tratamiento de tumores de ojos y de tumores situados en la base del cráneo.

En el marco de un proyecto más amplio que se realiza en colaboración entre profesionales del Departamento de Física y del Departamento de Radiobiología de la CNEA, como ya se mencionó en materiales y métodos, se generaron haces de protones y de litio en el acelerador TANDAR, que fueron caracterizados desde el punto de vista físico y radiobiológico¹²⁹. En particular, en este trabajo de tesis, se evaluaron los efectos biológicos de haces monoenergéticos de partículas generadas en el acelerador TANDAR sobre células tumorales y tumores experimentales.

Las líneas celulares PDV y PDVC57 fueron irradiadas con haces de protones y de litio de diferentes energías. Las curvas de supervivencia irradiadas mostraron una pérdida progresiva del hombro en función del aumento del LET de las partículas, obteniéndose curvas completamente exponenciales para los haces de litio. El aumento de la deposición de energía por unidad de camino recorrido se traduce en un aumento del daño biológico directamente letal. Matemáticamente, este efecto se refleja en el aumento progresivo de los valores del parámetro α de la ecuación lineal cuadrática en función del LET de las partículas. De este modo, el aumento del componente lineal α y la

tendencia a cero del componente cuadrático β determinan curvas completamente exponenciales para las irradiaciones realizadas con haces de litio.

Desde el punto de vista biológico, el daño inducido por la radiación a nivel de ADN y su reparación determinan el efecto observado a nivel celular. El hecho de que las irradiaciones con partículas de baja energía y de alto LET generan mayor proporción de cortes de doble cadena en el ADN, con una menor probabilidad de reparación celular, que se correlaciona con la probabilidad de muerte celular, explica el aumento del RBE en función del LET y la pérdida del hombro en la curva de supervivencia.

En particular, se observa que las curvas obtenidas de las irradiaciones con haces de protones de la zona de plateau y de la zona del pico de Bragg no difieren significativamente entre sí para ambas líneas celulares, en cambio sí difieren con respecto a las curvas obtenidas con protones de la zona distal. Estos últimos poseen un LET que se aproxima a valores donde el efecto biológico relativo de los protones es máximo. A pesar de que existe discusión en la literatura respecto del máximo RBE alcanzado por los protones de baja energía¹⁴⁰⁻¹⁴⁵ se ha descrito que el mayor efecto biológico se alcanza con protones cuyos valores de LET rondan entre 30-40 keV/ μ m. Estos valores de LET son alcanzados por protones de muy baja energía y que por lo tanto poseen rangos de recorrido muy pequeños, lo que dificulta la evaluación de su efecto biológico en las líneas celulares y da origen en parte a la controversia de resultados en la literatura.

Por otro lado, los valores de RBE obtenidos con los haces generados por el acelerador TANDAR se encuentran dentro del rango descrito con haces de energías similares en otros modelos experimentales¹⁴³⁻¹⁴⁶.

Con respecto a las irradiaciones con haces de litio, se obtuvieron curvas exponenciales, sin hombro. Existe menor información en la literatura en lo que respecta a los efectos biológicos generados por haces de litio¹⁴⁷, lo que constituye un aporte interesante, por ejemplo para realizar cálculos de RBE de utilidad para terapias como la de captura neutrónica en boro (BNCT). En este tipo de tratamientos, una partícula α y una de litio se generan como consecuencia de la reacción de captura neutrónica en ^{10}B , siendo estas

partículas las principales responsables de la dosis en BNCT. Las dificultades de los cálculos de RBE precisos para esta terapia hacen que la posibilidad de evaluar la eficacia biológica de los diferentes componentes de BNCT por separado puedan aportar información sobre valores de RBE de utilidad para los cálculos dosimétricos.

En cuanto a la comparación entre líneas con respecto a la radiosensibilidad y la malignidad celular, las diferencias solo aparecen en las irradiaciones realizadas con protones de la zona del plateau. Estas diferencias de radiosensibilidad se pierden completamente a medida que aumenta el LET de las partículas con las que se irradia. A medida que las partículas con las que se irradia generan una mayor densidad de ionizaciones en su trayectoria, es decir a medida que aumentan sus valores de LET, aumenta la probabilidad de daño en el ADN de carácter irreparable. De este modo, luego de cierto umbral de valores de LET, a partir del cual disminuye la capacidad de reparación celular, no se observan diferencias a nivel biológico. Por otro lado, del análisis comparativo de la variación del RBE en función de las distintas fracciones de sobrevida se observa que existe un mayor efecto biológico relativo en función del aumento del LET de las partículas en la líneas PDVC57 con respecto a la línea PDV, especialmente a dosis bajas. Este fenómeno se puede interpretar teniendo en cuenta que la capacidad de reparación es mayor si la dosis y el LET de la radiación aplicada es baja (radiación gamma), por lo tanto la diferencias entre las líneas celulares se acentúan más en estas condiciones dado que el cálculo de RBE utiliza a la radiación gamma como referencia. Este resultado convierte a las partículas de alto LET, más allá de la selectividad física, en atractivas para el tratamiento de tumores radorresistentes. Por ejemplo, en el caso del tumor de melanoma que posee características altamente radioresistentes, sería interesante estudiar como es la respuesta de este tipo de tumor a irradiaciones con partículas de alto LET o la conuinación de estas últimas con las radiaciones gammas convencionales.

Evaluación del óxido nítrico como radiosensibilizador celular

Además de la búsqueda del uso de otras radiaciones ionizantes alternativas, otro objetivo clave de la radioterapia es explorar compuestos

químicos o farmacológicos que aumenten el efecto letal de la radiación. Uno de los principales problemas de los radiosensibilizadores es la falta de selectividad de efecto entre la célula tumoral y normal. Por lo tanto, la búsqueda de agentes radiosensibilizadores que actúen selectivamente sobre las células tumorales es de sumo interés.

Se ha descrito que el NO tiene efecto radiosensibilizador sobre bacterias¹²⁵ y sobre células de mamífero bajo condiciones hipóxicas¹²⁶⁻¹²⁸⁴, como se mencionó en la introducción. Sin embargo, en la mayoría de los trabajos, utilizan dadores de óxido nítrico que tienen una vida media muy corta como el DEA (vida $\frac{1}{2}$ 2-4 min), o dadores como SNAP o nitroprusiato que bajo condiciones aeróbicas no serían activos¹²⁷. Ninguno de los compuestos descritos anteriormente es apropiado para evaluar el efecto radiosensibilizador del NO en condiciones aeróbicas. Por esta razón, es importante evaluar el efecto radiosensibilizador de un dador de NO de vida media más larga y liberación constante a fin de alcanzar concentraciones óptimas suficientes para radiosensibilizar las células aeróbicas. Por otro lado, tampoco se ha evaluado un posible efecto radiosensibilizador selectivo del óxido nítrico sobre las células malignas. Debido al mayor estado prooxidativo basal de las células tumorales, el óxido nítrico podría potenciar el efecto indirecto de la radiación, que está mediado por radicales libres. Este efecto explicaría la acción del NO como radiosensibilizador selectivo de las células más malignas.

El dador de óxido nítrico DETA utilizado en este trabajo es de liberación constante y duradera (24 hs), de este modo se mantienen niveles constantes durante la irradiación. En primer lugar en esta sección, se demostró un efecto radiosensibilizador del óxido nítrico en condiciones aeróbicas. Aunque las células hipóxicas son un factor importante en la determinación de la radiosensibilidad de un tumor, un mayor efecto de la radiación sobre las células aeróbicas también permitiría un mejor y más rápido acceso del oxígeno en las zonas hipóxicas. Tal vez, un mayor efecto radiosensibilizador sobre las células aeróbicas estaría favoreciendo una mayor oxigenación del tumor entre fracciones y por lo tanto una mejora indirecta del efecto de la radiación sobre las células radiorresistentes hipóxicas iniciales del tumor.

En segundo término, los resultados de este trabajo mostraron un efecto diferencial radiosensibilizador del NO sobre las células malignas. Las líneas con mayor grado de malignidad, CH72-T4, PDVC57 y MCF-7, mostraron una mayor radiosensibilización que sus respectivos pares comparativos. A través de los parámetro α , la fracción de sobrevivencia a 2Gy y de los valores de SER se evidenció un aumento de la radiosensibilización en función de la concentración de DETA en las líneas celulares con mayor grado de malignidad con respecto a sus pares comparativos. La presencia de altos niveles de NO durante la irradiación podría favorecer la formación de una mayor cantidad de especies reactivas en las células con un mayor estado prooxidativo basal. Tal como lo demuestran algunas evidencias bibliográficas y los resultados obtenidos en el primer capítulo de esta tesis las células con mayor capacidad tumorigénica poseen mayor estado prooxidativo basal que sus pares comparativos.

En lo que respecta al efecto del óxido nítrico con haces de protones, no se observa efecto radiosensibilizador a medida que aumenta el LET de las partículas. Solamente se observa efecto radiosensibilizador en la línea PDVC57 con protones de 20 MeV, posiblemente debido a un efecto similar al que se produce con la radiación gamma.

Posiblemente el mecanismo de radiosensibilización del óxido nítrico sea a través de la fijación del daño indirecto de manera similar a la forma en que actúa el oxígeno. La radiación produce radicales libres orgánicos centrados en carbono. En condiciones de hipoxia, este daño sería reparado, en presencia de NO, el radical libre orgánico se combinaría con el NO formando: $-C-N=O$, generándose de esta manera la fijación del daño por un mecanismo similar al efecto oxígeno.

En este trabajo de tesis también se demostró el efecto radiosensibilizador del óxido nítrico en tumores experimentales con radiación gamma y con haces de protones. En este caso se utilizó un dador de óxido nítrico de vida media moderada como la espermina, debido a los efectos colaterales del óxido nítrico, tal como la vasodilatación. Este efecto también podría ser un factor importante en la radiosensibilización de los tumores experimentales más allá de los efectos generados por la fijación del daño a través de la formación de radicales libres. Aunque estos resultados deben

profundizarse resultan promisorios para su aplicación en futuros protocolos de radioterapia.

En síntesis, en este capítulo del trabajo de tesis se ha demostrado que: Las células con mayor grado de malignidad derivadas de ratón muestran una mayor radiorresistencia que sus pares comparativos, sin embargo el par humano muestra una radiosensibilidad inversa con respecto al grado de malignidad celular.

Los haces de protones generados por el acelerador Tandar muestran características similares a la de otros aceleradores en el mundo, como se demuestra a través de los valores de RBE. El tratamiento con haces de partículas, más allá de sus características de selectividad física sería ventajoso para la aplicación en tumores radiorresistentes.

El óxido nítrico muestra efecto radiosensibilizador en condiciones aeróbicas en líneas celulares con un efecto diferencial en las células malignas, y potencia la inhibición del crecimiento tumoral inducida por la radiación en tumores experimentales. Estos resultados sobre los efectos del óxido nítrico son aportes originales, que resultan interesantes para futuros estudios tendiente a evaluar la posible aplicación de agentes dadores de óxido nítrico en protocolos de radioterapias.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

A partir de los estudios realizados sobre las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la transformación celular se pueden mencionar las siguientes conclusiones:

- Existe una correlación entre el aumento del desbalance de las enzimas antioxidantes y el aumento de la malignidad celular. En los tres pares de líneas celulares utilizadas como modelo, se encontró una asociación entre el aumento de los niveles de SOD y la disminución de las enzimas disipadoras de peróxido de hidrógeno, catalasa y glutatión peroxidasa, y el aumento de la malignidad celular. Este aumento del desbalance enzimático en las líneas celulares con mayor grado de tumorigenicidad se asocia con un aumento de la producción de peróxido de hidrógeno.
- La compensación del desbalance enzimático con catalasa y mediante la transfección del cDNA de la catalasa humana inhibe la proliferación celular en todos los pares comparativos de líneas celulares estudiados y en otras líneas celulares provenientes de distintos tejidos y diversas especies. Este fenómeno indica el rol fundamental y general del peróxido de hidrógeno en la proliferación celular.
- El tratamiento de tumores experimentales con catalasa disminuye la tasa de crecimiento en dos modelos experimentales.
- El óxido nítrico podría ser partícipe en las vías de transducción de señales involucradas en la inhibición de la proliferación por disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno.

Estos resultados son promisorios para la búsqueda de nuevos tratamientos complementarios que tiendan a compensar desbalances oxidativos asociados a la transformación celular. Por otro lado, la variación de los niveles de enzimas

antioxidantes así como el aumento de la producción de peróxido de hidrógeno también podrían ser útiles como valor pronóstico para esta patología.

En cuanto a las conclusiones sobre los estudios radiobiológicos del segundo capítulo de esta tesis podemos mencionar:

- No existe una correlación clara con respecto al aumento de la malignidad celular y el aumento de la radiorresistencia a la radiación gamma. Mientras que las células de ratón mostraron un aumento de la radiorresistencia en función del aumento de la malignidad celular las líneas celulares humanas mostraron una correlación inversa. Posiblemente el hecho que distintos oncogenes estén asociados al proceso de transformación celular explique las distintas respuestas celulares a la radiación.
- El haz de protones generado por el acelerador TANDAR genera efectos radiobiológicos en las líneas celulares similares a los obtenidos por otros aceleradores en el mundo. Hay un aumento del daño biológico relativo en las líneas celulares en función del aumento del LET de las partículas con las que se irradia. Esto último, se refleja en el aumento de los valores de RBE en función del LET de las partículas. Por otro lado, las diferencias de radiosensibilidad observadas entre las líneas celulares para la radiación gamma sólo se manifiestan para las irradiaciones con partículas de bajo LET (protones de la zona de plateau).
- Se observan ventajas para la utilización de partículas de alto LET en los tumores radiorresistentes más allá de las propiedades de selectividad física que muestran las partículas, tal como se demuestra en la variación del RBE en función de la dosis y del LET de las partículas.
- El óxido nítrico muestra propiedades radiosensibilizadoras selectivas en función de la malignidad celular en los pares comparativos evaluados en la irradiaciones realizadas con gamma pero no así en las irradiaciones con

partículas de alto LET. Por otro lado, el óxido nítrico también muestra propiedades radiosensibilizadores en tumores experimentales.

Las conclusiones derivada del segundo capítulo de esta tesis muestran que podrían generarse nuevos protocolos para el tratamiento de tumores radiorresistentes basados en irradiaciones con partículas de mayor LET más allá de las ventajas de selectividad física que muestran estas partículas. Por otro lado, es promisorio el desarrollo de nuevos estudios que tiendan a evaluar la utilización del óxido nítrico como radiosensibilizador selectivo para su inclusión en nuevos protocolos en radioterapia.

Como conclusión final, los resultados expuestos en esta tesis abren la posibilidad de explorar nuevos enfoques en el tratamiento de esta patología relacionados con terapias compensatorias específicas de alteraciones oxidativas de la célula tumoral y de optimizar protocolos de radioterapia ya existentes. En este sentido, la implementación de terapia génica utilizando promotores o secuencias enhancer que responden a peróxido de hidrógeno acoplada a genes suicidas o la expresión selectiva de catalasa bajo promotores que se expresan en células altamente transformadas, así como la expresión de NOS bajo promotores que responden a la radiación constituye un nuevo enfoque con resultados promisorios.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CAPITULO I.

ESTUDIO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO Y DEL NITROGENO EN LA TRANSFORMACION CELULAR.

Introducción I

Figuras

Figura I.1	10
Estados de reducción parcial y total del oxígeno molecular.	
Figura I.2	11
Configuración electrónica del oxígeno molecular, estado basal, estados excitados y parcialmente reducido.	
Figura I.3	11
Generación del radical hidroxilo por reacción del anión superóxido y el peróxido de hidrógeno con metales de transición.	
Figura I.4	12
Peroxidación lipídica.	
Figura I.5	14
Reacción de dismutación del anión superóxido.	
Figura I.6	14
Reducción de peróxido de hidrógeno catalizada por la enzima catalasa.	
Figura I.7	15
Reducción de peróxido de hidrógeno y de otros hidroperóxidos orgánicos catalizada por la enzima glutatión peroxidasa.	
Figura I.8	15
Reducción de glutatión oxidado por acción de la enzima glutatión reductasa	
Figura I.9	16
Producción de especies reactivas del oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante celulares.	
Figura I.10	18
Participación de las especies reactivas del oxígeno en el proceso de transformación celular.	
Figura I.11	19
Principales blancos de reacción del óxido nítrico en la célula.	
Figura I.12	20
Reacción catalizada por óxido nítrico sintetasas.	

Resultados I

Tablas

Tabla I.1	43
Ensayo clonogénico y formación de colonias en agar blando de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7.	
Tabla I.2	44
Capacidad tumorigénica de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7.	
Tabla I.3	45
Niveles de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx de las líneas celulares PB; CH72T4, PDV y PDVC57	
Tabla I.4	46
Actividad de enzimas antioxidantes en las células HBL-100 y MCF-7.	
Tabla I.5	49
Producción de nitritos en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7	
Tabla I.6	62
Producción de nitritos en las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7 tratadas con catalasa.	
Tabla I.7	68
Producción de nitritos en la línea MCF-7 y en las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana.	

Figuras

Figura I.13	42
Curvas de crecimiento de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7.	
Figura I.14	47
Producción de peróxido de hidrógeno de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7.	
Figura I.15	48
Producción de anión superóxido de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7	
Figura I.16	50-51
Inhibición de la proliferación por tratamientos con distintas concentraciones de catalasa en los pares comparativos PB-CH72-T4, PDV-PDVC57, HBL-100-MCF-7.	
Figura I.16a	52
Recuperación de la capacidad proliferativa de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL100 y MCF-7 tratadas con catalasa.	

Figura I.17	53
Dependencia de la concentración de peróxido de hidrogeno en función de la concentración de catalasa presente en el medio extracelular en las líneas HBL-100 y MCF-7.	
Figura I.18	54
Modulación de los niveles de peróxido de hidrógeno e inhibición de la proliferación en otras líneas celulares	
Figura I.19	55
Determinación de apoptosis mediante la técnica de Hoechst en células tratadas con catalasa	
Figura I.20	56
Crecimiento tumoral en ratones nude tratados con catalasa	
Figura I.21	57
Crecimiento de tumores en ratones SENCAR tratados con catalasa.	
Figura I.22	57
Evolución del número de tumores de los animales tratados simultaneamente con el protocolo de carcinogénesis química y con catalasa	
Figura I.23	58
Fotos de tumores de ratones SENCAR tratados con catalasa	
Figura I.24	59
Actividad catalasa de las células MCF-7 y de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana.	
Figura I.25	60
Ensayo clonogénico de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana.	
Figura I.26	60
Caracterización de la curva de crecimiento de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana.	
Figura I.27	61
Actividad proliferativa de las células transfectadas con el cDNA de la catalasa humana.	
Figura I.28	61
Crecimiento de colonias en agar blando transfectadas con el cDNA de la catalasa humana.	
Figura I.29	63-64
Reversión de inhibición de la proliferación por tratamientos con catalasa y producción de nitritos por tratamientos con L-NAME.	
Figura I.30	66
Reversión de la inhibición de la proliferación por tratamientos con ODQ	
Figura I.31	67
Producción de nitritos en las células MCF-7 tratadas con catalasa y ODQ.	

Figura I.32	68
Proliferación y producción de nitritos de las células MCF-7 transfectadas con el cDNA de la catalasa tratadas con L-NAME.	

Figura I.33	69
Proliferación de las células MCF-7 transfectadas con el cDNA de la catalasa tratadas con ODQ.	

CAPITULO II

ESTUDIO DE LA RADIOSENSIBILIDAD INTRÍNSECA Y DE SU POSIBLE MODULACIÓN SELECTIVA EN FUNCIÓN DE LA MALIGNIDAD CELULAR

Introducción II

Figuras

Figura II.1	84
Acelerador TANDAR de la CNEA	

Figura II.2	87
Distribución de la dosis de las radiaciones electromagnéticas (rayos X y gamma) en función de la profundidad de penetración en la materia	

Figura II.3	88
Distribución de la dosis de un haz de partículas cargadas en función de la profundidad de penetración en la materia.	

Figura II.4	90
Acción directa e indirecta de la radiación ionizante	

Figura II.5	92
Curvas de sobrevida exponencial y con hombro	

Figura II.6.	95
Teoría del "hit" y curvas de sobrevida	

Resultados II

Tablas

Tabla II.1	106
Parámetros matemáticos α y β , relación α/β , la FS2Gy y el FCS2Gy de las curvas de sobrevida de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7 irradiadas con rayos gammas (^{137}Cs).	

Tabla II.2	109
Parámetros matemáticos α , β , FS 2Gy de las curvas de sobrevida de las líneas celulares PDV y PDVC57 irradiadas con haces de protones y de litio.	

Tabla II.3	110
RBE calculado como relación de α/α , FS2Gy y FS 0,1 de las curvas de sobrevida de las líneas celulares PDV y PDVC57 irradiadas con haces de protones y de litio	
Tabla II.4	115
Parámetros α , β , y fracción de sobrevida a 2Gy de las curvas de sobrevida ajustadas al modelo lineal cuadrático de las líneas PDV y PDVC57 tratadas con DETA e irradiadas con gamma (^{137}Cs)	
Tabla II.5	118
Parámetros de la curva de sobrevida α , β , FS 2Gy y SER de las líneas celulares PDV y PDVC57 tratadas con DETA e irradiadas con haces de protones.	
Figuras	
Figura II.7	105
Curvas de sobrevida de las líneas celulares PB y CH72-T4, PDV y PDVC57, HBL-100 y MCF-7 irradiadas con rayos gamma (^{137}Cs).	
Figura II.8	107
Curvas de sobrevida de las líneas PDV y PDVC57 irradiadas con rayos gamma y con haces de protones y de litio.	
Figura II.9	111
Variación del RBE en función del LET de las partículas.	
Figura II.10	112
Variación del RBE en función de las distintas fracciones de sobrevida de las líneas PDV y PDVC57 irradiadas con haces de protones y de litio.	
Figura II.11	114
Radiosensibilización de las líneas celulares PB, CH72-T4, PDV, PDVC57, HBL-100 y MCF-7 con DETA irradiadas con rayos gammas ^{137}Cs .	
Figura II.12	117
Radiosensibilización de las líneas celulares PDV y PDVC57 con DETA irradiadas con haces de protones y de litio.	
Figura II.13	119
Radiosensibilización de tumores experimentales tratados con espermina e irradiados con gamma.	
Figura II.14	120
Radiosensibilización de tumores experimentales tratados con espermina e irradiados con haces de protones.	

ABREVIATURAS

BH₄, tetrahidrobiopterina
BrdU, bromodeoxiuridina
CAT, catalasa
D, dosis
DAB, diaminobenzidina
DETA, Dietilenetriamina
DMBA, 7,12-dimetil-benz(a)antraceno
DMSO, dimetilsulfoxido
EGF, factores de crecimiento epidérmico
FAD y FMN, flavinas
FBS, suero fetal bovino
FGF, factor de crecimiento fibroblástico
GPx, glutatión peroxidasa
Gy, Gray
H₂O₂, peróxido de hidrógeno
HPO, peroxidasa de rábano
keV/μm⁻¹ kiloelectronvolt/μm
LET, transferencia lineal de energía
L-NAME, L-N^G-nitroarginina metil ester
MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium de bromo
NBT, al nitroblue tetrazolium
NO, óxido nítrico
NO₂, dióxido de nitrógeno
NOS, óxido nítrico sintetasa
O₂⁻, anión superóxido
O₂['], oxígeno singulete
ODQ, 1H-(1,2,4) oxadiazolo(4,3-a) quinoxadin-1-ona
·OH, radical hidroxilo

ONOO⁻, peroxinitrito

PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas

RBE, eficacia biológica relativa

RFLP, polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción

S, células sobrevivientes

SOD, superóxido dismutasas

SOD-Cu-Zn, superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc

SOD-Mn, superóxido dismutasa dependiente de manganeso

TPA, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

REFERENCIAS

1. Rous P. Transmission of a malignant new growth by means of cell-free filtrates. J. Am. Med. Assoc. 56:198, 1911.
2. Butel J. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. Carcinogenesis 2: 405-426, 2000.
3. Stéhelin D, Varmus H, Bishop J, Vogt. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 260:170-173, 1976.
4. Heldin C, Westermark B. Growth factors: mechanism of action and relation to oncogenes. Cell 37: 9-20, 1984.
5. Brown M, McCormack M, Zinn K, Farrell M, Bikel I, Livingston D. A recombinant murine retrovirus for simian virus 40 large T cDNA transforms mouse fibroblasts to anchorage-independent growth. J. Virol. 60: 290-293, 1986.
6. Stewart T, Pattengale P, Leder P. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes. Cell 38: 627-37, 1984.
7. Friend S, Bernards R, Rogelj S, Weinberg R, Rapaport j, Albert D, Dryja T. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcome. Nature 323: 643-646, 1986.
8. Strong L, Fraumeni J, Nelson C, Kim D, Kassel J y col. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. Science 250: 1233-1238, 1990.
9. Lockhart D and Winzeler E. Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature 405: 827-405, 2000.
10. Pandey A and Mann M. Proteomics to study genes and genomes. Nature 405: 837-846. 2000
11. Fialkow P. Clonal origin of human tumors. Biochim. Biophys. Acta 458: 283-321, 1976.
12. Bishop J. Cancer: the rise of genetic paradigm. Gen. Develop. 9: 1309-1315, 1995.
13. Knudson A. Two genetic hits (more or less) to cancer. Nat. Rev. Cancer 1: 157-162, 2001.
14. Ponder B. Cancer genetics. Nature 411: 336-341, 2001.
15. Robertson K and Jones P. DNA methylation: past, present and future directions. Carcinogenesis 21: 461-467, 2000.

- 16.** Hoeijmakers J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374, 2001.
- 17.** Evan G and Vousden K. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348, 2001.
- 18.** Boutwell R. Model systems for defining initiation, promotion and progression of skin neoplasms. En: *Skin carcinogenesis: mechanisms and human relevance progress in clinical and biological research*. En: *Progress in Clinical and Biological Research*. Slaga T, Klein-Szanto A, Boutwell R, Stevenson D, Spitzer H, D'Motto B. Alan R (eds). Vol. 298, pp. 3-35. Liss Inc. New York, 1989.
- 19.** Lewin B. Oncogenes: gene expression and cancer. En: *GENES V*, Cap 39, pp. 1181-1229. Oxford University Press, 1994.
- 20.** Cadenas E. Mechanisms of oxygen activation and reactive oxygen species detoxification. En: *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. Ahmad S (ed). Cap 1, pp. 1-46. Chapman & Hall, 1995.
- 21.** Beckman K and Ames B. Oxidants, antioxidants and aging. En: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Scandalios J (ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- 22.** Chance B, Sies H and Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol.Rev.* 59: 527-605,1979.
- 23.** Marnett L. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 21: 361-370, 2000.
- 24** Yu B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 44: 138-162,1994.
- 25.** Zelko I, Mariani J, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and Ec-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free. Radic. Biol. Med.* 33: 337-349, 2002.
- 26.** Zamocky M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72: 19-66, 1999.
- 27.** Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein. *J. Biol. Chem.* 277: 41254-41258, 2002.

- 28.** Burkitt M. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherols, thiols and ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* 394: 117-135, 2001.
- 29.** Guyton K, Kensler T. Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Brit. Med. Bull.* 49: 523-544, 1993.
- 30.** Ames B. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264, 1983.
- 31.** Lewis J, Adams D. Early inflammatory changes in the skin of SENCAR and C57BL/6N mice following exposure to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*. 8: 889-898, 1987.
- 32.** Weizman S, Gordon L. Inflammation and cancer: role of phagocyte generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76: 365-389, 1990.
- 33.** Nelson R. Dietary iron and colorectal cancer risk. *Free. Radic. Biol. Med.* 12: 161-168, 1992.
- 34.** Burdon R, Gill V, Alliangana D. Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts. *Free. Rad. Res.* 24: 81-93, 1996.
- 35.** Rao G, Berk B. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ. Res.* 18: 775-794, 1992.
- 36.** Monteiro H., Stern A. Redox modulation of tyrosine phosphorylation dependent signal trasduction pathways. *Free. Radic. Biol. Med.* 21: 323-333, 1996.
- 37.** Hsu T, Young M, Cmarik J, Colburn N. Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor κ B (NF- κ B) – dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 1338-1348, 2000
- 38.** Rao, G.N. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene* 13: 713-719, 1996.
- 39.** Henry Y, Guissani A, Ducastel B. EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds. Cap. 2: Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. En: *Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology*, pp. 15-44. Landes Company and Chapman & Hall, 1997.
- 40.** Monteiro, H.P. Signal transduction by protein tyrosine nitration: competition or cooperation with tyrosine phosphorylation – dependent signaling events. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 765-773, 2002.

- 41.** Leibler D, Aust A, Wilson G, Copeland E. Reactive Oxidants from Nitric Oxide, Oxidants and Cellular Signalling, and Repair of Oxidative DNA Damage: A Chemical Pathology Study Section Workshop. *Molecular Carcinogenesis* 22: 209-220, 1998.
- 42.:** Henry Y, Guissani A, Ducastel B. EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds. Cap 8: Nitric Oxide Biosynthesis in Mammals. En: *Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology*, pp. 175-192. Landes Company and Chapman & Hall, 1997.
- 43.** Robertson F, Long B, Tober K, Ross M, Oberyshyn T. Gene expression and cellular sources of inducible nitric oxide synthase during tumor promotion. *Carcinogenesis* 17: 2053-2059, 1996.
- 44.** Ahmad N, Srivastava R, Agarwal R, Mukhtar H. Nitric Oxide Synthase and Skin Tumor Promotion. *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 232: 328-331, 1997.
- 45.** Vallette G, Tenaud I, Branka J, Jarry A, Sainte-Marie I, Dreno B, Laboisse C. Control of growth and differentiation of normal human epithelial cells through the manipulation of reactive nitrogen species. *Biochem. J.* 331: 713-717, 1998.
- 46.** Mangrinat G, Mason S, Shami P, Weinberg J. Nitric oxide modulation of human leukemia cell differentiation. *Blood* 80: 1880-1884, 1992.
- 47.** Peunova N, Enikolopov G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells. *Nature* 375: 68-73, 1995.
- 48.** Grollman A, Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine. An enemy within. *Trends Genet.* 9: 246-249, 1993.
- 49.** Wang R, Ghahary A, Shen Y, Scott P, Tredget E. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. *J Invest. Dermatol.* 108: 438-444, 1997.
- 50.** Tschugguel W, Shneeberger C, Unfried G, Czerwenka K, Weninger S, Mildner M, Gruber D, Sator M, Waldhor T, Huber J. Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast depends on tumor grade. *Breast Cancer Res. Treat.* 56: 145-151, 1999.
- 51.** Martin J, Begum S, Alalami O, Harrison A, Scott K. Endothelial nitric oxide synthase: correlation with histological lymph node status and estrogen receptor expression in human breast cancer. *Tumor Biol.*, 21: 90-97, 2000.
- 52.** Brennan P, Umar T, Buckley J, Zaki G, Langdon J, Spedding A, Peters W. Expression of nitric oxide synthase in pleomorphic adenomas of the parotid. *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 38: 338-342, 2000.

- 53.** Klotz T, Bloch W, Jacobs G, Niggemann S, Engelmann U, Addicks K. Immunolocalization of inducible and constitutive nitric oxide synthases in human bladder cancer. *Urology* 54: 416-419, 1999.
- 54.** Thomsen L, Lawton F, Knowles R y col. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res.* 54: 1352-1354, 1994.
- 55.** Cobbs C, Brenman J, Aldape K y col. Expression of nitric oxide synthase activity in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 55: 727-730, 1994.
- 56.** Jansson O, Morcos E, Brundin L, Bergerheim U, Adolfsson J, Wiklund N. Nitric oxide synthase activity in human renal cell carcinoma. *J. Urol.* 160: 556-560, 1998.
- 57.** Shi Q, Huang S, Jiang W, Kutach L, Ananthaswamy H, Xie K. Direct correlation between nitric oxide synthase II inducibility and metastatic ability UV-2237 murine fibrosarcoma cells carrying mutant p53. *Cancer Res.* 59: 2072-2075, 1999.
- 58.** Heck D, Laskin D, Gardner C, Laskin J. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 21277-21280, 1992.
- 59.** Clementi E, Sciorati C, Riccio M, Miloso M, Meldolesi J, Nistico G. Nitric oxide action on growth factor-elicited signals. *J. Biol. Chem.* 270: 22277-22282, 1995.
- 60.** Yuspa S, Morgan D, Lichti U, Spangler E, Michael D, Kilkeny A, Hennings H. Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by initiation-promotion protocol. *Carcinogenesis.* 7: 949-958, 1986.
- 61.** Quintanilla M, Haddow S, Jonas D, Jaffe D, Bowden GT, Balmain A. Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Carcinogenesis* 12: 1875-1881, 1991.
- 62.** Díaz-Guerra M, Haddow S, Bauluz C, Jorcano JL, Cano A, Balmain A, Quintanilla M. Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey ras gene alterations. *Cancer Res.* 52: 680-687, 1992.
- 63.** Larcher F, Robles AI, Durán H, Murillas R, Quintanilla M, Cano A, Conti CJ, Jorcano JL. Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res.* 56: 5391-5396, 1996.
- 64.** Gaffney EV. A cell line (HBL-100) established from human breast milk. *Cell Tissue Res.*, 227: 563-568, 1982.
- 65.** Caron de Fromentel C, Nardeux PC, Soussi T, Lavialle C, Estrade S, Carloni G,

- Chandrasekaran K, Cassingena R. Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information. *Exp. Cell Res.* 160: 83-94, 1985
- 66.** Soule HD, Vazquez J, Long, A, Albert, S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 51:1409-1416, 1973.
- 67.** Osborne CK, Hobbs K, Clark GM. Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 45: 584-590, 1985.
- 68.** Franks LM. What is cancer? In: Franks LM, Teich NM. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Third Edition. Oxford University Press. Cap. 1, 1997.
- 69.** Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* 11: 359-366, 1957.
- 70.** Fisher, E. The pathology of breast cancer. *Cancer* 36: 1-263, 1975.
- 71.** Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461-463, 1977
- 72.** Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dimutase: improved assay and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287, 1971.
- 73.** Nelson D, Kiesow L. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C. *Anal. Biochem.* 49: 474-478, 1972.
- 74.** Tappel, AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxide. *Methods Enzymol.* 52: 506-513, 1978.
- 75.** Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51: 794-798, 1991.
- 76.** Rook GA, Steele J, Umar S, Dockrell HM. A simple method for the solubilisation of reduced NBT, and its use as a colorimetric assay for activation of human macrophages by γ -interferon. *J. Immunol. Meth.* 82: 161-167, 1985.
- 77.** Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138, 1982.
- 78.** Liu Y, Peterson A, Kimura H and Schubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.* 69: 581-593, 1997.

- 79.** Spector, D.L., Goldman, R.D. and Leinwand, L.A. Analyzing DNA replication: nonisotopic labeling. En: K. Janssen (ed.), Cells. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 3, pp. 109.1-109.13, 1997.
- 80.** Spector, D.L., Goldman, R.D. and Leinwand, L.A. Apoptosis assays. En: K. Janssen (ed.), Cells. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 1, capítulo 15, 1997.
- 81.** Giovanella B, Fogh J. The nude mouse in cancer research. Adv. Cancer Res. 44: 69-120, 1985.
- 82.** Boutwell R, Some biological aspects of skin carcinogenesis. Prog. Exp. Tumor Res. 4: 207-250, 1964.
- 83.** Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 84.** Oberley L and Buettner G. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. Cancer Res 39: 1141-1149, 1979.
- 85.** Rabilloud T, Asselineau D, Miquel C, Calvayrac R, Darmon M, Vuillume M. Deficiency in catalase activity correlates with the appearance of tumor phenotype in human keratinocytes. Int. J. Cancer 45: 942-956, 1990.
- 86.** Sun Y, Colburn N, Oberley W. Depression of catalase gene expression after immortalization and transformation of mouse liver cells. Carcinogenesis 14: 1505-1510, 1993.
- 87.** Reiners J, Thai G, Rupp T, Cantu A. Assessment of antioxidant prooxidant status of murine skin following treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and through the ontogeny of skin cancer. Part I: quantification of superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxidase and xantine oxidase. Carcinogenesis 1: 2337-2343, 1991.
- 88.** Shindo Y, Witte D, Parcker L. Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light. J. Invest. Dermatol. 100: 260-265, 1993.
- 89.** Cerrutti P, Shah P, Amstad P. Oxidant carcinogenesis and antioxidant defense. Ann. New York Acad. Sci. 663: 158-166, 1992.
- 90.** Jain P, Chang S, Berezesky I, Amstad P, Cerutti P, Trump B. Differential cytotoxicity in mouse epidermal JB6: a potential mechanism for oxidant tumor promotion. Mol. Carcinog. 11: 164-169, 1994.

- 91.** Satomi, A., Murakami, S., Hashimoto, T., Ishida, K., Matsuki, M. and Sonoda, M. Significance of superoxide dismutase (SOD) in human colorectal cancer tissue: correlation with malignant intensity. *J. Gastroenterol.* 30: 177-182, 1995.
- 92.** Lehtola K, Laurilainen K, Leino L, Ahotupa M, Punnonen K. Antioxidant enzymes are elevated in dimethybenz(a)anthracene induced neoplastic murine keratinocytes containing an active ras oncogene. *J. Can. Res. Clin. Oncol.* 121: 402-406, 1995.
- 93.** Picardo M, Grammatico F, Roccella M, Grandinetti M, Del Porto G, Passi S. Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 107: 322-326, 1996.
- 94.** Chung-man Ho J., Zheng, S., Comhair, S.A., Farver, C. and Erzurum S.C. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 61: 8578-8585, 2001.
- 95.** Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviba K, Oberley T, Scharffetter-Kochanek K. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. *J. Biol. Chem.* 274: 25869-25876, 1999.
- 96.** de Haan J, cristiano F, Iannello R, Bladier C, Kelner M, Kola I. Elevation in the ratio of Cu/Zn-superoxide dismutase to glutathione peroxidase activity induces features of cellular senescence and this effect is mediated by hydrogen peroxide. *Hum. Mol. Genet.* 5: 283-292, 1996.
- 97.** Schmidt K, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle P. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kB. *Chem.Biol.* 2: 13-22, 1995.
- 98.** Teixeira H, Schumacher R, Meneghini R. Lower intracellular hydrogen peroxide levels in cells overexpressing CuZn-superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7872-7875, 1998.
- 99.** Gardner R, Salvador A, Moradas-Ferreira P. Why does SOD overexpression sometimes enhance, sometimes decrease, hydrogen peroxide production? A minimalist explanation. *Free. Rad. Biol. Med.* 32: 1351-1357, 2002.

- 100.** Bello B, Paolicchi A, Comporti M, Pompella A, Maellaro E. Hydrogen peroxide produced during gamma-glutamyl transpeptidase activity is involved in prevention of apoptosis and maintenance of proliferation in U937 cells. *FASEB J.* 13: 69-79, 1999
- 101.** Brown M, Miller F, Ellinson A, Mozena J, Chatterjee P, Engelhardt J, Zwacka M, Oberley L, Fang X, Spector A, Weintraub N. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ.Res.* 85: 524-533, 1999.
- 102.** Suh Y, Arnold R, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung A, Griending K, Lambeth J. Cell transformation by the superoxide generating oxidase Mox1. *Nature* 401. 79-82, 1999.
- 103.** Arnold R, Shi J, Murad E, Whalen A, Sun C, Polavarapu R, Parthasarathy S, Petro J, Lambeth J. Hydrogen peroxide mediates the cell growth and transformation caused by the mitogenic oxidase Nox1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5550-5555, 2001.
- 104.** Nilakantan V, Spear B, Glauert H. Liver-specific catalase expression in transgenic mice inhibits NF-kappaB activation and DNA synthesis induced by the peroxisome proliferator ciprofibrate. *Carcinogenesis* 19: 631-637, 1998.
- 105.** Zhang J, Jin N, Liu Y, Rhoades R. Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell. Moll. Biol.* 19: 324-332, 1998.
- 106.** Sun Y, Oberley L. Redox regulation of transcriptional activators. *Free. Radic. Biol. Med.* 21: 335-338, 1996.
- 107.** Huang RP, Peng A, Golard A, Hossain MZ, Huang R, Liu YG, Boynton AL. Hydrogen peroxide promotes transformation of rat liver non-neoplastic epithelial cells through activation of epidermal growth factor receptor. *Mol. Carcinog.* 30: 209-217, 2001.
- 108.** Zhong W, Oberley LW, Oberley TD, St. Clair DK. Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene* 14: 481-490, 1997.
- 109.** Lam EW, Zwacka R, Engelhardt JF, Davidson BL, Domann FEJr, Yan T, Oberley LW. Adenovirus – mediated manganese superoxide dismutase gene transfer to hamster cheek pouch carcinoma cells. *Cancer Res.* 57: 5550-5556, 1997.

- 110.** Zhang Y, Zhao W, Zhang HJ, Domann FE, Oberley LW. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase suppresses human glioma cell growth. *Cancer Res.* 62: 1205-1212, 2002.
- 111.** Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60: 3927-3939, 2000.
- 112.** Wolin M, Mohazzab-H KM. Mediation of signal transduction by oxidants. En: JG Scandalios (ed.), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*, pp. 21-48, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.
- 113.** Hall E. *Radiobiology for the Radiologist*. 4^{ta} edición. J.B. Lippincott Company, 1994.
- 114.** Raju M, Proton radiobiology, radiosurgery and radiotherapy. *Int. J. Radiat. Biol.* 67: 237-259, 1995.
- 115.** Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. *Introduction to Radiobiology*. Taylor & Francis, London, 1990.
- 116.** Pouget JP, Mather S. General aspects of the cellular response to low- and high-LET radiation. *Eur. J. Nucl. Med.* 28: 541-561, 2001.
- 117.** Maity A, Kao G, Muschel R, McKenna G. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 37: 639-653, 1997.
- 118.** Schmidt-Ullrich R, Dent P, Grant S, Mikkelsen R, Kristoffer V. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat. Res.* 153: 245-257, 2000.
- 119.** Muschel R, Soto D, McKenna W and Bernhard E. Radiosensitization and apoptosis. *Oncogenes.* 7: 3359-3363, 1998.
- 120.** Morgan W, Day J, Kaplan M, McGhee E, Limoli C. Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 146: 247-258, 1996.
- 121.** Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 397-404, 2000.
- 122.** Mothersill C, Seymour C. Radiation-induced bystander effects: past, history and future direction. *Radiat. Res.* 155: 759-767, 2001.
- 123.** Puck T, Markus P. Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.* 103: 653-666, 1956.
- 124.** Dertinger H, Jung H. *Molecular Radiation Biology*. Springer-Verlag New York – Heidelberg – Berlin, 1970

- 125.** A-Howard-Flanders P. Effect of nitric oxide on the radiosensitivity of bacteria. *Nature* 180:1191-1192, 1957.
- 126.** Mitchell J, Wink D, DeGraff W, Gamson J, Keefer L, Krishna M. Hypoxic mammalian cell radiosensitization by nitric oxide. *Cancer Res.* 53: 5845-5848, 1993.
- 127.** Verovski V, Van den Berge D, Soete G, Bols B, Storme G. Intrinsic radiosensitivity of human pancreatic tumour cells and the radiosensitising potency of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *Br. J. Cancer* 74: 1734-1742, 1996.
- 128.** Griffin R, Makepeace C, Hur J, Song C. Radiosensitization of hypoxic tumor cells in vitro by nitric oxide. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36: 377-83, 1996.
- 129.** Schuff J, Policastro L, Durán H, Kreiner A, Mazal A, Molinari B, Burlón A y col. Relative biological effectiveness measurements of low energy proton and lithium beams on tumor cells. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B* 187: 345-353, 2002.
- 130.** Deacon J, Perckham M, Steel G. The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother. Oncol.* 2: 317-23, 1984.
- 131.** Goodhead D. Saturable repair models of radiation action in mammalian cells. *Radiat. Res., Suppl.* 8, 104: 58-67, 1985.
- 132.** Kellerer AM, Rossi HH. A generalized formulation of dual radiation action. *Radiat. Res.* 75: 471-488, 1978
- 133.** Bernhard E, Stanbridge E, Gupta S, Gupta A, Soto D, Bakanauskas V, Cerniglia G, Muschel R, Gillies McKenna W. Direct evidence for the contribution of activated N-ras and K-ras oncogenes to increased intrinsic radiation resistance in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 60: 6597-6600, 2000.
- 134.** Clutton S, Townsend K, Walker C, Ansell J, Wright. Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures. *Carcinogenesis* 17: 1633-1639, 1996.
- 135.** Gupta A, Bakanauskas V, Gillies McKenna W, Bernhard E, Muschel R. Ras regulation of radioresistance in cell culture. *Meth. Enzymol.* 333: 284-290, 2001.
- 136.** Yuspa S H, Morgan D, Lichti U, Spangler EF, Michael D, Kilkenny A, Hennings H. Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by an initiation-promotion protocol. *Carcinogenesis* 7: 949-58, 1986.
- 137.** Buchmann A, Ruggeri B, Klein-Szanto AJP, Balmain. Progression of squamous carcinoma cells to spindle carcinomas of mouse skin is associated with an imbalance of H-ras alleles on chromosome 7. *Cancer Res.* 51: 4097-4101, 1991.

- 138.** Su LN, Little JB. Prolonged cell cycle delay in radioresistant human cell lines transfects with activated ras oncogene and/or simian virus 40 T antigen. *Radiat. Res.* 133: 73-79, 1993
- 139.** Raju M. Particle Radiotherapy: Historical Developments and Current Status. *Radiat. Res.* 145: 391-407, 1996.
- 140.** Paganetti H, Niemierko A, Ancukiewicz M, Gerweck L, Goitein M, Loeffler J. Relative biological effectiveness (RBE) values for proton beam therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 53:407-421, 2002.
- 141.** Yang T. Proton radiobiology and uncertainties. *Radiat. Meas.* 30: 383-392, 1999.
- 142.** Bonnett D. Current development in proton therapy: a review. *Phys. Med. Biol.* 38: 1371-1392, 1993.
- 143.** Belli M, Cherubini R, Finotto S, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini M. RBE-LET relationship for the survival of V79 cells irradiated with low energy protons. *Int. J. Radiat. Biol.* 55: 93-104, 1989.
- 144.** Belli M, Cera F, Cherubini R, Haque A, Ianzini F, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini M, Tiveron R. Inactivation and mutation in V79 cells by low energy protons: re-evaluation of the results at LNL facility. *Int J Radiat Biol.* 63: 331-337, 1993.
- 145.** Belli M, Cera F, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Haque A, Ianzini F, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini M, Tiveron P. RBE-LET relationships for cell inactivation and mutation induced by low energy protons in cells: further results at the LNL facility. *Int. J. Radiat. Biol.* 74: 501-509, 1998.
- 146.** Folkard M, Prise K, Vojnovic B, Newman H, Roper M, Michael B. Inactivation of V79 cells by protons, deuterons and helium-3 ions. . *Int. J. Radiat. Biol.* 69: 729-738, 1996.
- 147.** Orecchia R, Zurlo A, Loasses A, Krengli M. Tosi G, Zurrada S, Zucali P, Veronesi U. Particle beam therapy (hadrontherapy): basis for interest and clinical experience. *Eur. J. Cancer* 34: 459-468, 1998.