

RADIORESISTENCIA EN GLIOBLASTOMA: PAPEL DE LA HIPOXIA EN LA GENOTOXICIDAD TUMORAL INDUCIDA POR RADIACIONES IONIZANTES

Cepeda-Forero, Karen^{1,a}; Langer-Barrera, María^{1,a}; Mosquera-Paternina, Andrés^{1,a}; Montoya-Vega, Christopher^{1,a}; Riveros-Calvete, Paula^{1,a}; Mendoza-Guerra, Alejandra^{1,a}; Cruz-Cuevas, Jose^{1,a}; Calderón-Suta, Juan^{1,a}; Aponte-Martínez, María^{1,a}; Patiño-Herrera, Daniela^{1,a}; Velandia-Romero, Laura^{1,a}; Quintero-Mejía, Paulo^{2,b}; Ondo-Méndez, Alejandro^{1,3,c}.

1. Semillero de Investigación en Bioquímica (SiBio), Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
 2. Centro de Control de Cáncer Ltda.
 3. Unidad de Bioquímica, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia.
- a. Estudiante de Medicina
 b. Físico Médico, Ms. C.
 c. Biólogo Ph. D, Profesor Asociado de Carrera

CIMEL 2018; 23(1) 19-26

RESUMEN

Objetivo: El glioblastoma multiforme es el astrocitoma grado IV más frecuente en la edad adulta, caracterizado una alta radioresistencia, que se asocia a la presencia de regiones hipóxicas en el tumor. Dada la importancia de la hipoxia sobre la respuesta celular a las radiaciones ionizantes, en este trabajo se estudió la relación entre la hipoxia, el daño en el ADN y la supervivencia celular. **Metodología:** Se utilizaron las líneas celulares de glioblastoma (U87) y cáncer de mama (MCF-7). Se evaluó el efecto de la radiación ionizante sobre la supervivencia de ambas líneas celulares en condiciones de hipoxia o normoxia, empleando el ensayo de formación de colonias. El daño del ADN se evaluó mediante la técnica de electroforesis en gel de célula única o ensayo de cometa. **Resultados:** La línea U87 presentó mayor radioresistencia en condiciones de hipoxia a 8 Gy, pero menor radioresistencia a dosis intermedias (6 Gy). MCF-7 presenta mayor radioresistencia en normoxia, aunque no estadísticamente significativa. En el ensayo del cometa, MCF-7 presenta mayor daño del ADN al aumentar la dosis de irradiación en hipoxia, y U87 muestra un aumento en el daño en hipoxia, que no es dosis dependiente. **Conclusión:** Se evidenció que en la línea U87, no hay correlación entre el aumento en el daño en el ADN en hipoxia y la supervivencia celular, sugiriendo una alta capacidad de reparación del ADN para esta línea. Contrariamente, en la línea celular MCF-7, se evidencia que sus mecanismos de reparación son más eficientes en condiciones de normoxia.

Palabras clave: Neoplasias de la mama; Glioblastoma; Hipoxia; Radiación Ionizante; Resistencia a Antineoplásicos

RADIORESISTANCE IN GLIOBLASTOMA: ROLE OF HYPOXIA IN THE TUMORAL GENOTOXICITY INDUCED BY IONIZING RADIATION

ABSTRACT

Objective: Glioblastoma multiforme is the most frequent grade IV astrocytoma in adulthood, and is characterized by a high radioresistance, which is associated with the presence of hypoxic regions within the tumor. Considering the important role of hypoxia on the cellular response to ionizing radiation, in this study, we evaluated the relationship between hypoxia, DNA damage and cell survival. **Methodology:** Two different cellular lines were used, glioblastoma (U87) and breast cancer (MCF-7). The effect of the ionizing radiation on the survival of both cellular lines under conditions of hypoxia and normoxia, was evaluated using the colony forming assay. The DNA damage was evaluated by electrophoresis technique in gel of a single cell or comet testing. **Results:** The U87 line presented the highest radioresistance under hypoxic conditions at 8 Gy, but less resistance to intermediate doses (6 Gy). MCF-7 shows greater radioresistance under normoxia, although not statistically significant. In the kite assay, MCF-7 presents the major DNA damage by increasing the dose of irradiation in hypoxia, while U87 shows an increase in damage in hypoxia, which is not dose dependent. **Conclusion:** It was evidenced that in the U87 line, there is not a relation between the increase in DNA damage under hypoxia and vHh DNA repair capacity for this line. In contrast, in the MCF-7 cell line, it is evident that its repair mechanisms are more efficient under normoxia conditions.

Keywords: Breast neoplasms; Glioblastoma; Hypoxia; Radiation, Ionizing; Drug Resistance, Neoplasm.

Citar como: Cepeda-Forero, K et al. Radioresistencia en glioblastoma: papel de la hipoxia en la genotoxicidad tumoral inducida por radiaciones ionizantes. CIMEL 2018; 23(1): 19-26. DOI: <https://doi.org/10.23961/cimel.v23i1.1066>

INTRODUCCIÓN

El Glioblastoma Multiforme (GB) corresponde al más alto grado de tumor astrocítico (glioma grado IV) según la clasificación realizada por la Organización Mundial de la Salud y continua siendo el tumor cerebral primario más común en la edad adulta (1). La edad promedio de su diagnóstico es a los 61 años (2), sin embargo, se estima que su pico de incidencia se encuentra entre los 45 y los 65 años, tratándose del 50% de los gliomas (1). Se trata de una malignidad devastadora, cuya incidencia es de 3,1/100.000 habitantes en Estados Unidos. La tasa de supervivencia promedio se encuentra entre 12 y 15 meses. Se consideran como factores pronósticos que pueden determinar la sobrevida al tamaño del tumor, la edad del paciente y su grado de funcionalidad, previo a la detección del mismo (3).

El gold standard del tratamiento para el glioblastoma, se basa en un abordaje multidisciplinario, que incluye cirugía, seguida de radioterapia, con o sin quimioterapia coadyuvante (4). Con los avances en radioterapia se buscó encontrar un beneficio clínico, mientras se reducía la toxicidad a corto y largo plazo. Adicionalmente, se espera que este pilar de tratamiento, permita mejorar las condiciones de vida del paciente, así como también su funcionalidad, durante el curso de su enfermedad (2).

Un acercamiento radiobiológico para mejorar la pobre respuesta del glioblastoma a la radiación ionizante no se encuentra disponible, debido a que no se tiene un completo entendimiento de las alteraciones biomoleculares y genéticas de este tumor. Los estudios que se han basado en la expresión génica o proteica del GB, han revelado alteraciones en

vías moleculares comunes, lo que resultó en una subclasificación molecular (clásico, mesenquimal, proneural y neural) que difieren en términos de su pronóstico y respuesta a tratamiento (3).

Entre los principales efectos de las radiaciones ionizantes se encuentra la muerte o la supresión de la división celular. La radiación puede afectar el ADN en diferentes niveles y, según la extensión del daño, podrá repararse o traerá como consecuencia la muerte celular o transformaciones que le impedirá a la célula continuar con su proceso de división (5). Los efectos directos de la radiación ionizante pueden inducir detención del ciclo celular, apoptosis o muerte celular y una relación con la remoción de electrones de los átomos que componen la molécula de ADN, gracias a la energía absorbida de los fotones incidentes sobre ella y que conllevan a una ruptura en la cadena de ADN (5,6). Por otra parte, el efecto indirecto de la radiación ionizante se relaciona con la formación de radicales libres de oxígeno, formados por hidrólisis del agua, que entrarán en interacción con la cadena de ADN, generando su ruptura (6).

Diferentes estudios han comprobado como la radioresistencia tumoral es afectada por la concentración celular de oxígeno (7-9). Por ejemplo, se ha determinado que los marcadores de hipoxia, como por ejemplo HIF-1 α , aumenta la expresión de genes que están involucrados en metástasis, recurrencia tumoral, angiogénesis, sobrevida de células cancerígenas y apoptosis (10). Resulta importante establecer qué relación tiene la hipoxia con el daño en el ADN y la supervivencia de las células del glioblastoma, al ser expuestas a radiación ionizante, como aproximación para entender el papel de la hipoxia sobre la radioresistencia tumoral. Adicionalmente, la dificultad de tratamiento y baja supervivencia que tiene el glioblastoma, son evidencia de la alta radioresistencia del mismo, y al comparar la respuesta del glioblastoma a la radiación con la de otros tipos tumorales más radiosensibles, puede brindar información importante para la comprensión de la radioresistencia en glioblastoma.

Con este fin, en este trabajo se estudió la supervivencia celular y el daño en el ADN en cultivos de línea celular derivada de glioblastoma (U87) sometidos a radiaciones ionizantes, utilizando como modelo de comparación la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), un tipo de neoplasia que ha mostrado una buena respuesta a la radioterapia.

MÉTODOS

Diseño del estudio: Experimental in vitro de ensayos controlados.

Población: Se utilizaron como modelo las líneas celulares de glioblastoma (U87), amablemente donada por la Dra. Chiara Riganti (Università degli Studi di Torino, Italia) y de cáncer de mama (MCF-7), amablemente donada por la Dra. Marcela Camacho (grupo de Biofísica y Biología de Membranas de la Universidad Nacional de Colombia). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Biowest®) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, Hyclone®), y se sembraron en cajas de Petri para cultivo celular de 60 mm de diámetro hasta alcanzar una confluencia del 70%-80%.

Preparación de cultivos celulares: El efecto de la radiación ionizante sobre la supervivencia de las células U87 y MCF-7 en condiciones de hipoxia o normoxia se evaluó por el ensayo de formación de colonias, siguiendo el protocolo de sembrado pre-tratamiento (11). Las células cultivadas en las cajas de Petri fueron disgregadas por incubación con tripsina/EDTA (Gibco®), contadas y transferidas a cajas de cultivo de 6 pozos. Se sembraron entre 200 y 2000 células por pozo, por triplicado, en dependencia de la dosis de radiación a utilizar, de acuerdo con la distribución mostrada en la Tabla 1, y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂, para permitir su adhesión.

Tabla N° 1: Número de células sembrado por pozo en relación con la dosis de radiación ionizante aplicada para la determinación de la fracción de supervivencia en el ensayo de formación de colonias.

Dosis de Radiación ionizante (Gy)	Número de células sembradas por pozo
0	200
1	200
2	400
4	800
6	1200
8	1600
10	2000

La determinación del daño en el ADN se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel de célula única (SCGE, por sus siglas en inglés), que es llamada también “el ensayo del Cometa” (12). Posterior a la disgregación con tripsina/EDTA, y al conteo, se sembraron 500.000 células en cajas de Petri de 35 mm de diámetro, y se permitió su adhesión por incubación a 37°C y al 5% CO₂ por 24 horas.

Inducción de hipoxia: Una vez adheridas las células, éstas fueron cultivadas en condiciones de hipoxia por 24 horas. Dichas condiciones fueron inducidas por métodos físicos incubando las células a 37°C, con una mezcla de gases de 1% O₂ y 5% CO₂, balanceado con N₂, en una incubadora de

hipoxia (HERAcell 150i Tri-Gas Incubator, ThermoFisher Scientific). Un número equivalente de cajas de cultivo fueron dejadas en condiciones de normoxia (21% de O₂, 5% de CO₂ a 37°C) como control.

Irradiación de células: Posterior a las 24 horas de cultivo en normoxia e hipoxia, las células fueron irradiadas con fotones de rayos X de 6 MV, en dosis de 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 Gy para el ensayo de formación de colonias, y de 0, 2 y 10 Gy para el ensayo del Cometa. Se utilizó para irradiarlas un acelerador lineal de uso clínico (Varian Medical Systems® TrueBeam™). Para garantizar el equilibrio electrónico y una mejor homogeneidad de dosis en el volumen blanco, las cajas se irradiaron por debajo, sobre un simulador físico de parafina.

Ensayo de formación de colonias: Una vez irradiadas, las células se mantuvieron en cultivo con medio DMEM suplementado con 10% de SFB durante 14 días. Luego se realizó la fijación y tinción de las colonias formadas con cristal violeta con una mezcla de formaldehído al 4% y cristal violeta al 1%. Para establecer diferencias en la supervivencia celular que tienen las diferentes líneas celulares y tratamientos, se calculó la eficacia de sembrado (ES), definida como el porcentaje dado por el número de colonias compuestas de al menos 50 células en relación con el número de células sembradas. A partir de las ES de cada pozo, se calculó la fracción de supervivencia (FS), definida como la relación entre la ES para una dosis determinada y la dosis 0 o control.

Medición del daño en el ADN por Electroforesis de células individuales (Ensayo Cometa): La determinación de daño en el ADN inducido por la radiación ionizante se realizó mediante la utilización del OxiSelect™ Comet Assay Kit (Cell Biolabs, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante, basado en un ensayo de electroforesis de célula única, que permite evaluar de manera individual el daño en el ADN de cada célula. Las células irradiadas fueron despegadas del plato de cultivo mediante la utilización de Buffer fosfato salino (PBS) frío y scrappers favoreciendo el despegue mecánico de las células. La suspensión celular fue lavada con PBS frío y se extrajeron aproximadamente 5000 células para mezclar con agarosa de bajo punto de fusión, que se sembró sobre los portaobjetos proveídos en el kit.

Una vez gelificadas las muestras, se realizó una incubación durante 1 hora en buffer de lisis pre-enfriado, y una subsecuente incubación en una solución alcalina (300 mM NaOH, pH >13, 1 mM EDTA), a 4°C en oscuridad. Se realizó una electroforesis en condiciones alcalinas (300 mM

NaOH, pH >13, 1 mM EDTA) por 30 minutos a 25 V. Posterior a la electroforesis cada portaobjetos fue lavado en agua, deshidratado en etanol al 70% y secados por 24 horas.

Los cometas fueron coloreados en una solución de Vista Green DNA Dye (CellBiolabs), y se utilizó el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek®) para la obtención de las imágenes. El plug-in OpenComet del software ImageJ (NIH) fue utilizado para el análisis de los parámetros de los cometas (13), y se utilizó el porcentaje de ADN en la cola como parámetro de determinación del daño en el ADN.

Análisis estadístico: Las fracciones de supervivencia fueron construidas con datos obtenidos por triplicado. Los ensayos del Cometa se realizaron en al menos dos experimentos independientes. Los datos se sometieron a análisis de normalidad por la prueba de Shapiro-Wilk. Los datos en los que se encontró una distribución normal (fracciones de supervivencia) se analizaron por la prueba de T múltiple. Los datos del ensayo del Cometa, que no mostraron un comportamiento normal, fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideró como diferencia significativa valor de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS

Ensayo clonogénico: En la línea U87 se observa mayor radioresistencia en condición de hipoxia en comparación con normoxia en dosis altas de radiación ionizante, siendo estadísticamente significativo en 8 Gy ($p=0,008$) (Fig.1A). Aunque, sorpresivamente en 6 Gy se observa mayor radioresistencia estadísticamente significativa ($p=0,001$) en normoxia comparado con hipoxia. Por el contrario, en la línea MCF-7 se aprecia en el histograma mayor radioresistencia en normoxia que en hipoxia en dosis 6 y 10 Gy, con la diferencia observable en 8 Gy donde aumenta la radioresistencia en hipoxia (fig. 1B). Sin embargo, ninguno de los datos es estadísticamente significativo.

Al comparar las dos líneas celulares con respecto a las condiciones de oxígeno, se evidencia que en hipoxia hay mayor radioresistencia en la línea U87 en comparación con MCF7 en altas dosis (8 y 10 Gy), siendo estadísticamente significativo en 10 Gy ($p=0,002$) (fig.1D). Opuesto a lo anterior, en condición de normoxia se observa en MCF7 mayor radioresistencia en 8 y 10 Gy, comparado con U87. No obstante, ninguno de los datos es estadísticamente significativo (fig.1C).

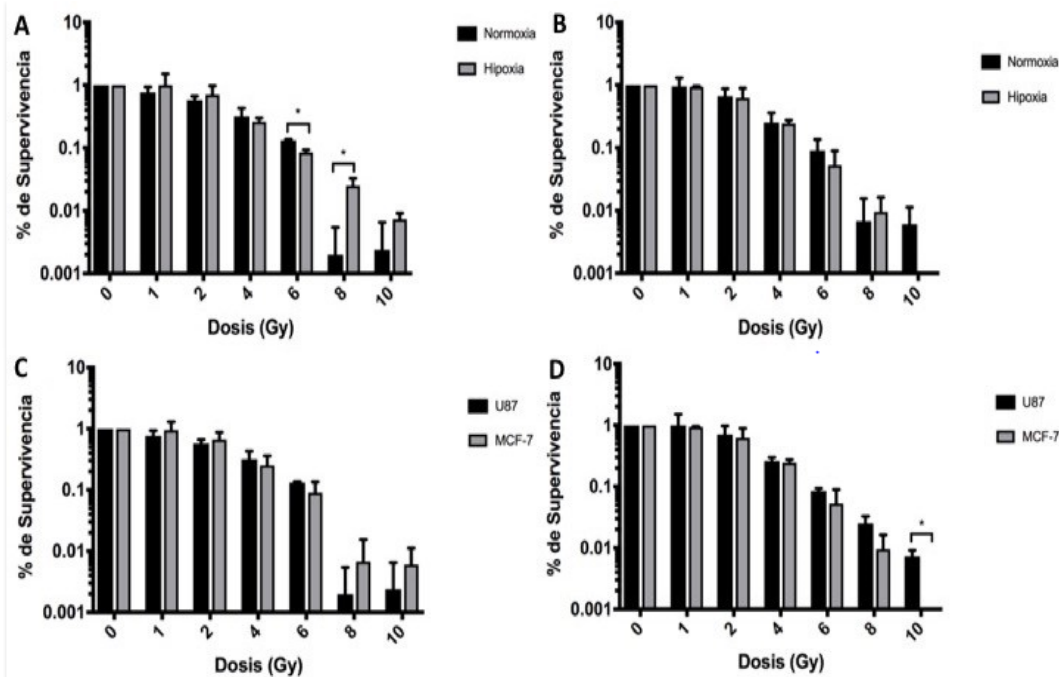


Figura N° 1: Porcentaje de supervivencia en condiciones de hipoxia y normoxia para las líneas celulares U87 y MCF-7. El porcentaje de supervivencia se creó por transformación a logaritmo en base 10 de las fracciones de supervivencia calculadas, versus la dosis de radiación. Se comparó la supervivencia de A) Células U87 en hipoxia y normoxia; B) células MCF-7 en hipoxia y normoxia; C) Células U87 y MCF-7 en normoxia; y D) Células U87 y MCF-7 en hipoxia. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM) para tres experimentos independientes. Los datos se compararon por una prueba de T múltiple y se consideró como diferencia significativa un $p < 0,05$.

Ensayo del cometa: En condición de normoxia, en la línea celular MCF-7 se observa un aumento del daño en el ADN a medida que se aumenta la dosis de radiación ionizante, siendo significativas las diferencias entre 0 y 10 Gy ($p < 0,001$); y 2 y 10 Gy ($p < 0,001$). Aunque entre dosis de 0 y 2 Gy no se observa una diferencia significativa ($p = 0,06$). En condiciones de hipoxia también se observa una relación entre la irradiación de las células y el mayor daño en el ADN (0 y 10 Gy, $p < 0,001$), aunque contrario a éste hay un mayor daño observado en 2 Gy en comparación con 0 y 10 Gy ($p < 0,001$ y $p = 0,02$, respectivamente). Al comparar los resultados obtenidos entre normoxia e hipoxia de MCF-7 se observa un aumento significativo en el daño del ADN en las células sometidas a hipoxia en 0 y 2 Gy ($p < 0,001$), pero no en 10 Gy ($p > 0,99$) (fig. 2B).

En cuanto a la línea celular U87, en condición de normoxia se observa que a mayor dosis de radiación ionizante hay mayor daño sobre el ADN, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,001$). Por el contrario, en condición de hipoxia, no se observa entre ninguna de las dosis aplicadas una diferencia significativa en el daño en el ADN. Al observar la línea U87 y realizar una comparación entre las dos condiciones normoxia e hipoxia, se evidencia un mayor daño en el ADN en hipoxia en 0 y 2 Gy ($p < 0,001$), en contraste con 10 Gy que no fue significativo ($p = 0,28$) (fig. 2A).

Al comparar las dos líneas celulares, en normoxia se observó que el daño en el ADN era consecuente con la dosis administrada. Siendo progresivo el detrimento a dosis más altas. Al comparar las dos líneas celulares, MCF-7 presenta mayor daño a 0; 2 y 10 Gy ($p > 0,01$) (fig. 2C). En la condición de hipoxia, se observó algo muy similar. Un aumento en el daño al incrementar la dosis, siendo este predominante en la línea celular MCF-7, 2 y 10 Gy ($p > 0,01$). Con la excepción de que, a 0 Gy, no fue significativa la diferencia del porcentaje de ADN en la cola ($p = 0,06$) (fig. 2D). Por su parte, U87 nuevamente mostró mayor radioresistencia.

DISCUSIÓN

La hipoxia altera la respuesta a la radioterapia por medio de múltiples moléculas y vías metabólicas que, a gran escala, afectan el pronóstico del glioblastoma (14). En condiciones de normoxia, la radioterapia afecta el ADN de manera directa o por medio de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, al disminuir las concentraciones de oxígeno, este proceso se altera. La hipoxia activa a HIF-1 α , involucrado en inducción de procesos antioxidantes y de reparación del ADN, que finalmente llevan a la supervivencia celular y mayor radioresistencia (15).

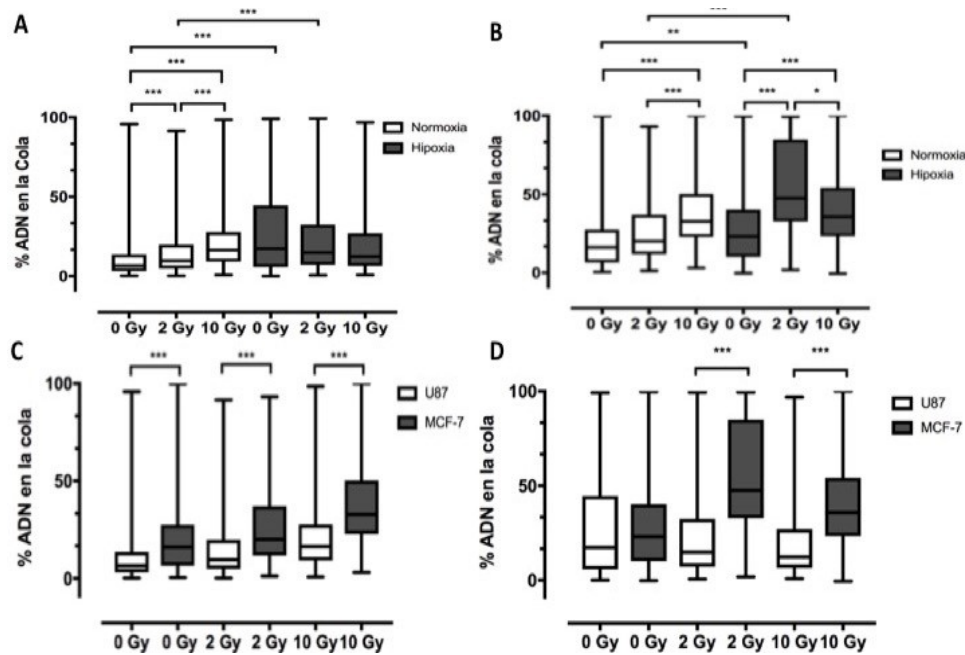


Figura N° 2: Determinación del daño en el ADN por el ensayo del cometa, en células de las líneas U87 y MCF-7 en condiciones de hipoxia y normoxia. El daño en el ADN se calculó como el porcentaje de ADN en la cola de los cometas obtenidos a partir de al menos dos experimentos independientes. Se comparó el daño en el ADN de A) Células U87 en hipoxia y normoxia; B) células MCF-7 en hipoxia y normoxia; C) Células U87 y MCF-7 en normoxia; y D) Células U87 y MCF-7 en hipoxia. Los resultados se presentan en Boxplots que ilustran la mediana de los datos, su dispersión y el valor máximo y mínimo encontrado para cada condición. Los datos se compararon por una prueba de Kruskal-Wallis y se consideró como diferencia significativa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, y *** $p < 0,001$.

En el ensayo clonogénico, se observó una mayor radioresistencia y un mayor daño en el ADN en la línea U87 en condiciones de hipoxia. A partir de estos resultados, se puede inferir que las células de glioblastoma tienen mecanismos de reparación del ADN más eficientes en hipoxia, que les permite una mayor tasa de supervivencia celular. Esta mayor actividad de reparación podría asociarse al aumento en la expresión de proteínas como la Osteopontina (OPN) (16). Esta proteína se ha visto involucrada en la reparación del ADN en respuesta a la radiación en células del glioblastoma, pues se ha encontrado que células que presentan déficit de OPN, presentan a su vez menores niveles de fosforilación de la histona H2AX, un marcador de activación de mecanismos de reparación del ADN (17). De igual manera, alteraciones en la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico variante III (EGFRvIII) pueden aumentar la reparación de la hebra de ADN de doble rupturas (DSBs) (18). Recientemente Reichert y colaboradores demostraron que la exposición a radiación aumenta los niveles de Survivina, una proteína nodal multifuncional de interacción con diversas vías, dentro del núcleo, donde interactúa y aumenta la actividad enzimática de moléculas como MDC1, DNA-PKcs y Ku70, implicados en el proceso de reparación de ruptura de doble hebra tipo recombinación no homóloga (19). Una expresión y actividad incrementada en estas proteínas podría explicar el porqué, aunque las células U87 presentan un mayor daño en el ADN por radiación en hipoxia, la supervivencia celular

es mayor en esas condiciones.

Igualmente, al comparar la supervivencia celular de las células MCF-7 y U87, se observa mayor resistencia a la radiación por parte de las células U87 en hipoxia, pero no en normoxia. En este proceso, la hipoxia tiene el comportamiento de un factor protector para U87, ya que, pese a que las dos líneas cancerosas en estudio presentan un mayor daño del ADN en hipoxia, U87 tiene una mayor supervivencia celular. Esta respuesta podría asociarse a los efectos de la formación de radicales libres de oxígeno, los cuales generan un aumento en el daño del ADN en normoxia, pero en ausencia de oxígeno las lesiones por radicales libres son menores por la activación de sistemas antioxidantes celulares y pueden ser reparadas por moléculas que contengan sulfhidrilo, generando como desenlace una mayor supervivencia celular en esta condición (20). Teniendo en cuenta que existen diferentes subtipos de GBM, sería importante establecer a cuál de estos subtipos pertenece la línea U87, con el fin de determinar si existe alguna relación entre el subtipo tumoral y la respuesta a la radiación. Marie Allen y colaboradores, realizaron en el 2016 un estudio comparativo entre las células U87 actualmente disponibles y distribuidas por la ATCC. Dicho estudio demostró que las células provenientes de la ATCC exhiben un perfil de ADNmt diferente a la línea celular Uppsala U87 y al tejido tumoral original, lo cual lleva a considerar que el origen de

la línea U87 disponible por la ATCC es diferente al del tejido tumoral original. Sin embargo, el análisis reveló que las células U87 sí provienen del SNC y es probable que corresponda a una línea celular de glioblastoma de un paciente de origen y subclasificación desconocidas (21). A pesar que estos hallazgos, esta línea celular sigue siendo útil para analizar los mecanismos celulares generales en GBM. No obstante, sería relevante el estudio a futuro de líneas celulares o tejidos primarios que correspondan a los subtipos de GBM con el fin de establecer las diferencias en los mecanismos inducidos por hipoxia o normoxia según el subtipo tumoral (22).

A partir de la línea U87, se han identificado múltiples medios, asociados a la hipoxia y HIF-1 α , por los cuales esta línea presenta comportamientos frente a la radiación ionizante que podrían llegar a explicar la mayor supervivencia observada de esta línea en condición de hipoxia. La quinasa unida a integrina (ILK), ha demostrado aumentar la supervivencia celular al modular los mecanismos de muerte celular, mediante la regulación en la duplicación de los centrosomas en la línea celular U87 (23). Así mismo, la identificación del silenciamiento del receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR1), conlleva a un decremento en la expresión de HIF-1 α , y como consecuencia a un incremento de la radiosensibilidad del tumor (24). También se ha reportado una correlación entre las proteínas quinasa dependientes de ADN (DNA-PKcs), ERKs y HIF-1 α , y la radioresistencia, ya que se ha comprobado que mediante la inhibición de ERKs, se genera una reducción en la expresión de HIF-1 α , de manera que se genera un aumento en la radiosensibilidad (25).

Adicionalmente, al poner en contraste el daño en el ADN según la condición de oxígeno de las dos líneas celulares, se observa mayor cantidad de daño en MCF-7 en las dos condiciones. Sin embargo, en el ensayo clonogénico esta línea celular tiene mayor supervivencia celular en condición de normoxia en comparación con U87, pero menor en condición de hipoxia. De acuerdo a estos resultados, se puede inferir que MCF-7 presenta mayor daño celular inducido por la radiación ionizante en hipoxia, y que la hipoxia afecta la capacidad de reparación del ADN, llevando a una menor supervivencia celular. Una posible explicación a este comportamiento podría relacionarse con una afectación en la expresividad de proteínas claves para la supervivencia celular en la línea MCF-7, ejemplo de esto tenemos al factor de transcripción eIF4G1. Badura y colaboradores han demostrado que niveles elevados de eIF4G1 aumentaba la supervivencia celular mediante una gran variedad de moléculas involucradas, entre las cuales se encuentra p53 binding protein 1, esencial en los procesos de reparación del ADN (26). En otro aspecto, se relacionó la hipoxia con el decremento en

los mecanismos de reparación del ADN en MCF-7, como lo plantean Crosby y colaboradores, quienes asocian el aumento en los niveles de los microRNAs 210 y 373, con la disminución de los mecanismos de reparación dependiente de homología y reparación por escisión de nucleótidos (27). En contradicción con lo antes mencionado, han sido publicados mecanismos de reparación aumentados en hipoxia. En específico, la línea MCF-7 mostró una regulación a la alta de ciertos genes, como NDRG1, involucrado en el daño y reparación de ADN (28). Sin embargo, en dicho estudio se analizan condiciones de hipoxia intermitente en 19 ciclos, y no una hipoxia sostenida por 24 horas, como en nuestro caso. De la misma forma, otros estudios reportan que, en hipoxia, esta línea celular es capaz de activar las quinasas ATM y ATR, con la consecuente fosforilación de algunos blancos como la serina/treonina quinasa CHK1 y H2AX, asociados al control del ciclo celular y activación de mecanismos de reparación del ADN (29). Por tanto, más investigación debe ser hecha al respecto, para mejorar el entendimiento de la relación entre la hipoxia y los mecanismos de reparación del ADN implicado con este modelo de estudio.

Es importante tener en cuenta que la radiación ionizante ejerce un mayor o menor daño sobre el ADN de la célula dependiendo de la fase del ciclo celular en la que está se encuentre, ya que, se sabe que hay mayor radiosensibilidad en la fase G2-M, y menor en la fase G0/G1 al igual que durante la última parte de la fase S (30).

Lo anteriormente expuesto, explica la alta dispersión de los datos del daño en el ADN observado en el ensayo del cometa, ya que en dicho ensayo se mide el daño generado en cada célula individualmente. La dispersión observada puede ser causada por el hecho de que las células que se encontraban en diferentes fases del ciclo celular, lo cual le confiere distinto grado de radioresistencia. Sin embargo, una tendencia general en cada condición fue claramente observada, independientemente de la variabilidad inducida por la fase del ciclo.

Otro factor determinante en cuanto al pronóstico del glioblastoma asociado a la radioterapia, que a su vez pudo haber influido en los resultados del estudio, es la dosis total de radiación y su fraccionamiento. Se ha visto en los últimos años que las células tumorales experimentan procesos de reparación y supervivencia entre las distintas dosis de radiación (31). Por lo anterior, cada vez se ha intentado introducir en el manejo de glioblastoma una mayor dosis total sumado de hipofraccionamiento (32,33). Los resultados en cuanto a este abordaje aún no son del todo claros, sin embargo, parecen prometedores, una vez se logre sobrellevar los efectos radiotóxicos del tejido circundante. En cuanto al ensayo realizado,

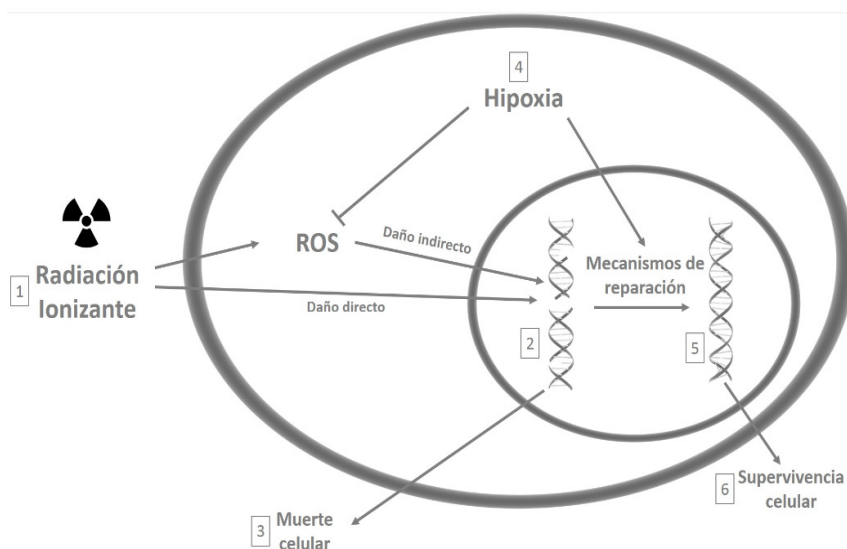


Figura N° 3: Efecto de la hipoxia sobre el daño en el ADN inducido por radiaciones ionizantes en células de la línea U87. La radiación ionizante afecta la molécula de ADN directamente, o a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (1); esto genera rupturas sencillas y dobles de la cadena de ADN (2) que, al no poder ser reparadas, inducen la muerte celular (3). En condiciones de Hipoxia (4), la activación de mecanismos de respuesta antioxidante disminuye la concentración de ROS, disminuyendo el daño en el ADN; adicionalmente, la hipoxia favorecería la activación de mecanismos de reparación (5) en las células U87, restableciendo la integridad del ADN y favoreciendo así la supervivencia celular (6).

las células se sometieron a una sola dosis de radiación que no excedía los 10 Gy, por lo que resultaría útil poder evaluar los efectos de dosis más altas (entre 17 y 20 Gy) y del hipofraccionamiento en la sobrevida y genotoxicidad de la línea celular U87.

CONCLUSIÓN

Este estudio experimental evidenció una mayor supervivencia celular de la línea U87 en condición de hipoxia en comparación con normoxia, es decir, una mayor radioresistencia en estas condiciones. Estos resultados tienen alto respaldo en la literatura, como se discutió anteriormente, mediante las múltiples vías ya conocidas que se encuentran involucradas con HIF-1 α y sus diferentes cascadas de señalización.

Si bien en este estudio, los resultados muestran en las dos líneas tumorales un mayor daño del ADN en hipoxia, se evidenció una mayor supervivencia celular en U87 comparado con MCF-7, esto nos inclinaría a pensar, que la hipoxia desencadena vías de reparación que juegan un rol protector significativamente más eficiente en la línea celular U87 que en la línea celular MCF7 (Fig. 3). Este fenómeno también parece estar ocurriendo de igual manera en la línea celular MCF-7 pero en condición de normoxia. Sin embargo, todavía son necesarios más estudios para determinar exactamente los mecanismos moleculares asociados a esta posible capacidad protectora. El presente estudio representa el hallazgo de conocimientos nuevos e interesantes, que requieren ser indagados con mayor profundidad para una mejor comprensión.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Fuente de financiamiento: Este trabajo fue co-financiado con recursos de la convocatoria del Fondo de Investigaciones de la Universidad del Rosario (FIUR, proyecto DVG-206), y del Fondo para Financiación de Proyectos y Actividades de Semilleros de Investigación de la Dirección de Investigación de la Universidad del Rosario.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Brain Tumor Association [Internet]. Glioblastoma y astrocitoma maligno [cited 2017 May 20]. Disponible en: <http://www.abta.org/resources/spanish-language-publications/glioblastoma-y-astrocitoma-maligno.pdf>
2. Gzell C., Back M., Wheeler H., Bailey D., Foote M. Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clin Oncol.* 2017; 29(1):15–25.
3. Pedicini P, Fiorentino A., Simeon V, Tini P, Chiumento C., Pirtoli L., et al. Clinical radiobiology of glioblastoma multiforme. *Strahlentherapie und Onkol.* 2014; 190(10):925–932.
4. Niyazi M, Brada M, Chalmers A. J., Combs S. E., Erridge S. C., Fiorentino A., et al. ESTRO-ACROP guideline “target delineation of glioblastomas.” *Radiother Oncol.* 2016; 118(1):35–42.
5. Beyzadeoglu M., Ozyigit G., Ebruli C. Radiobiology. In: *Basic Radiation Oncology.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [cited 2017 May 20]. p. 71–144. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-11666-7_2
6. Joiner M., Van der Kogel A. *Basic clinical radiobiology.* Fourth Edition. Great Britain: Hodder Arnold; 2009. 375 p.
7. Hsieh Ch-H., Lee Ch-H., Liang J-A., Yu Ch-Y., Shyu W-Ch. Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction

- activity. *Oncol Rep.* 2010; 24(6): 1629-1636.
8. Yang L., Lin C., Wang L., Guo H., Wang X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Exp Cell Res.* 2012; 318(19): 2417-2426.
 9. Clarke R. H., Moosa S., Anzivino M., Wang Y., Hunt Floyd D., Purrow B. W., et al. Sustained radiosensitization of hypoxic glioma cells after oxygen pretreatment in an animal model of glioblastoma and in vitro models of tumor hypoxia. *PLoS One.* 2014; 9(10): e111199.
 10. Lan J., Xue Y., Chen H., Zhao S., Wu Z., Fang J., et al. Hypoxia-induced miR-497 decreases glioma cell sensitivity to TMZ by inhibiting apoptosis. *FEBS Lett.* 2014; 588(18):3333-3339.
 11. P Franken N. A., Rodermond H. M., Stap J., Haveman J., van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006; 1(5):2315-2319.
 12. Collins A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3):249-261.
 13. Gyori B. M., Venkatachalam G., Thiagarajan P. S., Hsu D., Clement M-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biol.* 2014; 2:457-465.
 14. Huang W-J, Chen W-W, Zhang X. Glioblastoma multiforme: Effect of hypoxia and hypoxia inducible factors on therapeutic approaches. *Oncol Lett.* 2016; 12(4):2283-82283.
 15. Manoochchri Khoshinani H., Afshar S., Najafi R. Hypoxia: A Double-Edged Sword in Cancer Therapy. *Cancer Invest.* 2016; 34(10):536-545.
 16. Horsman M. R., Overgaard J. The impact of hypoxia and its modification of the outcome of radiotherapy. *J Radiat Res.* 2016; 57(S1):i90-98.
 17. Henry A, Nokin M-J, Leroi N, Lallemand F, Lambert J, Goffart N, et al. New role of osteopontin in DNA repair and impact on human glioblastoma radiosensitivity. *Oncotarget.* 2016; 7(39):63708-63721.
 18. Mukherjee B., McEllin B., Camacho C. V., Tomimatsu N., Sirasana-gandala S., Nannepaga S., et al. EGFRvIII and DNA Double-Strand Break Repair: A Molecular Mechanism for Radioresistance in Glioblastoma. *Cancer Res.* 2009; 69(10):4252-4259.
 19. Reichert S., Rödel C., Mirsch J., Harter P. N., Tomacic M. T., Mittelbronn M., et al. Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: A molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol.* 2011; 101(1):51-8.
 20. Vartanian A., Singh S. K., Agnihotri S., Jalali S., Burrell K., Aldape K. D., et al. GBMs multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro Oncol.* 2014;16(9):1167-1175.
 21. Allen M., Bjerke M., Edlund H., Nelander S., Westermark B. Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci Transl Med.* 2016; 8(354):354re3-354re3.
 22. Dolgin E. Venerable brain-cancer cell line faces identity crisis. *Nature.* 2016; 537(7619):149-150.
 23. Lanvin O., Monferran S., Delmas C., Couderc B., Toulas C., Cohen-Jonathan-Moyal E. Radiation-induced mitotic cell death and glioblastoma radioresistance: A new regulating pathway controlled by integrin-linked kinase, hypoxia-inducible factor 1alpha and survivin in U87 cells. *Eur J Cancer.* 2013; 49(13):2884-2891.
 24. Gouaze-Andersson V., Delmas C., Taurand M., Martinez-Gala J., Evrard S., Mazoyer S., et al. FGFR1 Induces Glioblastoma Radioresistance through the PLC /Hif1 Pathway. *Cancer Res.* 2016; 76(10):3036-3044.
 25. Marampon F., Gravina G. L., Zani B. M., Popov V. M., Fratticci A., Cerasani M., et al. Hypoxia sustains glioblastoma radioresistance through ERKs/DNA-PKcs/HIF-1α functional interplay. *Int J Oncol.* 2014; 44(6):2121-2131.
 26. Badura M., Braunstein S., Zavadil J., Schneider R. J. DNA damage and eIF4G1 in breast cancer cells reprogram translation for survival and DNA repair mRNAs. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; 109(46):18767-18772.
 27. Crosby M. E., Kulshreshtha R., Ivan M., Glazer P. M. MicroRNA Regulation of DNA Repair Gene Expression in Hypoxic Stress. *Cancer Res.* 2009; 69(3):1221-1229.
 28. Hamdan F. H., Zihlif M. A. Gene expression alterations in chronic hypoxic MCF7 breast cancer cell line. *Genomics.* 2014; 104(6Pt B):477-481.
 29. Kumareswaran R., Ludkovski O., Meng A., Sykes J., Pintilie M., Bristow R. G. Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability. *J Cell Sci.* 2012; 125(Pt 1):189-199.
 30. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 59(4):928-942.
 31. Balagamwala E. H., Chao S. T., Suh J. H. Principles of Radiobiology of Stereotactic Radiosurgery and Clinical Applications in the Central Nervous System. *Technol Cancer Res Treat.* 2012;11(1):3-13.
 32. Uto M., Mizowaki T., Ogura K., Arakawa Y., Mineharu Y., Miyamoto S., et al. Feasibility evaluation of hypofractionated radiotherapy with concurrent temozolomide in elderly patients with glioblastoma. *Int J Clin Oncol.* 2016; 21(6):1023-1029.
 33. Floyd S. R., Kasper E. M., Uhlmann E. J., Fonkem E., Wong E. T., Mahadevan A. Hypofractionated Radiotherapy and Stereotactic Boost with Concurrent and Adjuvant Temozolamide for Glioblastoma in Good Performance Status Elderly Patients - Early Results of a Phase II Trial. *Front Oncol.* 2012; 2:122.

Correspondencia:

Alejandro Ondo-Méndez, Ph. D.

Unidad de Bioquímica, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Carrera 24 No. 63C-69. Sede Quinta de Mutis

Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

Correo: alejandro.ondo@urosario.edu.co

Recibido: 05/06/2017

Aprobado: 22/10/2017