



Tesis doctoral

**“Implicancia de la  
Terapia Fotodinámica sobre  
la expresión de HIF y su relación  
con el microambiente tumoral”**

Mic. María Julia Lamberti

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales  
Universidad Nacional de Río Cuarto  
Marzo, 2016

**LAMBERTI, MARIA JULIA**

Implicancia de la tensión tributaria sobre la exportación de HFP y su relación con el n.º

75054

2016

75054



Tesis doctoral para optar al título de **Doctora en Ciencias Biológicas**, bajo la dirección de la Dra. Viviana A. Rivarola y la co-dirección de Dra. N. Belén Rumie Vittar. Realizada en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Biología Molecular.

Doctorando:

María Julia Lamberti

Directora:

Dra. Viviana Rivarola

Co-directora:

Dra. N. Belén Rumie Vittar

Miembros del jurado:

Dra. Ana Carolina Donadío

Dra. Ana María Eiján

Dr. Pablo Wappner

Río Cuarto, 04 de Marzo de 2016

7054

<b>MFN:</b>
<b>Clasif:</b>
T. 999

Existen personas en nuestras vidas que nos hacen felices por la simple casualidad de haberse cruzado en nuestro camino. Algunas recorren el camino a nuestro lado, viendo muchas lunas pasar, mas otras apenas vemos entre un paso y otro. A todas las llamamos amigos y hay muchas clases de ellos. Tal vez cada hoja de un árbol caracteriza uno de nuestros amigos (...)

En este día que marca el cierre de una etapa, y por lo tanto, el comienzo de un nuevo camino, aprovecho la oportunidad para agradecer a cada una de las hojas del "árbol de mi vida"...

- A mi "hermanita Lucía", mi otra mitad, gracias por el día a día... Esta tesis debería incluir tu nombre entre los autores! Como ya te dije mil veces, sos lo que más amo en este mundo!
- A mi papá, mi gran amigo... Eternamente agradecida por tu incondicionalidad! Lamento decirte que nunca voy a independizarme de vos... Y soy muy feliz por eso!
- A mi mamá, esa "loquita linda"... Gracias por mostrarme siempre "las dos caras de la moneda", por motivarme a seguir mi instinto y mis propias convicciones, por estar ahí, al pie del cañón!
- A mis abuelos, por su infinito y puro amor... Por hacerme sentir siempre especial ante sus ojos... Por procurar mi felicidad y la de mi hermana en cada momento...
- A mi tíos y primos... mi segunda familia... gracias por su cariño inmenso y su compañía siempre!...
- A Polo, amor mío... gracias por tu paciencia principalmente cuando ya no te quedaba paciencia, por escucharme aún sin escucharme, por esperarme siempre, por impulsarme a no bajar los brazos nunca... Gracias por ser mi gran "compañero de ruta"... Te amo!

- A mis amigas de Serrano y de la Uni, de toda la vida!... gracias por seguir compartiendo risas y lágrimas, encuentros y desencuentros, contra el tiempo y la distancia... Su amistad es sin duda la mejor compañía para transitar este camino!
- A mis amigas y amigos de este último tramo del recorrido, a la familia Poloni, a mis hermosas sobrinas, agradezco a la vida la felicidad de haberlos encontrado... Gracias por estos años juntos, y los que vendrán!

**Y por último, a quienes hicieron este proyecto posible, a través del trabajo diario, desde el principio hasta el final:**

- A Vivi y Belu... por dirigir este proyecto y llevarlo adelante ante todos los obstáculos... Y especialmente quiero agradecerles por "darme alas y empujarme a volar"... Por su apoyo incondicional, por crear y fortalecer en mí el amor por la ciencia... Por ser mi abu y mamá científica!!!
- Al jurado, muchísimas gracias por acompañarnos estos 5 años, por sus evaluaciones siempre críticas y constructivas, por su esfuerzo e inmensa dedicación en este trabajo... Gracias por estar hoy acá presentes...
- A los integrantes del Lab 14, nada de esto hubiese sido posible sin ustedes... *"Somos una marea de gente, todos diferentes, remando al mismo compás"*...
- Al laboratorio del Dr. Zapico y Dr. Krijgsveld, a Fulbright-Ministerio de Educación, EMBL y CONICET, por brindarme la oportunidad de vivir experiencias tan enriquecedoras tanto en lo laboral como en lo personal y de conocer una "ciencia diferente" y poder compartirla!
- A mis compañeros de docencia... Gracias por "enseñarme a enseñar"... Un agradecimiento especial a mi gran compinche Noita... como siempre me decís: "una alegría compartida se multiplica y una tristeza compartida se divide"... Mil gracias por estos años de multiplicar y dividir juntas!
- A todos los integrantes del Dpto de Biología Molecular (y de otros Dptos), personal técnico, personal administrativo, "chicos del comedor", todos y cada uno de los que compartimos el día a día, infinitas gracias por colaborar desinteresadamente... Gracias!!

Y en especial gracias a la Universidad Nacional de Río Cuarto, gracias por mi formación de grado y posgrado, por promover y defender la educación pública y gratuita... Por CREER... CREAR... CRECER...

Te deseo hoja de mi árbol, paz, amor, salud, suerte y prosperidad.  
Simplemente porque cada persona que pasa en nuestra vida es única.  
Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros.  
Habrá los que se llevarán mucho,  
pero no habrán de los que no nos dejarán nada.  
Esta es la mayor responsabilidad de nuestra vida  
y la prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad.

*El Árbol de los Amigos - Jorge Luis Borges*

**Simplemente GRACIAS...**

## Índice

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	4
<b>Abstract</b>	5
<b>1. Introducción</b>	6
1.1. Cáncer	6
1.2. Epidemiología del cáncer	7
1.3. Cáncer colorrectal en Argentina	10
1.4. Biología del CCR	11
1.5. Histotipos de CCR y clasificación	13
1.6. Terapéuticas actuales para CCR	15
1.7. Terapia fotodinámica como estrategia antitumoral	16
1.8. Especies reactivas del oxígeno: principales mediadores del daño fotodinámico	17
1.9. Fotosensibilizadores en TFD	18
1.10. TFD y cáncer colorrectal	22
1.11. Hipoxia y cáncer	23
1.12. Hipoxia y HIF-1	24
1.12.1. Regulación post-traducciona l de HIF-1 $\alpha$ a través de los dominios ODD y C-TAD	26
1.12.2. Regulación de la transcripción de HIF-1 $\alpha$	27
1.13. Sobreexpresión de HIF en CCR	29
1.14. Hipoxia, angiogénesis e intervención fotodinámica	29
1.15. Microambiente tumoral	30
1.16. Cultivos tridimensionales <i>in vitro</i> que imitan la arquitectura del microambiente tumoral	32
1.17. Secretoma del cáncer	35
1.18. Microambiente tumoral, cáncer colorrectal y fibroblastos asociados al tumor	38
Referencias	41
<b>2. Hipótesis</b>	48



<b>3. Objetivos</b>	48
3.1. Objetivo general	48
3.2. Objetivos específicos	48
<b>4. Materiales y métodos</b>	49
4.1. Cultivos celulares	49
4.2. Drogas	49
4.3. Plásmidos	49
4.4. Generación de bacterias DH5 $\alpha$ competentes	50
4.5. Transformación de bacterias competentes	50
4.6. Amplificación y purificación de los plásmidos	51
4.7. Generación de líneas celulares estables	51
4.7.1. <i>SW480 HRE y SW480 G – Transfección estable</i>	51
4.7.2. <i>SW480 HRE-shHIF – Infección lentiviral</i>	51
4.8. Generación de esferoides	52
4.9. Cuantificación de la actividad del reportero de HIF por citometría de flujo	53
4.10. Identificación de zonas hipóxicas (GFP +) por microcopía confocal	53
4.11. Incorporación de protoporfirina IX (PpIX) en cultivos 3D	53
4.12. Tratamiento fotodinámico	53
4.13. Evaluación de la viabilidad celular	54
4.13.1. <i>MTT</i>	54
4.13.2. <i>Ensayo de exclusión del colorante vital azul tripán</i>	54
4.14. Medición del estado oxidativo de los esferoides	55
4.15. Western Blot	55
4.16. Generación de medios condicionados (MCs).	56
4.17. Ensayo de migración celular en esferoides endoteliales	56
4.18. Ensayo de formación de tubos	56
4.19. Cuantificación del ARNm de VEGF por RT-qPCR	56
4.20. Análisis secretómico	57
4.20.1. <i>Preparación de las muestras</i>	57
4.20.2. <i>Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) e identificación de proteínas</i>	58

4.20.3. <i>Análisis de datos</i>	58
4.20.4. <i>Análisis bioinformático de proteínas</i>	61
4.21. Ensayo de angiogénesis <i>in vivo</i>	61
4.22. Análisis estadístico	62
Referencias	63
<b>5. Resultados y Discusión</b>	66
5.1. Actividad fotodinámica sobre células de cáncer colorrectal con diferente grado de diferenciación	66
5.2. Implicancia de la hipoxia en la resistencia al tratamiento fotodinámico	68
5.3. Modelo de cultivo tridimensional como estrategia para imitar la arquitectura tumoral	70
5.4. Implicancia de la arquitectura tumoral en la respuesta a la intervención fotodinámica	72
5.5. Análisis de factores asociados a la fotorresistencia terapéutica de los microtumores	75
5.5.1. <i>Profundidad de penetración de la luz visible</i>	75
5.5.2. <i>Generación de Protoporfirina IX (PpIX) en esferoides de carcinoma colorrectal</i>	76
5.5.3. <i>Estudio de la activación de HIF en el modelo tridimensional desarrollado</i>	78
5.6. Relevancia del bloqueo de HIF-1 $\alpha$ en la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento fotodinámico	83
5.7. Impacto de la terapia fotodinámica sobre la actividad transcripcional de HIF en microtumores hipóxicos de carcinoma colorrectal	86
5.8. Participación del estrés oxidativo sobre la activación de HIF antes y después del tratamiento fotodinámico	89
5.9. Participación de vías de transducción de señales sobre la activación de HIF post-TFD	94
5.10. Implicancia del estrés oxidativo inducido por la TFD en la activación de ERK1/2.	98
5.11. Caracterización del secretoma de esferoides tumorales fotosensibilizados	100

5.12. Evaluación de la angiogénesis <i>in vitro</i> en respuesta a la fotosensibilización tumoral	110
5.13. Diseño de co-cultivos que imiten la interacción entre células tumorales y estromales	113
5.14. Caracterización del secretoma de esferoides tumorales homo y heterotípicos	116
5.15. Impacto del diálogo tumor-fibroblasto sobre la supervivencia tumoral luego del tratamiento fotodinámico	124
5.16. Caracterización del secretoma de esferoides heterotípicos fotosensibilizados	127
5.17. Implicancia de la TFD en microtumores homo y heterotípicos sobre la expresión de VEGF	135
5.18. Modulación fotodinámica del proceso de angiogénesis <i>in vivo</i>	136
Referencias	142
<b>6. Conclusiones</b>	<b>153</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Capacidades (“hallmarks”) de las células tumorales	6
Figura 2. Tasas de incidencia de cáncer en ambos sexos, excluyendo los cánceres de piel no melanoma por cada 100.000 habitantes	9
Figura 3. Defunciones y tasas estandarizadas de mortalidad (TEM) por cáncer cada 100.000 habitantes en hombres y mujeres de Argentina en 2011	10
Figura 4: Tendencias de mortalidad específica por cáncer colorrectal en hombres y mujeres	11
Figura 5. Etapas del desarrollo de cáncer colorrectal	12
Figura 6. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica	18
Figura 7. Biosíntesis del grupo hemo y su relación con TFD	21
Figura 8. Precursores de PpIX	22
Figura 9. Irradiación de una lesión tumoral longitudinal localizada en colon	22
Figura 10. Organización espacial de las células tumorales en relación a la vasculatura	24
Figura 11. Dominios presentes en las subunidades proteicas HIF-1 $\alpha$ y HIF-1 $\beta$	25
Figura 12. Regulación de la actividad de HIF-1 dependiente de O <sub>2</sub>	27
Figura 13. Regulación de HIF-1 $\alpha$	28
Figura 14. Angiogénesis e hipoxia	30
Figura 15. Microambiente tumoral	32
Figura 16. Los esferoides imitan la arquitectura 3D de los tumores sólidos	33
Figura 17. Esquema representativo de diferentes técnicas experimentales para generar cultivos 3D	35
Figura 18. Vías de secreción clásicas y no clásicas de proteínas	38
Figura 19. Diálogo tumor-fibroblasto	39
Figura 20. Equipo de irradiación	54
Figura 21. Histogramas	59
Figura 22. Gráfico multiscatter	60
Figura 23. Protocolo de fotosensibilización convencional	66
Figura 24. La intervención fotodinámica disminuye la viabilidad de células de carcinoma colorrectal	67
Figura 25. La activación de HIF-1 $\alpha$ induce resistencia al tratamiento fotodinámico	69

Figura 26. Crecimiento tridimensional de las células de cáncer colorrectal	71
Figura 27. El protocolo convencional de terapia fotodinámica no afecta significativamente la viabilidad de esferoides de células de cáncer colorrectal	73
Figura 28. Nuevo protocolo de fotosensibilización	73
Figura 29. La terapia fotodinámica disminuye la viabilidad de esferoides de células de cáncer colorrectal	74
Figura 30. Penetración de la luz en los tejidos a diferentes longitudes de onda	76
Figura 31. La formación de PpIX en cultivos no es homogénea luego de 24 hs de incubación con Me-ALA	78
Figura 32. El clon celular SW480-HRE es un herramienta eficiente para detectar la actividad de HIF	79
Figura 33. La actividad de HIF en los esferoides tumorales es proporcional a su tamaño	80
Figura 34. Los esferoides multicelulares de SW480 representan el microambiente hipóxico	81
Figura 35. VEGF se encuentra sobreexpresado en esferoides tumorales	82
Figura 36. Relación entre actividad de HIF, acumulación de PpIX y eficiencia terapéutica de la TFD	83
Figura 37. El clon celular SW480-HRE-shHIF es un herramienta eficiente para detectar la actividad de HIF	84
Figura 38. El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$ induce sensibilidad a la intervención fotodinámica	85
Figura 39. La línea SW480-HRE se utilizó como herramienta para evaluar la expresión y actividad de HIF	87
Figura 40. La terapia fotodinámica induce la activación de HIF en esferoides de carcinoma colorrectal	88
Figura 41. La incubación con Me-ALA y la terapia fotodinámica inducen estrés oxidativo	90
Figura 42. El estrés oxidativo modula a HIF en esferoides de carcinoma colorrectal	92
Figura 43. El antioxidante NAC aumenta la fotorresistencia de esferoides tumorales	93
Figura 44. La terapia fotodinámica aumenta la fosforilación de ERK1/2 sin	95

modificar a Akt	
Figura 45. Las vías MEK/ERK modulan positivamente a HIF en esferoides de carcinoma colorrectal fotosensibilizados	96
Figura 46. El inhibidor de MEK1/2 U0126 no afecta la respuesta al tratamiento fotodinámico de esferoides tumorales	97
Figura 47. El estrés oxidativo inducido por la TFD es el responsable de la activación de ERK1/2	98
Figura 48. Modelo propuesto de la regulación de HIF por la TFD	99
Figura 49: Proteínas identificadas en los secretomas de esferoides de carcinoma colorrectal sometidos o no a fotosensibilización	105
Figura 50. Las proteínas cuya secreción disminuye por la TFD interactúan de forma significativa	106
Figura 51. Las proteínas cuya secreción se incrementa por la TFD interactúan de forma significativa	107
Figura 52. La TFD disminuye la significancia biológica de la vía de HIF en el secretoma tumoral	110
Figura 53. La fotosensibilización tumoral disminuye la migración de células endoteliales	111
Figura 52. La fotosensibilización tumoral disminuye la tubulogénesis endotelial	112
Figura 55. La TFD suprime la expresión de VEGFa	112
Figura 56. Los esferoides heterotípicos compuesto por fibroblasto-tumor representan la interacción tumor-estroma del microambiente tumoral	115
Figura 57. Proteínas identificadas en los secretomas de esferoides de carcinoma colorrectal homo y heterotípicos	120
Figura 58. Las proteínas cuya secreción incrementa en los secretomas heterotípicos interactúan de forma significativa	121
Figura 60. La presencia de fibroblastos aumenta la significancia biológica de la vía de HIF en el secretoma tumoral	123
Figura 61. Los fibroblastos son más sensibles a la intervención fotodinámica en comparación con las células de carcinoma colorrectal	124
Figura 62. La presencia de fibroblastos en el microambiente tumoral promueve resistencia tumoral al tratamiento fotodinámico	126
Figura 63. Proteínas identificadas en los secretomas de esferoides de carcinoma	132

colorrectal heterotípicos sometidos o no a fotosensibilización	
Figura 64. Las proteínas cuya secreción incrementa por la TFD en esferoides heterotípicos interactúan de forma significativa	133
Figura 65. Las proteínas cuya secreción disminuye por la TFD en esferoides heterotípicos no interactúan de forma significativa	133
Figura 66. La fotosensibilización disminuye la significancia biológica de la vía de HIF en el secretoma tumoral heterotípico	135
Figura 67. La TFD modula la expresión de VEGF en microtumores homo y heterotípicos	136
Figura 68. La TFD induce el reclutamiento de la vasculatura hacia el sitio tumoral	138
Figura 69. La respuesta tumoral a la TFD está influenciada por la interacción de factores bióticos y abióticos que coexisten en el microambiente tumoral colorrectal	141

## Índice de Tablas

Tabla I. Descripción del sistema TNM para la estadificación de cáncer colorrectal	13
Tabla II. Correlación entre el sistema de clasificación TNM, la clasificación de Dukes y MAC	14
Tabla III. Fotosensibilizadores de uso clínico o experimental	19
Tabla IV. Matriz de correlación de Perseus	61
Tabla V. Lista de proteínas identificadas en los secretomas de esferoides no tratados (CT) y tratados con dosis letales de terapia fotodinámica (CT TFD).	101
Tabla VI. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por proteínas cuya secreción aumentó luego de la fotosensibilización	108
Tabla VII. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por proteínas cuya secreción disminuyó luego de la fotosensibilización	109
Tabla VIII. Lista de proteínas identificadas en los secretomas de esferoides homotípicos (CT) y heterotípicos (CT + F).	116
Tabla IX. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por proteínas cuya secreción aumentó en los esferoides heterotípicos	122
Tabla X. Lista de proteínas identificadas en los secretomas de esferoides heterotípicos no tratados (CT + F) y tratados con dosis letales de terapia fotodinámica (CT + F TFD)	127
Tabla XI. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por el conjunto de proteínas cuya secreción aumentó en los esferoides heterotípicos fotosensibilizados	134



**Abreviaturas****2D:** Bi-dimensional**3D:** Tri-dimensional**ABCG2:** Bomba exportadora ABCG2 (del inglés, “ATP-binding cassette sub-family G member 2”)**ADN:** Ácido desoxirribonucleico**ALA:** Ácido 5-aminolevulínico**ARN:** Ácido ribonucleico**bHLH:** Hélice-giro-hélice básicos (del inglés, “basic helix-loop-helix”)**CAFs:** Fibroblastos asociados al cáncer (del inglés, “Cancer associated-fibroblasts”)**CCR:** Cáncer colorrectal**C-TAD:** Dominio de transactivación C-terminal (del inglés, “C-terminal, transactivation domain”).**CE:** Célula endotelial**CT:** Célula tumoral**DCF:** 2'7'-diclorofluoresceína**DCFH-DA:** Diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína**DL50:** Dosis letal 50**ENT:** Enfermedades no transmisibles**F:** Fibroblasto**FC:** Ferroquelatasa (del inglés, “ferrochelatase”)**FS:** Fotosensibilizador**GFP:** Proteína verde fluorescente (del inglés, “Green fluorescent protein”)**GLUT1:** Proteína transportadora de glucosa-1 (del inglés, “Glucose transporter 1”)**HD:** Gota colgante (del inglés, “Hanging drop”)**HIF-1:** Factor inducible por hipoxia-1 (del inglés, “Hypoxia inducible factor-1”)**HPD:** Derivado de hematoporfirina (del inglés, “Hematoporphyrin derivative”)**HRE:** Elemento de respuesta a hipoxia (del inglés, “Hypoxia responsive element”)**IARC:** Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer**LC-MS:** Cromatografía líquida-espectrometría de masa (del inglés, “Liquid chromatography–mass spectrometry”)**LFQ:** Cuantificación libre de sonda (del inglés, “Label free quantification”)**LO:** Cubierta líquida (del inglés, “Liquid overlay”)

**MAC:** Astler-Coller Modificada

**MAT:** Microambiente tumoral

**MC:** Medio condicionado

**Me-ALA:** Derivado metilado del ácido 5-aminolevulínico (metil-ALA)

**MEC:** Matriz extracelular

**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium

**NAC:** N-acetilcisteína

**NF- $\kappa$ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, "Nuclear factor- $\kappa$ B")

**NPM1:** Nucleofosmina 1 (del inglés, "Nucleophosmin-1")

**N-TAD:** Dominio de transactivación N-terminal (del inglés, "N-terminal, transactivation domain").

**ODD:** Dominio de degradación dependiente de oxígeno (del inglés, "oxygen-dependent degradation domains")

**PAI-1:** Inhibidor del activador de plasminógeno-1 (del inglés, "Plasminogen activator inhibitor-1")

**PAS:** PER-ARNT-SIM

**PBGD:** Porfobilinógeno deaminasa

**PBS:** Buffer fosfato salino (del inglés, "Phosphate buffered saline")

**PECA:** Porcentaje estimado de cambio anual

**PHD:** Prolilhidroxilasas

**PID:** Base de datos de interacciones de vías (del inglés, "Pathway Interaction Database")

**PpIX:** Protoporfirina IX

**pVHL:** Proteína Von Hippel-Lindau

**RE:** Retículo endoplásmico

**ROS:** Especies reactivas del oxígeno (del inglés, "Reactive Oxygen Species")

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (del inglés, "Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction")

**SFB:** Suero fetal bovino

**SMA:** Actina de músculo liso (del inglés, "Smooth muscle actin")

**TF:** Transferrina

**TFD:** Terapia Fotodinámica

**TFRC:** Receptor de transferrina (del inglés, "Transferrin receptor protein")

**TNM:** Tumor, Nódulos, Metástasis

**t-PA:** Activador tisular de plasminógeno (del inglés, "Tisular plasminogen activator")

**u-PA:** Uroquinasa (del inglés, "urokinase-type plasminogen activator")

**VEGF:** Factor de crecimiento de endotelio vascular (del inglés, "Vascular endothelial growth factor")

## Resumen

El cáncer de colon es el tercer tipo de cáncer más común en hombres y mujeres. Su progresión se ha asociado a la inducción del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1). HIF-1 se activa en respuesta a bajas presiones de oxígeno y de esta manera promueve la expresión de genes involucrados en procesos biológicos de adaptación a hipoxia, como la angiogénesis, invasión, metástasis, metabolismo anaeróbico, resistencia terapéutica, entre otros.

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica contra el cáncer que involucra la destrucción de células inducida por la luz, las cuales han sido previamente sensibilizadas por la administración de un fotosensibilizador (FS). En algunas situaciones, la TFD induce hipoxia como resultado del daño vascular y/o del consumo fotoquímico del oxígeno, limitando la eficacia de esta modalidad al activar vías de supervivencia mediadas por HIF. Por ello, el estudio de la participación de HIF en los protocolos de TFD resulta crítico para optimizar el éxito de la terapia. Por otra parte, el microambiente tumoral afecta la expresión génica de las células y las características fisiológicas del tumor. Por ello, es necesario determinar la influencia del microambiente tumoral sobre la respuesta a la TFD.

En el presente trabajo, se estandarizaron modelos de cultivos tridimensionales (3D) de células de carcinoma colorrectal SW480 con el objetivo de imitar microtumores avasculares. La estabilización de HIF-1 suprimió en gran medida la citotoxicidad de la TFD. Por otro lado, la fotosensibilización de los cultivos 3D disminuyó el nivel de células viables que expresaban HIF, aunque su actividad transcripcional se vio incrementada. Se identificó por primera vez el rol del eje TFD → ROS sobre la modulación de HIF, mostrando que la vía ERK1/2 podría también contribuir a la activación del factor de transcripción post-TFD en los microtumores hipóxicos. En relación al microambiente tumoral, la población fibroblástica asociada al tumor otorgó ventajas proliferativas y de resistencia terapéuticas al tumor intervenido con la TFD. El análisis del secretoma tumoral sugirió que estos eventos estarían mediados al menos en parte por la vía de HIF, cuya significancia biológica se vio incrementada en presencia de fibroblastos.

Conociendo más sobre el diálogo molecular mediado por HIF establecido entre la célula tumoral y su entorno, pretendemos intervenirlo utilizando a la TFD como estrategia terapéutica.

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in men and in women. CRC progression has been associated with the induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 is activated in response to low oxygen pressures and upregulates the expression of genes involved in adaptation to hypoxia, such as angiogenesis, invasion, metastasis, anaerobic metabolism, therapeutic resistance, among others.

Photodynamic therapy (PDT) is a cancer treatment modality that light-dependently destroys tumor cells, which have been previously sensitized by the administration of a photosensitizer (PS). However, PDT can create hypoxia when oxygen is depleted by photochemical consumption or as a result of vascular damage, thus activating survival pathways mediated by HIF. Therefore, the investigation of HIF participation on PDT protocols is critical to optimize the success of this therapy. Moreover, tumor microenvironment affects gene expression and physiological characteristics of tumor. It is therefore necessary to determine the influence of the tumor microenvironment on the response to PDT.

In this work, three-dimensional (3D) cultures of SW480 colorectal carcinoma cells were developed in order to mimic avascular microtumors. The stabilization of HIF-1 suppressed the cytotoxicity of PDT. In addition, the photosensitivity of 3D cultures decreased the level of viable cells expressing HIF, although its transcriptional activity was enhanced. It was identified for first time the role of the axis PDT→ROS on HIF modulation, showing that the ERK1/2 pathway may also contribute to the activation of this factor post-PDT. Regarding tumor microenvironment, cancer-associated fibroblasts provided proliferative advantages and promoted therapeutic resistance on photosensitized tumors. Secretome analysis suggested that these events could be mediated, at least in part, by HIF pathway, whose biological significance was increased in the presence of fibroblasts.

Knowing more about the molecular dialogue established between tumor cells and their environment, it will allow us to interrupt tumor microenvironment using PDT as therapeutic strategy.

# Introducción



## 1. Introducción

### 1.1. Cáncer

El término “cáncer”, también denominado tumor maligno o neoplasia, designa a un amplio grupo de enfermedades no transmisibles de origen celular. Las células tumorales presentan capacidades complementarias entre sí que les confieren su fenotipo característico y que las diferencian sustancialmente de las células normales. Dentro de estas capacidades están incluidas: independencia de factores de crecimiento, insensibilidad frente a señales inhibitoras de desarrollo, potencial replicativo ilimitado, inflamación promovida por el tumor, inestabilidad genómica, invasión tisular y metástasis, evasión de apoptosis, angiogénesis, reprogramación del metabolismo energético y supresión de la destrucción por el sistema inmune<sup>1</sup> (Figura 1).



Figura 1. Capacidades (“hallmarks”) de las células tumorales.  
Imagen adaptada de Hanahan & Weinberg, 2011<sup>1</sup>.

En la mayoría de los casos, el cáncer es una enfermedad multifactorial en la que los factores genéticos y ambientales interactúan para iniciar el proceso de carcinogénesis. Sin embargo, en una minoría (alrededor del 5%), la enfermedad sigue un patrón de transmisión familiar, lo que sugiere

que el cáncer es hereditario. La caracterización de las alteraciones genéticas que se segregan en estas familias ha contribuido a definir los eventos moleculares involucrados en la génesis tumoral<sup>1</sup>.

Como se ha mencionado, el cáncer se caracteriza por un crecimiento y proliferación anormales. La proliferación y la supervivencia de las células normales están controladas por “protooncogenes” promotores del crecimiento y por “genes supresores de tumores” inhibidores del crecimiento. Las lesiones en estos genes, tanto adquiridas de modo somático como heredadas, pueden desencadenar la enfermedad<sup>2</sup>.

Los protooncogenes son genes cuyos productos promueven el crecimiento celular. Una mutación en ellos puede transformarlos en oncogenes y, consecuentemente, se desencadena una proliferación celular anormal. Las mutaciones de los oncogenes, en la mayoría de los casos, son dominantes y de ganancia de función, es decir, se requiere de “un único alelo” mutado para que el oncogen se “active”<sup>1</sup>. Los protooncogenes codifican para proteínas que normalmente sólo son activas bajo el estímulo de una señal regulatoria. Cumplen diversas funciones en la célula como factores de crecimiento (*sis*), proteínas involucradas en cascadas de transducción de señales (*abl*, *raf*, *ras*, *gsp*), reguladores transcripcionales (*jun*, *fos*), principalmente para inducir arrestos en el ciclo celular o inhibición de la apoptosis<sup>1</sup>.

Los genes supresores de tumores se conocen también como anti-oncogenes, dado que normalmente inhiben la tumorigénesis<sup>1</sup>. Las mutaciones en estos genes generalmente son de pérdida de función y recesivas; por lo tanto, “ambos alelos” del gen deben estar mutados para codificar un producto con “actividad reducida o nula”<sup>1</sup>. Los genes supresores de tumores son importantes para evaluar la predisposición heredada al cáncer y los acontecimientos tempranos de la génesis tumoral. La detección de mutaciones en estos genes puede utilizarse como diagnóstico pre-sintomático<sup>1</sup>. Los genes supresores de tumores se clasifican según su función en guardianes (“gatekeepers”) o cuidadores o de mantenimiento (“caretakers”). “Guardianes” son aquellos genes supresores de tumores involucrados en la iniciación, progresión tumoral y metástasis, tales como *p53*, *APC*, *rb*. Los genes supresores de tumores “cuidadores” incluyen *ATM* (ataxia telangiectasia mutada), *ATR* (ATM y Rad3 relacionado), *BRCA1*, *BRCA2* y otros genes reparadores de errores. La inactivación de estos genes lleva a inestabilidades genéticas que promueven la mutación de todos los genes, incluyendo los genes supresores de tumores guardianes<sup>1</sup>.

## 1.2. Epidemiología del cáncer

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son en la actualidad la principal causa de mortalidad mundial. De los 57 millones de defunciones que se produjeron en 2008 en todo el mundo,



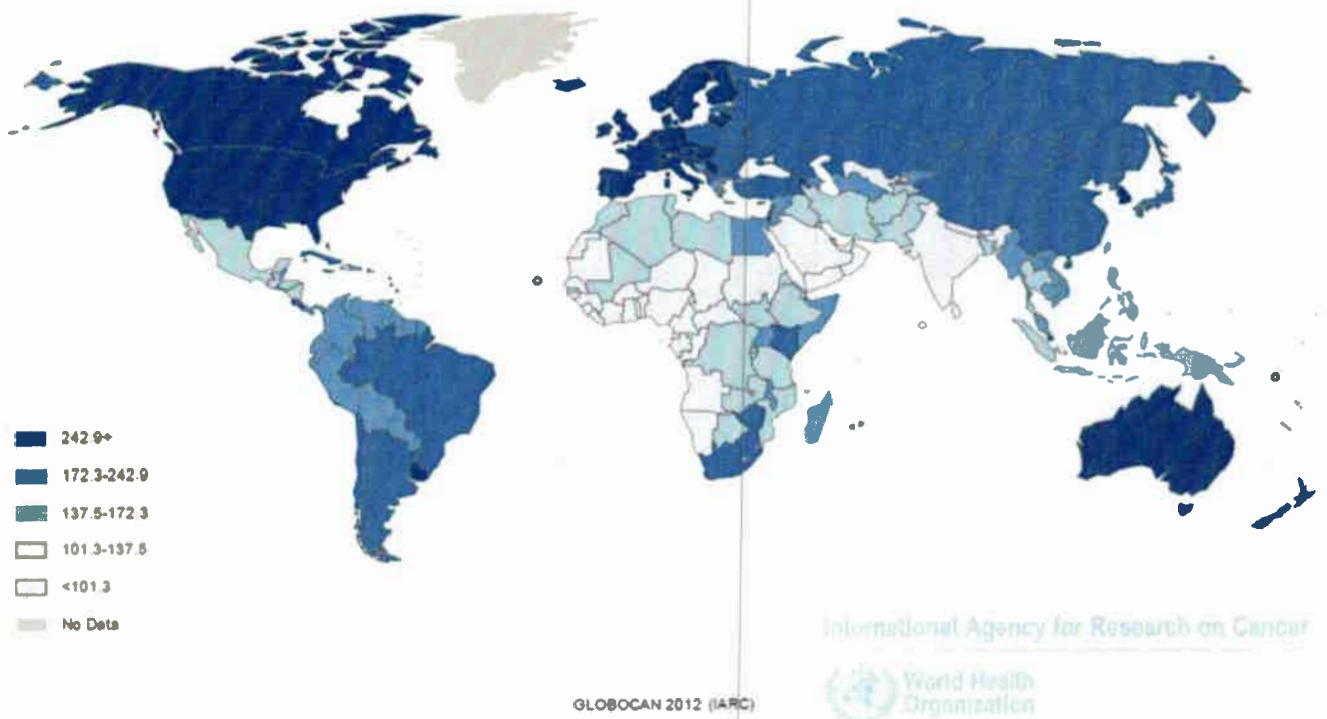
36 millones (aproximadamente las dos terceras partes) se debieron a ENT, principalmente enfermedades cardiovasculares, cáncer, diabetes y enfermedades pulmonares crónicas<sup>3</sup>.

El cáncer, como segunda causa de ENT, fue responsable de 7.6 millones de muertes y por ello se considera una de las enfermedades de mayor importancia en el panorama epidemiológico mundial. Sus manifestaciones clínicas y alta mortalidad que provoca posicionan al cáncer dentro de los principales problemas de salud pública<sup>3</sup>.

Un gran porcentaje de ENT son prevenibles y comparten los mismos factores de riesgo. Se estima que los cinco principales riesgos para la salud están relacionados con el comportamiento y la alimentación: índice alto de masa corporal, bajo consumo de frutas y hortalizas, inactividad física, consumo de tabaco e ingesta excesiva de alcohol<sup>4</sup>. Estos factores causan el 30% de las muertes por cáncer. Aunque la edad es un factor de riesgo considerable, el consumo de tabaco es el más importante: causa 22% de las muertes mundiales por cáncer en general y 71% de las muertes por cáncer de pulmón. Los cánceres causados por infecciones víricas, como el virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por el Virus Papiloma Humanos (VPH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios<sup>4</sup>.

En Argentina, las ENT son responsables de más del 60% del total de las defunciones que se producen anualmente en el país, 20% de las cuales corresponden a tumores. Esto representa aproximadamente 60.000 muertes por año, de las cuales más del 90% se produce en personas mayores de 44 años de edad<sup>4</sup>.

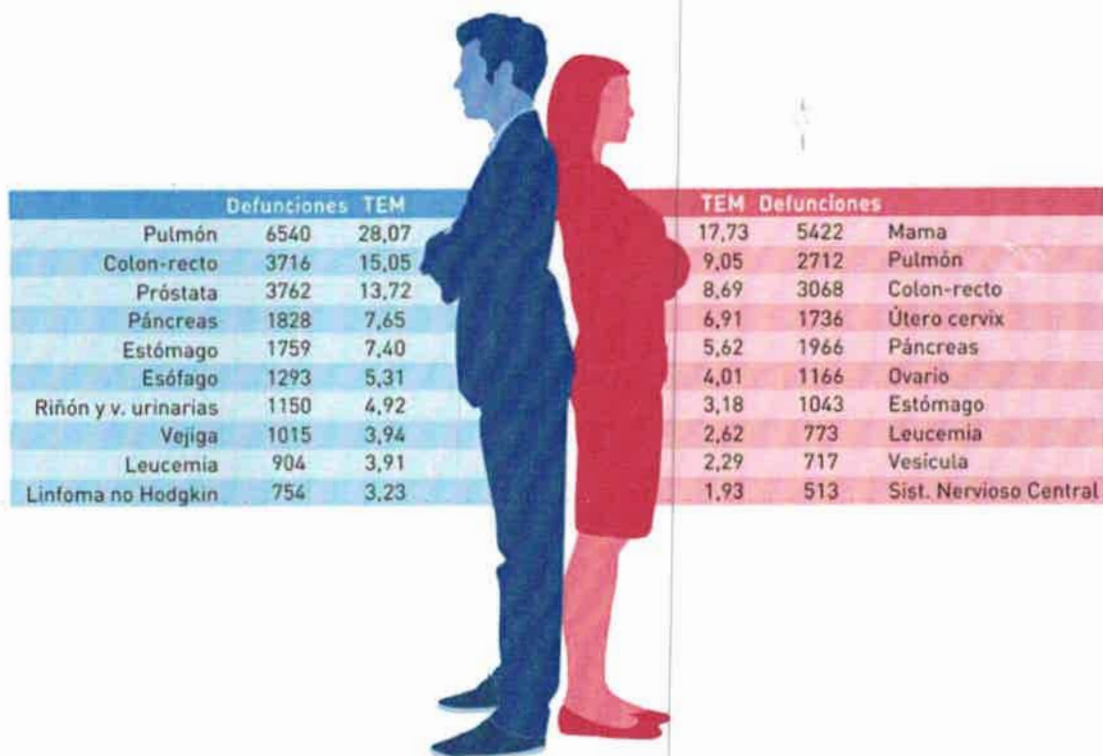
La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) indicó que Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172.3-242.9 x 100000 habitantes), de acuerdo a las estimaciones realizadas el año 2012 (Figura 2). Esta estimación corresponde a más de 100.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres. Con estos números, la IARC ha estimado para Argentina una incidencia en ambos sexos de 217 casos nuevos por año cada 100.000 habitantes, basándose en datos provenientes de Registros de Cáncer de Base Populacional (RCBP) del país y otros que pertenecen a países de la región<sup>5</sup>.



**Figura 2. Tasas de incidencia de cáncer en ambos sexos, excluyendo los cánceres de piel no melanoma por cada 100.000 habitantes.**

Estimaciones del año 2012 de la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer (IARC). Imagen adaptada de <http://globocan.iarc.fr><sup>5</sup>.

En Argentina, la principal causa de muerte en hombres por cáncer se debe a cáncer de pulmón, seguido de cáncer colorrectal. En mujeres, la mayor mortalidad por cáncer se debe al cáncer de mama, mientras que el cáncer de pulmón y el colorrectal le siguen en segundo y tercer lugar de importancia (Figura 3)<sup>4</sup>.



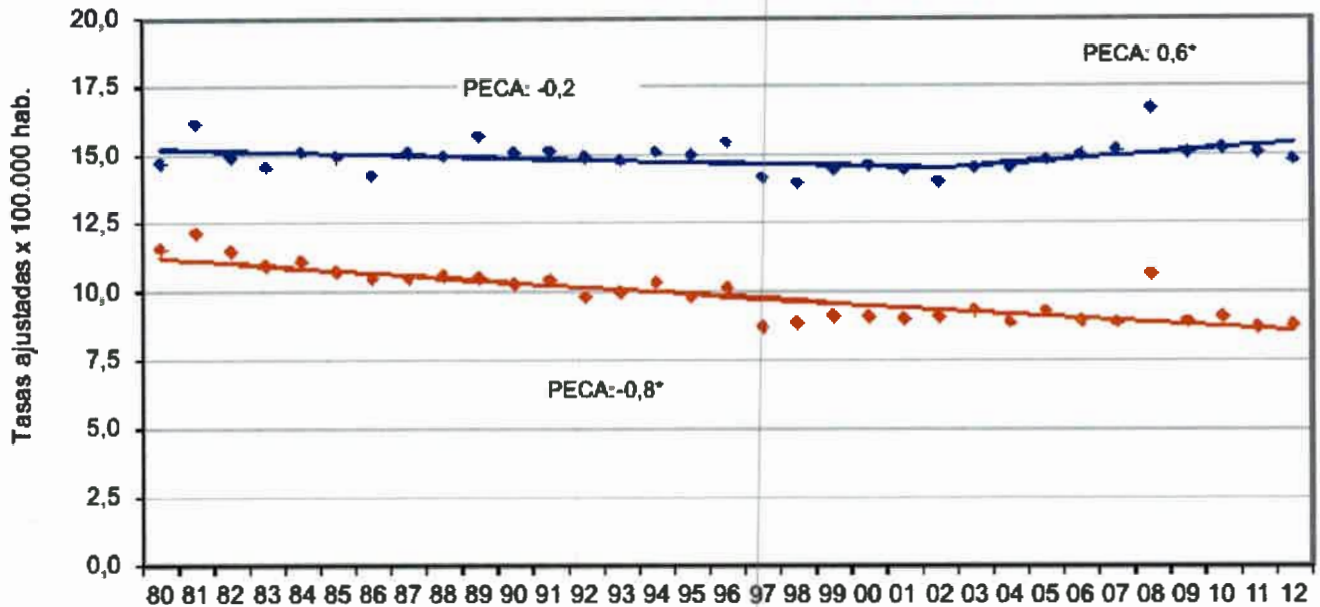
**Figura 3. Defunciones y tasas estandarizadas de mortalidad (TEM) por cáncer cada 100.000 habitantes en hombres y mujeres de Argentina en 2011.**

Estimaciones 2011 del Sistema de Vigilancia Epidemiológica y Reporte (SIVER)/INC – Ministerio de Salud de la Nación, en base a registros de mortalidad de la Dirección de Estadísticas e Información de Salud (DEIS). Imagen adaptada de [www.msal.gov.ar/inc/](http://www.msal.gov.ar/inc/).

### 1.3. Cáncer colorrectal en Argentina

El cáncer colorrectal (CCR) es un tumor maligno que se desarrolla en la última porción del tubo digestivo, compuesta por el colon y el recto<sup>6</sup>.

La mortalidad por CCR en la Argentina ha disminuido en los hombres hasta el año 2002 para luego comenzar un periodo de ascenso a un ritmo de 0.6% anual. Por el contrario, en las mujeres la mortalidad por este cáncer disminuyó 1% por año durante todo el periodo analizado (Figura 4)<sup>4</sup>. Estas tendencias representan el comportamiento de la mortalidad por este cáncer en el total de la población del país. De esta forma, aunque en la mayoría de las jurisdicciones se registró una mortalidad en aumento por CCR en ambos sexos, el incremento porcentual anual ha sido mayor en la población masculina que en la femenina (Figura 4).



**Figura 4:** Tendencias de mortalidad específica por cáncer colorrectal en hombres y mujeres.

Tasas estandarizadas por edad según población mundial por 100.000 habitantes en Argentina (periodo 1980-2012)<sup>4</sup>. Fuente: SIVER/INC–Ministerio de Salud de la Nación en base a registros de mortalidad de la DEIS-Argentina, 2014. PECA: Porcentaje estimado de cambio anual.

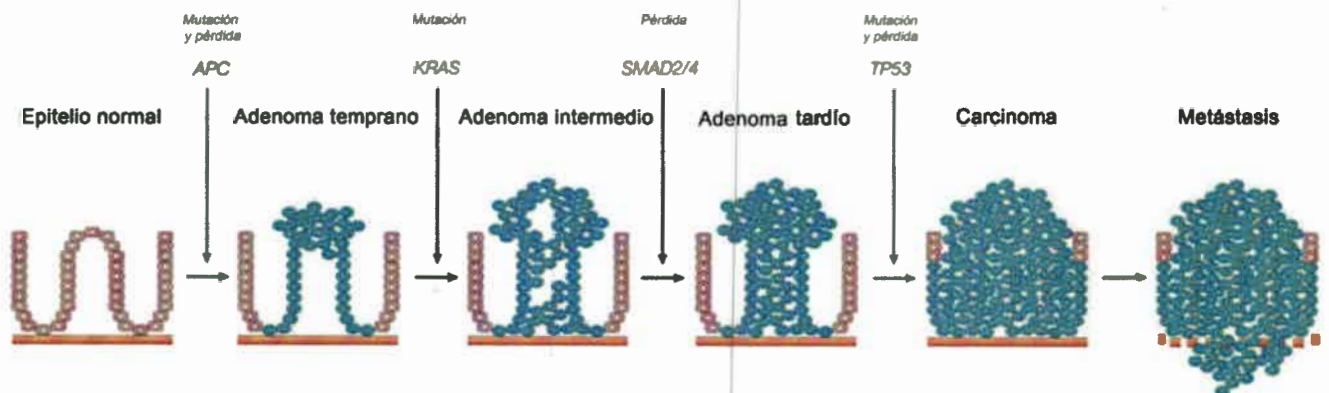
#### 1.4. Biología del CCR

En más del 80-90% de los casos de CCR se produce primero un pólipo (crecimiento anormal de las células de la pared interna del intestino grueso) denominado adenoma displásico, que puede crecer lentamente durante más de 10 años, y si no se detecta y extirpa a tiempo puede transformarse en CCR.

Aproximadamente el 20% de los carcinomas colorrectales presentan antecedentes familiares, mientras que entre el 5-10% corresponden a síntomas hereditarios, principalmente poliposis adenomatosa familiar (PAF) y cáncer colorrectal hereditario no poliposo (HNPCC) o síndrome de Lynch. El CCR hereditario constituye un modelo valioso para estudiar la patogénesis molecular de la enfermedad<sup>7</sup>.

El CCR es el resultado de una acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas de genes que regulan el crecimiento celular y la diferenciación, desencadenando el crecimiento incontrolado de colonocitos, las células que recubren el colon y el recto<sup>6</sup>. Los cambios genéticos señalados como responsables del desarrollo de esta enfermedad han sido bien caracterizados, gracias al avance en las técnicas de biología molecular. Estas alteraciones en general son resultado de mutaciones en genes involucrados en la regulación del crecimiento celular, tales como los genes supresores de tumores (*APC*, *smad4* y *p53*) y oncogenes (*KRAS*, *c-myc*, *c-neu*, *c-src*)<sup>8</sup> (Figura 5).

El desarrollo del CCR va desde hiperplasias benignas a estados de crecimiento altamente invasivos. Inicialmente, el tumor se localiza en la pared del intestino (fase temprana), con un crecimiento de tejido lento o hiperplasia a través de algunas o todas sus capas. Las mutaciones y pérdida de función del gen *APC* constituye uno de los eventos tempranos en el proceso de carcinogénesis de CCR y ocurre en el 70% de los adenomas colorrectales. El pasaje de adenoma a carcinoma es promovido por mutaciones de en el oncogen *KRAS* y en los genes supresores de tumores *SMAD2/4* y *TP53* (Figura 5). Estos acontecimientos suelen estar acompañados por inestabilidad genómica, con la consecuente pérdida de heterocigocidad, y la inestabilidad de microsatélites (secuencias cortas y repetidas de ADN). La pérdida de heterocigocidad en el desarrollo tumoral se da principalmente en los genes supresores de tumores. Por otro lado, la inestabilidad de microsatélite se caracteriza porque el número de repeticiones de éstos resulta diferente de la célula normal. La causa más probable de este evento es la consecuencia directa de la pérdida de capacidad de reparar errores durante la replicación<sup>9,10</sup>. Sin embargo, más del 15% de los CCRs esporádicos se generan a través de vías moleculares diferentes, lo que dificulta su identificación y tipificación<sup>8</sup>. La metástasis hepática constituye la fase avanzada de la enfermedad y la principal causa de muerte por CCR<sup>11</sup>.



**Figura 5. Etapas del desarrollo de cáncer colorrectal.**

*Imagen adaptada de Rajagopalan y col., 2003<sup>12</sup>*

En el 25% de los pacientes el CCR se presenta con enfermedad metastásica, mientras que aproximadamente el 50% de los pacientes con este diagnóstico en algún momento desarrollará metástasis<sup>13</sup>. Los tumores que presentan alta densidad de vasos sanguíneos son los más probables a metastatizar. La angiogénesis, definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes<sup>14</sup>, está asociada con la progresión y metástasis de CCR, afectando la supervivencia del paciente, y ocasionando la mayoría de las muertes<sup>1</sup>.

### 1.5. Histotipos de CCR y clasificación

El principal tipo histológico de cáncer de intestino grueso es el adenocarcinoma, que representa el 90-95% de todos los tumores, mientras que los adenocarcinomas mucosos o coloides representan aproximadamente el 17% de los casos. Estos adenocarcinomas son definidos por la gran cantidad de mucina extracelular retenida dentro del tumor. Otras variantes menos comunes de tumores epiteliales son los carcinomas de células escamosas y el carcinoma adenoescamoso. Dentro de los menos frecuentes, se encuentran los carcinomas indiferenciados, que no contienen estructuras glandulares o se caracterizan por la falta de secreción de mucus. En este grupo se localizan los carcinomas simples, carcinoma medular y el carcinoma trabecular, entre otros<sup>6</sup>.

Actualmente, no se recomienda el uso de la antigua clasificación de CCR de Dukes, en la cual se evalúa la penetración transmural del tumor en la pared del colon<sup>15</sup>, o de Astler-Coller Modificada (MAC), a partir de la cual se definen los estadios A, B1, B2, C1, C2 y D<sup>16</sup>. La estadificación patológica del cáncer de colon se basa en un sistema dual más avanzado, preciso y descriptivo denominado TNM (tumor, nódulos y metástasis)<sup>6</sup>. El sistema TNM incluye una clasificación clínica (cTNM) y otra patológica (pTNM) que sirven para diferentes propósitos. En general, el cTNM es la base para la elección del tratamiento y la pTNM para la evaluación del pronóstico. En la Tabla I se describen los diferentes parámetros utilizados en el sistema TNM, en el cual se identifican la profundidad de la invasión, el estado de los ganglios linfáticos y la presencia de metástasis a distancia<sup>6</sup>.

Tabla I. Descripción del sistema TNM para la estadificación de cáncer colorrectal.

Tumor primario (T)	
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . Intraepitelial o invasión de la lámina propia
T1	El tumor invade la submucosa
T2	El tumor invade la <i>muscularis propia</i>
T3	El tumor invade a través de la muscular propia a los tejidos pericólicas
T4	El tumor invade directamente o está adherido a otros órganos o estructuras
Nódulos linfáticos regionales (N)	
NX	Nódulos regionales no pueden ser evaluados
N0	No hay metástasis en nódulos regionales
N1	Metástasis en 1 a 3 nódulos

N1a	Metástasis en 1 nódulo regional
N1b	Metástasis en 2-3 nódulos regionales
N1c	Depósitos tumorales en subserosa, mesenterio o tejidos pericólicos o perirrectales no peritonizados.
N2	Metástasis en 4 o más nódulos
N2a	Metástasis en 4-6 nódulos regionales
N2b	Metástasis en 7 o más nódulos regionales
<b>Metástasis distante (M)</b>	
MX	No puede evaluarse la presencia de metástasis
M1	Metástasis a distancia presente
M1a	Metástasis confinada a un órgano o sitio (hígado, pulmón, ovario, nódulo no regional)
M1b	Metástasis en más de 1 órgano o sitio, o metástasis peritoneales

Teniendo en cuenta esta clasificación se pueden distinguir cinco estadios de cáncer colorrectal, que se corresponden con los estadios definidos por la clasificación de Dukes o MAC (Tabla II)<sup>6</sup>.

**Tabla II. Correlación entre el sistema de clasificación TNM, la clasificación de Dukes y MAC**

Clasificación TNM				Dukes	MAC
	T	N	M		
<b>Estadio 0</b>	Tis	N0	M0	-	-
<b>Estadio I</b>	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
<b>Estadio IIA</b>	T3	N0	M0	B	B2
<b>Estadio IIB</b>	T4a	N0	M0	B	B2
<b>Estadio IIC</b>	T4b	N0	M0	B	B3
<b>Estadio IIIA</b>	T1, T2	N1, N1c	M0	C	C1
	T1	N2a	M0	C	C1
<b>Estadio IIIB</b>	T3, T4a	N1, N1c	M0	C	C2
	T2, T3	N2a	M0	C	C1, C2
	T1, T2	N2b	M0	C	C1
<b>Estadio IIIC</b>	T4a	N2a	M0	C	C2
	T3, T4a	N2b	M0	C	C2



	T4b	N1-N2	M0	C	C3
<b>Estadio IVA</b>	T	N	M1a	-	-
<b>Estadio IVB</b>	T	N	M1b	-	-

### 1.6. Terapéuticas actuales para CCR

Hay diferentes tipos de opciones terapéuticas disponibles para los pacientes con CCR. Algunos tratamientos son estándares (el tratamiento actualmente en uso) y otros se encuentran en evaluación en ensayos clínicos. En general, se aplica uno o más de un tratamiento estándar, que incluye cirugía, quimioterapia, radioterapia o terapia dirigida<sup>13</sup>.

La cirugía es el tratamiento más común para todos los estadios de cáncer de colon e involucra la extirpación del cáncer en una operación. En el caso de los pólipos malignos, es decir, aquellos que invaden la submucosa sin compromiso ganglionar regional aparente, se realiza una polipectomía (escisión quirúrgica del pólipo) siempre que la estructura del pólipo lo permita. Si en la revisión patológica posterior a la polipectomía se observa fragmentación del pólipo, presencia de características histológicas desfavorables o los márgenes no pueden ser evaluados, se procede a realizar una colectomía. La colectomía es la cirugía de elección para el cáncer de colon no metastásico, y se realiza acompañada de resección en bloque de los ganglios linfáticos regionales<sup>13</sup>.

La quimioterapia es un tratamiento para el cáncer en el que se usan medicamentos para interrumpir el crecimiento de células tumorales, ya sea mediante su destrucción o impidiendo su multiplicación. Cuando la quimioterapia se da por vía oral, intravenosa o intramuscular, los medicamentos ingresan en el torrente sanguíneo y pueden llegar a las células tumorales de todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células tumorales de esas áreas (quimioterapia regional). El tratamiento adyuvante sistémico quimioterapéutico se recomienda en dos ocasiones: a) para los pacientes médicamente inoperables o que presentan tumores localmente irresecables, con el objetivo de convertir la lesión en resecable; b) luego de la resección del tumor primario, con el objetivo de disminuir el riesgo de recaída y muerte<sup>13</sup>. La forma en que se administra la quimioterapia depende del tipo y el estadio de la enfermedad. No es recomendable el tratamiento quimioterapéutico en pacientes con estadio I y resulta controversial en pacientes con estadio II, sin embargo ofrece beneficios en la reducción de recurrencia en pacientes con estadio III<sup>13</sup>. Las drogas aprobadas hasta el momento para el tratamiento de pacientes con CCR son las siguientes: Fluorouracil (Aldrucil®, Efudex®, 5-FU®, Fluoroplex®), Bevacizumab (Avastin®), Irinotecan Hydrochloride (Camptosar®), Cetuximab (Erbix®),



Ramucirumab (Cyramza®), Oxaliplatin (Eloxatin®), Leucovorin Calcium, Trifluridine and Tipiracil Hydrochloride (Lonsurf®), Panitumumab, Ramucirumab, Regorafenib (Stivarga®), Trifluridine-Tipiracil Hydrochloride, Panitumumab (Vectibix®), Leucovorin Calcium (Wellcovorin®), Capecitabine (Xeloda®) y Ziv-Aflibercept (Zaltrap®)<sup>17</sup>.

La radioterapia es un tratamiento para el cáncer en el que se usan rayos X de alta energía u otros tipos de radiación para destruir células tumorales o impedir que crezcan. La forma de administración de la radioterapia depende del tipo y del estadio del cáncer que se esté tratando, aunque se ha reportado que la aplicación de este tratamiento previo a la cirugía ofrece mejores resultados en comparación a su uso como terapia adyuvante<sup>18</sup>.

La terapia dirigida es un tipo de tratamiento para el que se utilizan medicamentos u otras sustancias para identificar y atacar células tumorales específicas, minimizando el daño en células normales. Los tipos de terapia dirigida que se usan en el tratamiento del cáncer de colon son los siguientes<sup>19</sup>:

- Anticuerpos monoclonales: Los anticuerpos monoclonales pueden identificar antígenos en las células tumorales. Los anticuerpos se adhieren a sus ligandos y destruyen las células diana, bloquean su crecimiento o impiden que se diseminen. Los anticuerpos monoclonales se administran por infusión. Se pueden utilizar solos o para llevar medicamentos, toxinas o material radiactivo directamente a las células cancerosas.
- Inhibidores de la angiogénesis: Estas sustancias impiden la formación de vasos sanguíneos nuevos que los tumores necesitan para crecer.

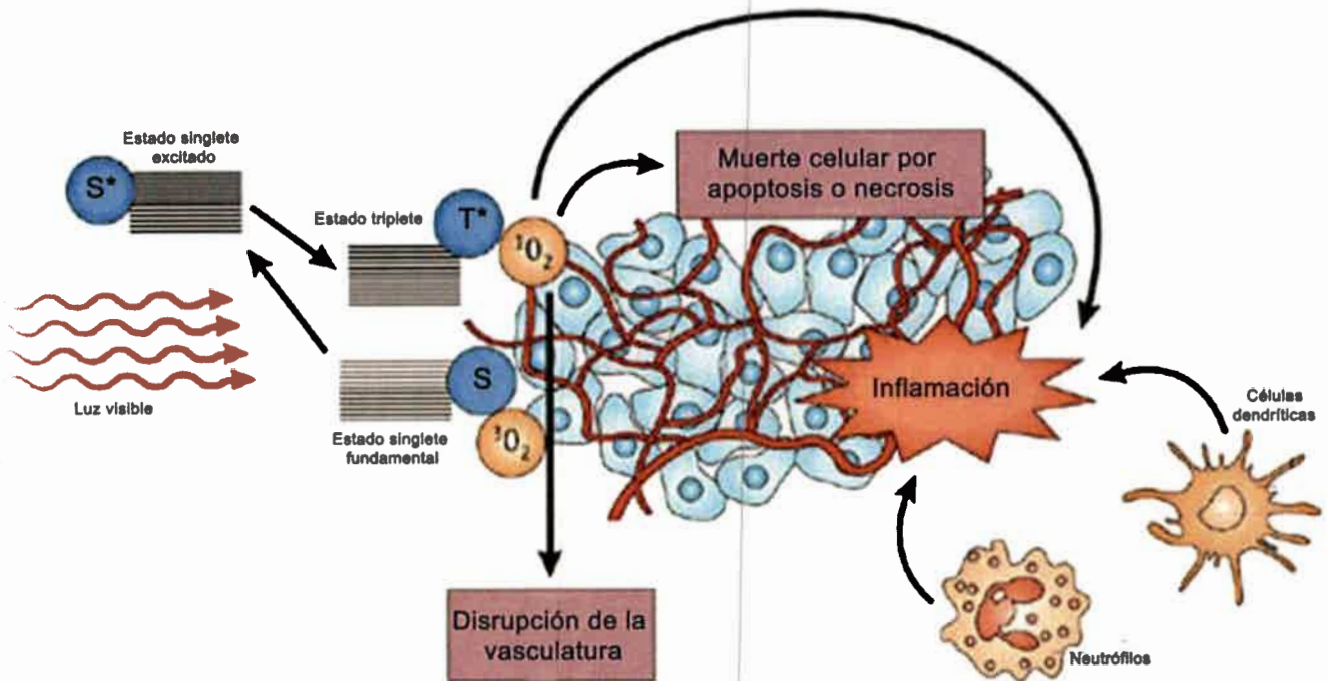
### 1.7. Terapia fotodinámica como estrategia antitumoral

La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento mínimamente invasivo que presenta resultados cada vez más prometedores en la lucha contra el cáncer. Esta modalidad terapéutica consiste en la aplicación de compuestos fotosensibilizadores (FSs) no tóxicos *per se* que se acumulan preferentemente en tejidos tumorales. La irradiación posterior del área tumoral fotosensibilizada ocasiona la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés “Reactive Oxygen Species”) con efectos citotóxicos que llevan a la muerte de las células tumorales. La principal ventaja de la TFD es la selectividad para dañar exclusivamente el tejido tumoral sin inducir graves efectos secundarios en el organismo, ya que sólo en la zona tumoral irradiada se reúnen los tres agentes responsables del efecto fotodinámico: FS, luz y oxígeno (O<sub>2</sub>)<sup>20</sup>.

### 1.8. Especies reactivas del oxígeno: principales mediadores del daño fotodinámico

Las especies reactivas del oxígeno son metabolitos altamente reactivos en cuanto a las modificaciones oxidativas que inducen sobre macromoléculas celulares como proteínas, lípidos, y nucleótidos. El radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) es por lo general la primer especie reactiva producida y se convierte posteriormente en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) espontáneamente o a través de reacciones catalizadas por la superóxido dismutasa (SOD). La reacción entre el  $O_2^{\cdot -}$  y el óxido nítrico (ON) genera peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot -}$ ), especie reactiva del oxígeno y del nitrógeno, respectivamente. De todas las fuentes de ROS celulares, la fuga de electrones de la cadena electrónica mitocondrial hacia el oxígeno molecular genera un flujo constante de  $O_2^{\cdot -}$  y por lo tanto constituye la principal fuente de ROS celular<sup>21</sup>. Otras enzimas, incluyendo las NADPH oxidasas, lipoxigenasa y ciclooxigenasa, citocromo P450s y la xantina oxidasa también participan en la generación de ROS. Cuando ROS se produce en exceso o la capacidad antioxidante endógena se ve disminuida, la oxidación indiscriminada provoca efectos nocivos en la célula, lo que resulta en "estrés oxidativo"<sup>22</sup>.

La generación de estrés oxidativo es la causa principal del daño ejercido en la zona afectada luego de la intervención fotodinámica. La molécula del FS, previo a la irradiación, se encuentra en su estado singlete fundamental (S), que puede absorber fotones de luz visible promocionándose hacia un estado singlete excitado ( $S^*$ ). De allí puede volver al estado fundamental emitiendo fluorescencia o puede pasar al estado triplete excitado ( $T^*$ ) por cruzamiento intersistémico. Nuevamente el triplete puede decaer al estado fundamental emitiendo fosforescencia, o bien, transferir un átomo de hidrógeno o electrón a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, o generar radicales que interactúan con el oxígeno para formar ROS tal como anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); este mecanismo de acción, independiente de  $O_2$ , se denomina de "tipo I". Por otro lado, el estado  $T^*$  puede transferir energía directamente al oxígeno molecular en su estado natural triplete ( $^3O_2$ ), lo que promueve la formación de una especie altamente reactiva denominada oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), denominándose a este mecanismo de "tipo II" (Figura 15). El mecanismo que predomina depende en cada caso de las características del fármaco y del medio<sup>20,23</sup>. Los principales procesos a través de los cuales el  $^1O_2$  y otras ROS contribuyen a la destrucción del tumor por TFD son daño celular directo (necrosis o apoptosis), daño indirecto sobre la vasculatura tumoral o activación de la respuesta inmune contra células tumorales. La aparición de cada uno de estos eventos depende de la naturaleza y localización del FS, la dosis de luz utilizada y el tipo de tumor y vasculatura<sup>20,24</sup>.



**Figura 6. Mecanismo de acción de la terapia fotodinámica.**

La TFD requiere de tres elementos esenciales: FS (en la figura se representa como S, S\* o T\* según su estado de excitación), luz y oxígeno. El FS es excitado con onda de luz visible específica desde su estado singlete fundamental (S) hasta su estado singlete excitado (S\*), seguido de un cruzamiento intersistémico hacia el estado triplete excitado (T\*). La transferencia de energía desde T\* a sustratos biológicos (tipo 1, no mostrado en la figura) u oxígeno molecular (tipo 2) genera ROS ( $^1O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH$ ), lo que produce daño celular por apoptosis o necrosis, disrupción de la vasculatura o activación del sistema inmune. Imagen adaptada de Castano, Mroz, & Hamblin, 2006<sup>25</sup>.

### 1.9. Fotosensibilizadores en TFD

Se han propuesto una serie de características químicas y biológicas que debería reunir el FS ideal, algunas de las cuales se enumeran a continuación<sup>20</sup>:

- Compuesto puro, para facilitar los controles de calidad y la síntesis reproducible.
- Estabilidad química y fotoquímica, que influye directamente en el tiempo y condiciones adecuadas de almacenamiento.
- Elevado coeficiente de absorción en la zona del rojo (600-800 nm). La absorción de los protones en longitudes de onda mayores a 800 nm no proveen la energía suficiente para la formación de ROS. Debido a que la penetración de la luz se incrementa de forma proporcional a su longitud de onda, los FS cuyo pico de absorción se encuentre más cerca de 800 nm (clorinas, bacterioclorinas y ftalocianinas) ofrecen mayor eficiencia terapéutica.
- Elevado rendimiento cuántico de formación de triplete o ROS.
- Solubilidad en fluidos biológicos. En caso contrario, debe poder transportarse al tumor utilizando algún tipo de formulación (liposomas).

- Localización y retención selectiva en el tumor.
- Mínima toxicidad en ausencia de luz.
- Rápida eliminación del fármaco en los tejidos no tumorales y mínima fotosensibilidad cutánea.

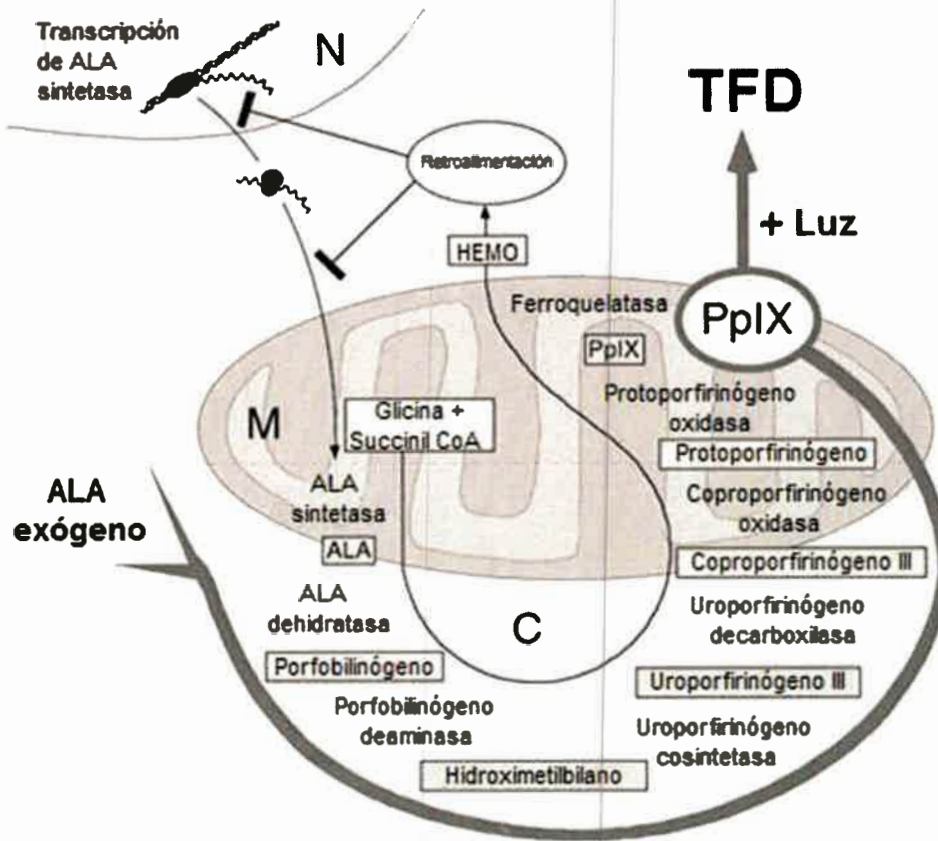
El primer fotosensibilizador aplicado en TFD antitumoral fue una mezcla de porfirinas hidrosolubles denominadas “derivado de hematoporfirina” (HPD, del inglés “hematoporphyrin derivative”). Luego surgió una fórmula purificada de éste, denominada porfímero sódico (Photofrin®). A pesar de que Photofrin® es el FS más utilizado actualmente, presenta ciertas desventajas como fotosensibilidad cutánea duradera y baja absorbancia a 630 nm. Posteriormente, se desarrollaron FS de segunda generación; muchos de ellos se encuentran aprobados para uso clínico y otros todavía están en fase de estudio experimental (Tabla III)<sup>20</sup>.

Tabla III. Fotosensibilizadores de uso clínico o experimental

FS	Estructura	$\lambda$ (nm)	Aprobado	Fase experimental	Tipo de cáncer
Porfímero sódico (Photofrin®)	Porfirina	630	Todo el mundo	-	Pulmón, esófago, conducto biliar, vejiga, cerebro, ovario
ALA	Precursor de porfirina	635	Todo el mundo	-	Piel, vejiga, cerebro, esófago
Me-ALA (éster metilado de ALA)	Precursor de porfirina	635	Europa	-	Piel, vejiga
Temoporquina	Clorina	652	Europa	Estados Unidos	Cabeza y cuello, pulmón, cerebro, piel, conducto biliar
Verteoporquina	Clorina	690	Todo el mundo	Reino Unido	Uso oftalmológico, páncreas, piel
HPPH	Clorina	665	-	Estados Unidos	Cabeza y cuello, esófago, cuello
SnEt2	Clorina	660	-	Estados Unidos	Piel, mama
Talaporquina	Clorina	660	-	Estados Unidos	Hígado, colon,

					cerebro
Ce6-PVP y sus derivados	Clorina	660	-	Belarus, Rusia	Nasofaringe, sarcoma, cerebro
Pc4	Ftalocianina	675	-	Estados Unidos	Linfoma de células T cutáneo
Padoporfina	Bacterioclorina	762	-	Estados Unidos	Próstata
Lutecio motexafina	Texafirina	732	-	Estados Unidos	Mama

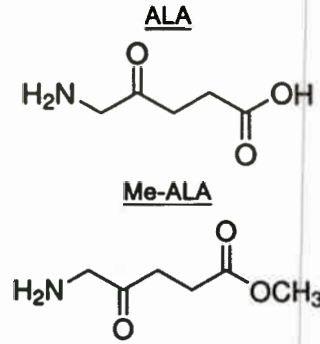
Dentro de la gran variedad de FSs estudiados, un caso especial es el de la Protoporfirina IX (PpIX), debido a que es un FS generado endógenamente a partir del Ácido 5-aminolevulínico (ALA). En un primer paso de la biosíntesis del grupo hemo se forma el ALA con la unión de glicina y succinil CoA. El ALA evoluciona a PpIX en varios pasos regulados enzimáticamente y por último se incorpora un átomo de hierro al macrociclo de PpIX. Esta incorporación de hierro se realiza en la mitocondria bajo la acción de la enzima ferroquelatasa. Bajo circunstancias normales, la biosíntesis está regulada y no se acumula PpIX, pero si se administra exógenamente un exceso de ALA, la PpIX se puede acumular debido a la capacidad limitada de la ferroquelatasa (Figura 16).



**Figura 7. Biosíntesis del grupo hemo y su relación con TFD.**

Las enzimas y metabolitos que participan en esta vía se encuentran tanto en la mitocondria (M) como en el citosol (C). El grupo hemo regula negativamente a la enzima ALA sintetasa tanto a nivel transcripcional, dentro del núcleo (N), como a nivel post-transcripcional. La aplicación de ALA exógeno induce un exceso en la formación de los precursores del grupo hemo, incluyendo PpIX, que de esta forma puede ser utilizada como fotosensibilizador. Imagen adaptada de Donnelly y col, 2008<sup>26</sup>.

Sin embargo, la hidrofiliidad de ALA es la principal limitación para su uso terapéutico, por su bajo nivel de penetración e incorporación de este tipo de moléculas en la membrana plasmática y en los tejidos. Por esta razón, se han desarrollado ésteres derivados de ALA, como su derivado metilado (Me-ALA) que es utilizado en este trabajo, los cuales presentan una lipofiliidad mayor, y consecuentemente una mayor incorporación<sup>26</sup> (Figura 8).



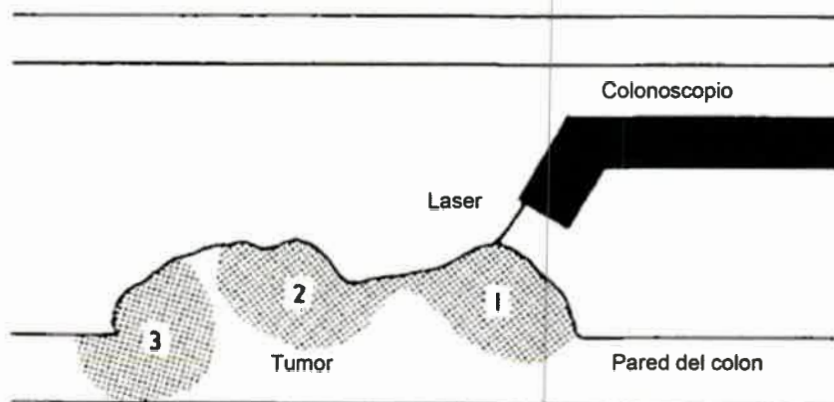
**Figura 8. Precursores de PpIX.**

*ALA y su derivado metilado, Me-ALA, son precursores de PpIX dentro de la vía de biosíntesis del grupo hemo. Imagen adaptada de Donnelly et al., 2008<sup>26</sup>.*

### 1.10. TFD y cáncer colorrectal

En el contexto del CCR se ha propuesto a la TFD como apropiada para prevenir la recurrencia local después de la escisión del tumor, teniendo en cuenta antecedentes que indicaban que pacientes con carcinomatosis peritoneal toleraron adecuadamente esta terapéutica<sup>27</sup>.

Sin embargo, el primer estudio de fotosensibilización sobre CCR fue realizado sobre pacientes no aptos para la resección quirúrgica de la enfermedad (Figura 9). Los resultados demostraron que la TFD utilizando HpD como fotosensibilizador fue capaz de disminuir la sintomatología de la enfermedad a los 30 días post-tratamiento en todos los casos tratados. Desafortunadamente, sólo el 20% de los pacientes se encontraron libres del tumor a los 20 y 28 meses luego de la TFD<sup>28</sup>.



**Figura 9. Irradiación de una lesión tumoral longitudinal localizada en colon.**

*Utilizando un colonoscopio, se insertó una fibra láser en 3 sitios diferentes de la lesión tumoral. Esta metodología de irradiación fue la reportada por Barr y col., 1990<sup>28</sup>.*

Otro reporte indicó que el tratamiento fotodinámico utilizando Phorofrin logró eliminar completamente un carcinoma rectal localizado y recurrente a las 10 semanas posteriores a la aplicación, aunque con recurrencia 16 semanas después<sup>29</sup>.

Si bien se han reportado casos de erradicación de la enfermedad<sup>28,29</sup>, otros datos revelan una respuesta completa al tratamiento (individuos libres de tumor) dentro de las primeras semanas, y recurrencia a largo plazo<sup>29</sup>. Este pronóstico desfavorable podría ser consecuencia del daño vascular observado luego de la aplicación del tratamiento y/o del consumo fotoquímico de oxígeno involucrado en su mecanismo de acción. Estos eventos han señalado a la TFD como inductora de hipoxia (disminución del nivel de oxígeno) y por lo tanto de los fenotipos promotores de crecimiento tumoral que esta condición ambiental desencadena<sup>23,30,31</sup>.

### 1.11. Hipoxia y cáncer

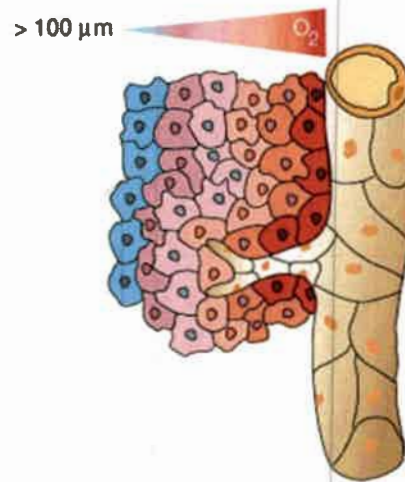
Es ampliamente conocido que las células tumorales emergen como resultado de alteraciones genéticas en señales que promueven el crecimiento y la supervivencia, mientras que su expansión recae principalmente en la provisión de nutrientes<sup>1</sup>. Las neoplasias son muy heterogéneas y se desarrollan en microambientes muy diversos, sin embargo, la mayoría de los tumores sólidos comparten la capacidad de desarrollarse dentro de un microambiente hipóxico. El aire ambiental contiene 21% O<sub>2</sub> (presión de O<sub>2</sub>: 150 mm Hg), aunque muchos tejidos corporales se desarrollan con 2-9% de O<sub>2</sub> (promedio 40 mm Hg). Las condiciones hipóxicas se definen como <2% O<sub>2</sub>, y las condiciones anóxicas como <0.02% O<sub>2</sub><sup>32</sup>.

Una característica distintiva de las células tumorales es su proliferación acelerada y descontrolada; esto lleva a un desbalance entre el consumo y el suplemento de oxígeno dentro de los tumores sólidos. Esta hipoxia tumoral provocada por el metabolismo celular es exacerbada debido a la limitación en la difusión del oxígeno en tumores primarios avasculares o sus metástasis. Por otro lado, la microvasculatura tumoral, inducida en parte por el estímulo hipóxico, presenta aberraciones que la hacen disfuncional y suele fallar a la hora de rectificar el déficit de oxígeno. La hipoxia persistente explica la desorganización espacial de la red vascular tumoral, llevando a distancias intercapilares que suelen ser mayores al rango de difusión del oxígeno. Esto conduce a la generación de un gradiente en el contenido de oxígeno dentro de los tumores sólidos<sup>33,34</sup>.

Las células tumorales proliferan y crecen de forma activa sólo si son suplementadas con suficiente oxígeno y demás nutrientes a través de los vasos sanguíneos. Es por esto que los tumores crecen como un conglomerado alrededor de la vasculatura más cercana. Las células tumorales se disponen secuencialmente rodeando al vaso, primero las células viables oxigenadas (células en normoxia), luego las células en dormancia que reciben baja presión de oxígeno (células hipóxicas) y



finalmente, más alejadas de la vasculatura, se encuentran las células anóxicas muertas (células necróticas). Debido a la distancia máxima de difusión del  $O_2$ , las células hipóxicas comienzan a observarse a 70-100  $\mu m$  de la vasculatura tumoral<sup>35</sup> (Figura 10).



**Figura 10. Organización espacial de las células tumorales en relación a la vasculatura.**

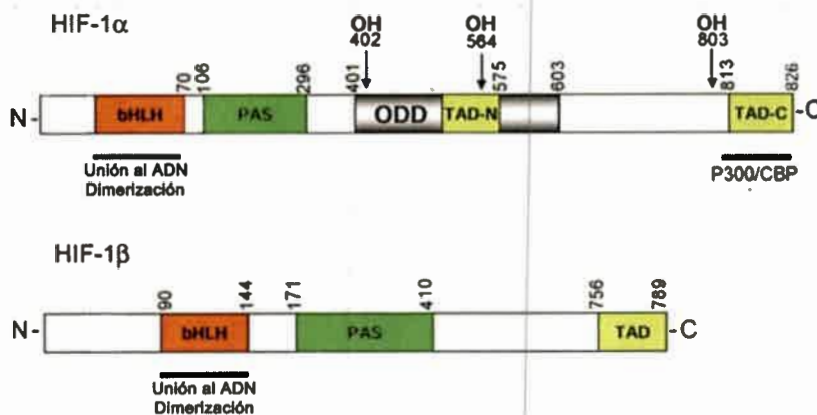
Debido a la organización irregular de la vasculatura tumoral, muchas de las células neoplásicas deben crecer a una distancia mayor de 100  $\mu m$  (límite de difusión del oxígeno) del vaso sanguíneo más próximo dando inicio a las regiones hipóxicas del microambiente tumoral (el gradiente de rojo a azul indica la progresión de la hipoxia). Imagen adaptada de Carmeliet & Jain, 2000<sup>36</sup>.

La hipoxia modula muchos aspectos de la biología tumoral, principalmente la selección de genotipos con capacidad de sobrevivir bajo el daño hipóxico y cambios en la expresión génica que conllevan a la supresión de la apoptosis y desarrollo de autofagia como mecanismo de resistencia. La hipoxia también promueve la reprogramación anaeróbica del metabolismo energético, la supresión de la respuesta inmune, la angiogénesis y vasculogénesis tumoral y la transición epitelio-mesénquima con la consecuente invasión tisular y posterior metástasis. Por otro lado, la hipoxia contribuye a la pérdida de estabilidad genómica a través de un incremento en la generación de ROS e inhibición de los mecanismos de reparación del ADN. Por ello, la limitación de oxígeno es central en el control de la neovascularización, supervivencia y esparcimiento de las células del tumor (metástasis)<sup>33,34</sup>. Además, las regiones tumorales hipóxicas muestran un incremento en la resistencia a la radiación y quimioterapia<sup>37</sup>.

### 1.12. Hipoxia y HIF-1

La respuesta molecular principal frente a la hipoxia involucra al factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1, del inglés “hypoxia inducible factor-1”). HIF-1 pertenece a una familia de proteínas que

conservan el patrón tridimensional hélice-giro-hélice básicos (bHLH, del inglés “basic helix–loop–helix”). Este factor de transcripción es un heterodímero compuesto por las subunidades HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$  (también conocida como ARNT). La subunidad HIF-1 $\alpha$  está compuesta por 4 dominios funcionales: el dominio bHLH, el dominio PER-ARNT-SIM (PAS, involucrado en la dimerización y unión al ADN), el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD, necesario para la degradación de esta subunidad vía proteasoma) y dos dominios de transactivación (N-TAD y C-TAD, necesarios para la activación de su función transcripcional). HIF-1 $\beta$  está compuesta por los dominios bHLH, PAS y de transactivación<sup>38</sup> (Figura 11).



**Figura 11.** Dominios presentes en las subunidades proteicas HIF-1 $\alpha$  y HIF-1 $\beta$ .

En la imagen se muestran los dominios funcionales y de unión a cofactores mencionados en el texto. Los sitios de hidroxilación se encuentran indicados con una flecha. Imagen adaptada de Richard, Berra, & Pouyssegur, 2000<sup>39</sup>.

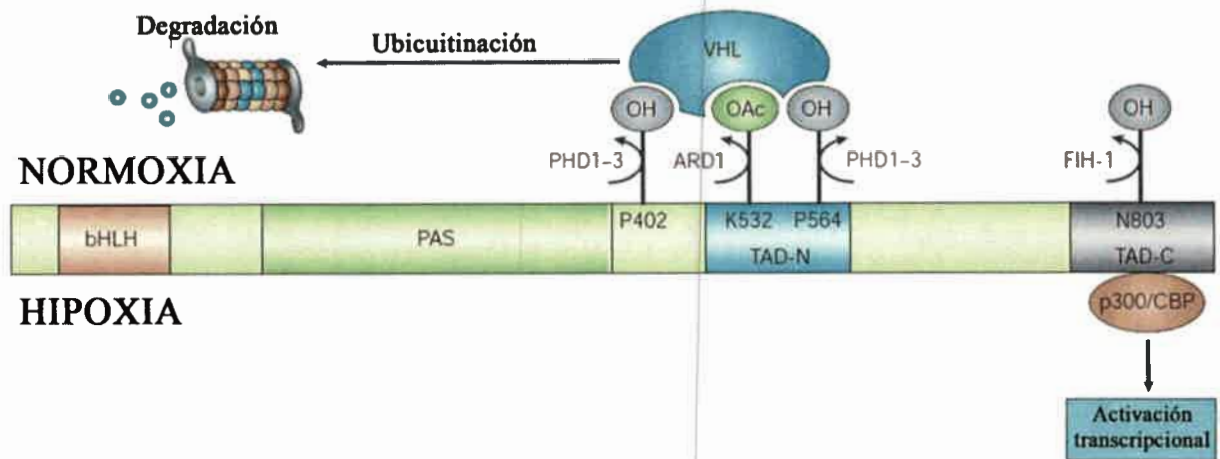
La regulación más relevante ejercida sobre la proteína HIF-1 se realiza post-traduccionalmente de forma diferencial según la presión de oxígeno del ambiente. Bajo condiciones de baja presión de oxígeno, el heterodímero HIF-1 $\alpha$ / $\beta$  activa la transcripción de genes de respuesta a hipoxia<sup>40,41</sup>, involucrados en la proliferación y supervivencia celular, metabolismo anaeróbico, regulación de pH, reclutamiento de células inflamatorias, angiogénesis y metástasis, entre otros<sup>32</sup>. Se ha reportado que la subunidad HIF-1 $\alpha$  puede actuar como regulador de la expresión de genes independientemente de su actividad transcripcional y de su unión a HIF-1 $\beta$ . Bajo este nuevo mecanismo no canónico, HIF-1 $\alpha$  activa la transcripción de genes inhibidos por Myc, desplazando a este represor de su sitio de unión al ADN. Para que HIF-1 $\alpha$  lleve a cabo esta novedosa función sólo precisa de una subregión dentro del dominio PAS, es decir, no requiere de sus dominios de transactivación ni de aquéllos que participan en la unión al ADN<sup>42-45</sup>.

Se han reportado tres isoformas de la subunidad HIF- $\alpha$  expresadas por locus individuales en humanos: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ . Existe gran similitud en las secuencias proteicas de HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  y ambas están sometidas a la misma regulación post-traducciona. La menos estudiada es la HIF-3 $\alpha$ , que parece jugar un papel dominante negativo en la respuesta hipóxica. HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  pueden ser selectivos en los genes que inducen o reprimen. El hecho de que ciertos genes sean inducidos por una u otra isoforma o la especificidad del tipo celular con expresión dominante de una u otra todavía no se ha esclarecido en su totalidad<sup>46</sup>.

#### *1.12.1. Regulación post-traducciona de HIF-1 $\alpha$ a través de los dominios ODD y C-TAD*

Como se mencionó anteriormente, la proteína HIF-1 es regulada post-traduccionalmente de forma diferencial según la presión de oxígeno del ambiente. En normoxia, HIF-1 $\alpha$ , la subunidad regulatoria de HIF-1, es hidroxilada en dos residuos de prolina dentro del dominio ODD por las proteínas prolil hidroxilasas PHD1, PHD2 y PHD3<sup>47</sup>. HIF-1 $\alpha$  hidroxilado interactúa con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL)<sup>48</sup>, la cual forma parte de la ligasa de ubiquitina E3, lo que promueve la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  y la consecuente degradación por proteasoma 26S. Además, HIF-1 $\alpha$  es hidroxilado en un residuo de asparragina del dominio C-TAD por la asparragil hidroxilasa FIH (del inglés, “factor inhibiting HIF”). La hidroxilación de este residuo previene la interacción del dominio C-TAD con el coactivador CBP/p300, inhibiendo de esta forma la actividad transcripcional de HIF.

En hipoxia, tanto las prolil hidroxilasas (PHDs) como el factor inhibidor de HIF (FIH) se encuentran inhibidos. La supresión de la actividad de PHDs también se ha reportado debido a la generación de especies reactivas del oxígeno<sup>49</sup>. De esta forma, HIF-1 $\alpha$  se estabiliza en citoplasma y adquiere la capacidad de traslocar al núcleo y unirse con la subunidad constitutiva HIF-1 $\beta$ , para formar la proteína HIF-1 activa. Entonces el heterodímero HIF-1 $\alpha/\beta$  recluta al coactivador p300/CBP y se une al elemento de respuesta a hipoxia (HRE, del inglés “hypoxia response element”) activando la transcripción de genes de respuesta a hipoxia<sup>40,41</sup> (Figura 12).

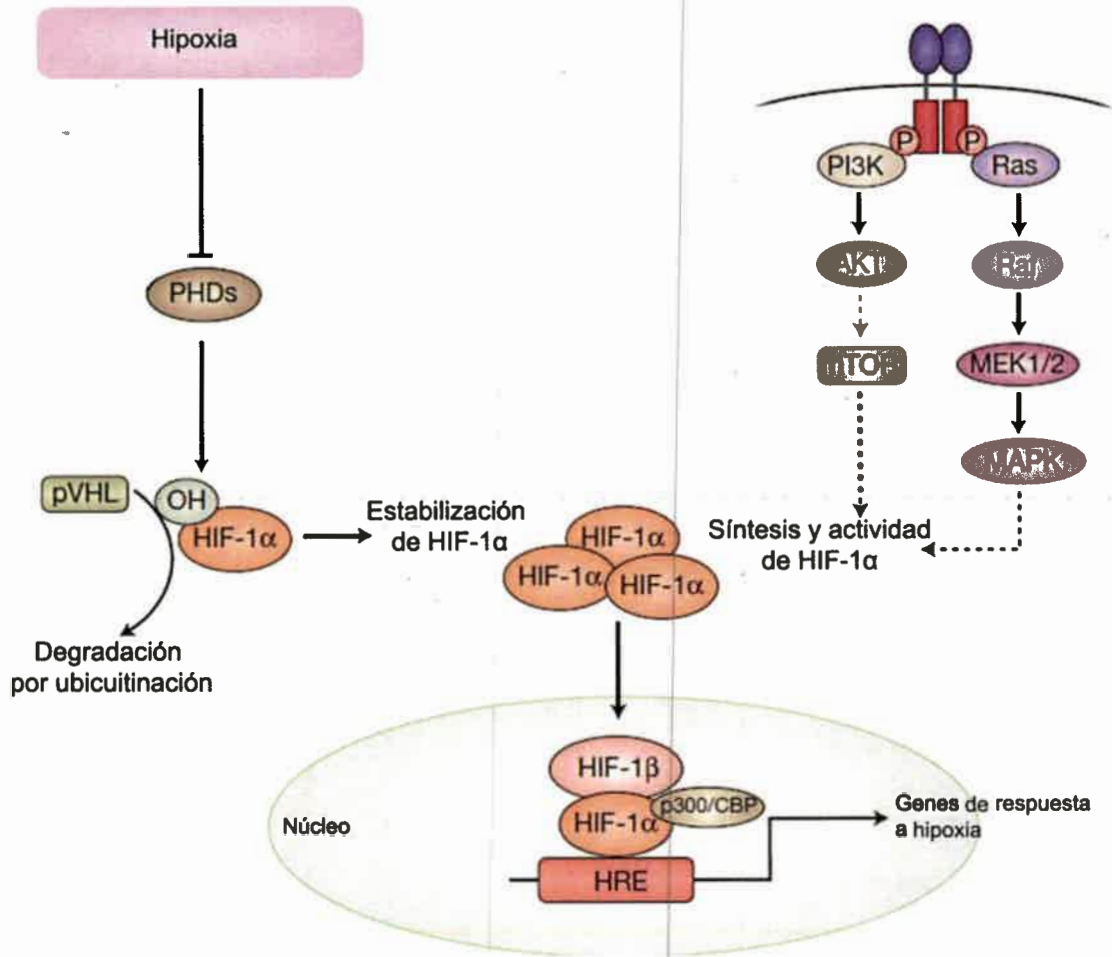


**Figura 12. Regulación de la actividad de HIF-1 dependiente de  $O_2$ .**

El oxígeno regula la degradación de la subunidad HIF-1 $\alpha$ . En normoxia, la hidroxilación de los residuos de prolina en posición 402 y 564 (P402-P564) por las enzimas PHD (prolilhidroxilasa 1-3) es necesaria para el reclutamiento de la proteína supresora de tumores VHL (von Hippel-Lindau) que forma parte de la ligasa de ubiquitina E3. La unión de VHL a HIF-1 $\alpha$  también es promovida por la acetilación del residuo de lisina en posición 532 (K532) por la ARD1 acetiltransferasa. La ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  direcciona su degradación por proteasoma 26S. El oxígeno también regula la interacción de HIF-1 $\alpha$  con co-activadores transcripcionales. En normoxia, la hidroxilación del residuo de asparagina en posición 803 (N803) por la enzima FIH (factor inhibidor de HIF-1) bloquea la unión de p300 y CBP a HIF-1 $\alpha$  y su consecuente actividad transcripcional. Bajo condiciones hipóxicas, la hidroxilación de P402, P564 y N803 disminuye. Así, VHL no puede unirse a HIF-1 $\alpha$  no hidroxilado en P402 y P564, por lo que su degradación disminuye. Adicionalmente, p300 y CBP se unen a HIF-1 $\alpha$  no hidroxilado en N803, permitiendo la transcripción de genes de respuesta a hipoxia. Imagen adaptada de Semenza, 2003<sup>50</sup>.

### 1.12.2. Regulación de la transcripción de HIF-1 $\alpha$

Además de la regulación post-traducciona, se han reportado moduladores transcripcionales y traduccionales de los niveles de HIF-1 $\alpha$  que involucran las vías de señalización de PI3K y MAPK. En el primer caso, PI3K activa a Akt y mTOR. Con respecto a la vía de las MAPK, ERK1/2 es activada por MEK1/2. ERK1/2 y mTOR fosforilan a S6 quinasa (S6K), la cual inicia una cascada de reacciones que finalmente aumentan la actividad, transcripción y/o traducción de HIF-1 $\alpha$  (Figura 13). Ciertos oncogenes, como el receptor tirosin-quinasa Ras o los miembros de la familia Raf<sup>51,52</sup>, factores de crecimiento<sup>53</sup> y el estrés oxidativo<sup>54</sup> han sido involucrados en estas vías de señalización.



**Figura 13. Regulación de HIF-1α.**

La subunidad HIF-1α se encuentra modulada a nivel transcripcional y traduccional, a través de las vías de PI3K y MAPK, y post-traduccionalmente mediante la ubiquitinación regulada por prolil hidroxilasas dependiente de oxígeno. Imagen adaptada de Poon y col, 2009<sup>38</sup>.

NF-κB (del inglés, “nuclear factor κB”) es el principal regulador transcripcional de HIF-1α. El promotor de HIF-1α contiene la secuencia consenso que permite la unión de las subunidades p50 y p65 del factor de transcripción NF-κB<sup>55,56</sup>. El aumento de la transcripción de HIF-1α mediada por NF-κB se ha reportado en respuesta a diferentes estímulos, como factores de crecimiento<sup>57</sup>, hipoxia<sup>58</sup> y estrés oxidativo<sup>59</sup>.

En resumen, la hipoxia, desregulación de ROS y la activación de vías de supervivencia celular tienen la capacidad de activar a HIF-1α y cabe destacar que la TFD se encuentra involucrada en todos los mecanismos mencionados<sup>20,23,24,30,31,60</sup>. En consecuencia, diversos estudios han identificado un aumento en la expresión de HIF-1α luego del tratamiento fotodinámico<sup>61-63</sup>.

### 1.13. Sobreexpresión de HIF en CCR

Numerosos reportes han demostrado un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en adenomas y aún más frecuentemente en adenocarcinomas colorrectales<sup>64-66</sup>, lo que sugiere una asociación directa entre este factor de transcripción y la progresión de la enfermedad.

En este sentido, en un ensayo de inmunohistoquímica realizado sobre biopsias de pacientes se observó que el 66.7% de los adenocarcinomas colorrectales y el 12.25% de los adenomas estudiados presentaron marcación positiva para HIF-1 $\alpha$ . Además, la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue significativamente mayor en aquellos pacientes con estadio III de la enfermedad, en comparación con los correspondientes al estadio I y II<sup>67</sup>. Otro reporte confirmó lo anteriormente expuesto al identificar diferencias significativas en la transcripción del ARNm de HIF-1 $\alpha$  y de su gen diana VEGF entre adenomas y CCR, así como un aumento al comparar los estadios Dukes C y D con los estadios Dukes A y B<sup>67</sup>. Estos resultados fueron corroborados por otros análisis, en donde el grado y estadio tumoral en 125 CCRs también se correlacionó fuertemente con la presencia de HIF-1 $\alpha$ <sup>68</sup>. Otro ensayo indicó que HIF-1 $\alpha$  no se encontró en la mucosa intestinal normal, ni tampoco en pólipos hiperplásicos ni en adenomas de bajo grado. Sin embargo, este factor de transcripción mostró una intensa acumulación nuclear y perinuclear en el 50% de los adenomas de alto grado, así como localización nuclear en la totalidad de los CCRs. Contrario a lo esperado, no hubo una correlación entre HIF-1 $\alpha$  y el nivel de metástasis<sup>65</sup>.

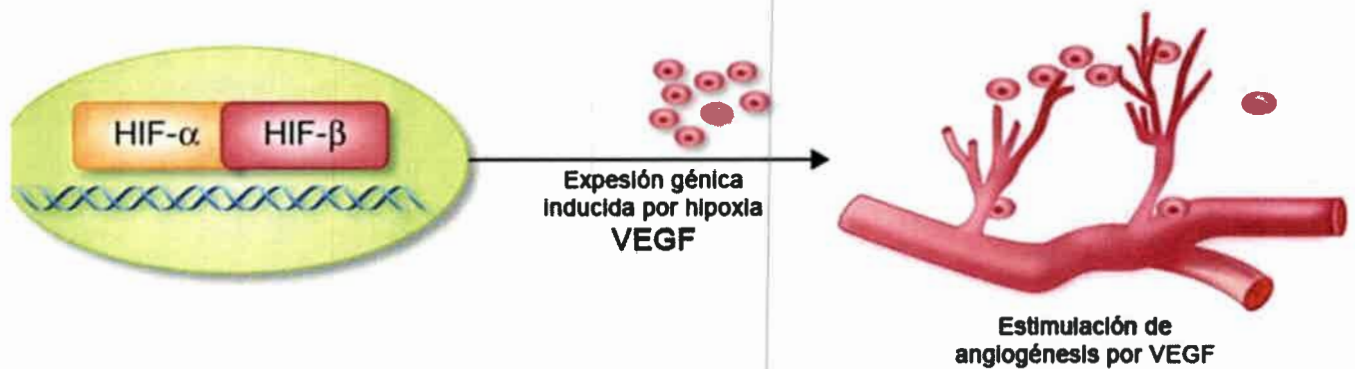
Los antecedentes mencionados señalan a HIF-1 $\alpha$  como un mediador clave de las primeras etapas del CCR, con elevada influencia en la carcinogénesis, cuyo rol se intensifica conforme avanza la enfermedad y el tumor progresa hacia etapas más invasivas.

### 1.14. Hipoxia, angiogénesis e intervención fotodinámica

El aumento descontrolado en el crecimiento de las células tumorales y su entorno en última instancia requiere de la vasculatura. Una vez que la lesión tumoral excede de 100  $\mu$ m de diámetro, la limitación de oxígeno (hipoxia)<sup>69</sup> y la privación de nutrientes desencadena un "switch angiogénico" para permitir que el tumor siga progresando<sup>70</sup>. Este fenómeno asociado directamente a la promoción tumoral es uno de los eventos claves regulados por el factor de transcripción HIF.

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos a partir de capilares preexistentes y tiene gran importancia en procesos fisiológicos y patológicos del organismo<sup>71</sup>. En general, en el adulto la vasculatura está quiescente y la angiogénesis sólo ocurre en tejidos estimulados<sup>72</sup>.

El crecimiento de vasos sanguíneos en relación al crecimiento tumoral es un proceso complejo, muy regulado y que consta de varias etapas: 1) la activación de la célula endotelial (EC) y separación de ésta de los pericitos y de la membrana basal, 2) la degradación de la matriz extracelular (MEC), 3) la movilización y migración de las EC en respuesta a factores proangiogénicos, y 4) la reorganización en estructuras tubulares (nuevos vasos sanguíneos) dentro de la masa tumoral. Para que se lleve a cabo el proceso de angiogénesis, se requiere del redireccionamiento del perfil transcripcional de las células neoplásicas hacia la inducción de un grupo de genes que codifican para factores solubles que se secretan y conforman la estimulación parácrina tumoral sobre la EC. Entre los factores secretados específicos que promueven la angiogénesis se destacan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y las angiopoyetinas 1 y 2 (Ang-1 y Ang-2)<sup>69,72,73</sup> (Figura 14).



**Figura 14. Angiogénesis e hipoxia.**

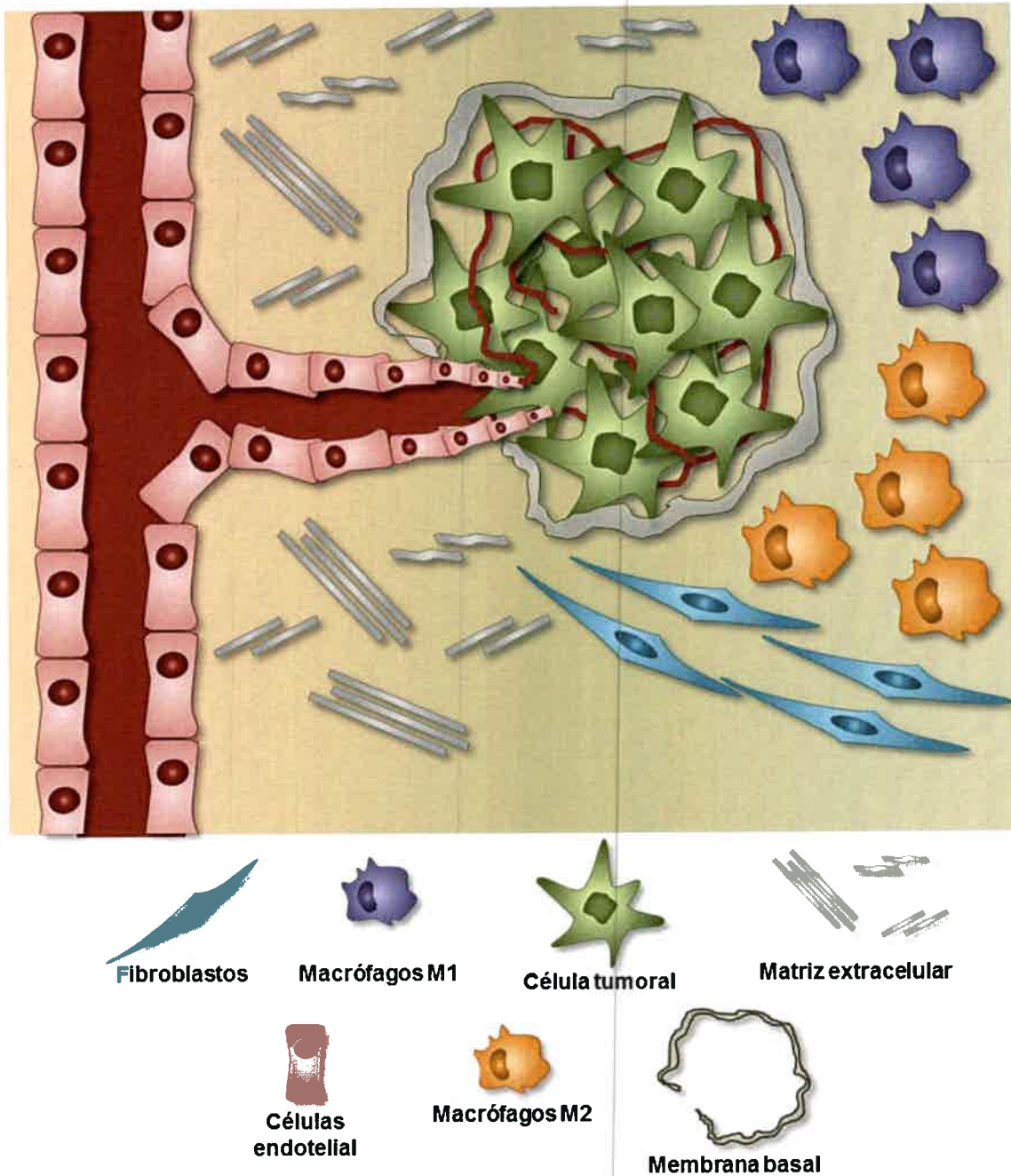
*El crecimiento de vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, proceso denominado angiogénesis, se desencadena en respuesta a la hipoxia. La expresión de las proteínas involucradas en este fenómeno, como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), es regulada por HIF. Imagen adaptada de Rahimi, 2012<sup>74</sup>.*

### 1.15. Microambiente tumoral

Las mutaciones genéticas en las células cancerígenas son el motor del desarrollo y progresión tumoral<sup>1</sup>. Sin embargo, estas células transformadas no pueden comandar la promoción de la enfermedad de forma independiente. Por ello, determinadas células que derivan de tejidos normales o médula ósea son reclutadas al sitio tumoral, constituyendo así lo que se conoce como microambiente tumoral (MAT)<sup>75</sup>. Estos contactos no sólo sostienen las células en forma mecánica sino que también juegan un importante rol en el metabolismo y la señalización. Así, podemos definir al microambiente tumoral como un tipo particular de ecosistema, en donde diferentes poblaciones celulares interactúan unas con otras cumpliendo un rol funcional definido, con el objetivo final de facilitar su propio crecimiento, la supervivencia, la invasión y la metástasis tumoral<sup>60</sup>.

El componente biótico central de este ecosistema son las células tumorales, que conforman el parénquima, y son quienes orquestan el reclutamiento y crecimiento de células no tumorales nativas o no nativas, que constituyen lo que se conoce como estroma tumoral: células endoteliales (CE), fibroblastos, células del sistema inmune tales como macrófagos, linfocitos, células natural killer, entre otras<sup>76</sup>. Las poblaciones estromales adiestradas son capaces de mantener procesos fisiológicos claves como la angiogénesis, la inflamación asociada a tumores y la supresión de la respuesta inmune antitumoral, promoviendo el crecimiento tumoral y la metástasis<sup>77-79</sup>. El estroma y el parénquima del MAT se mantienen juntos en un hábitat rico en matriz extracelular (MEC), que apoya la arquitectura y la integridad del tejido, así como también regula varias características bioquímicas<sup>60</sup> (Figura 15). Las interacciones célula-célula, célula-matriz y los factores secretados tanto por las células parenquimáticas como por las estromales median el diálogo autócrino y parácrino dentro del MAT.





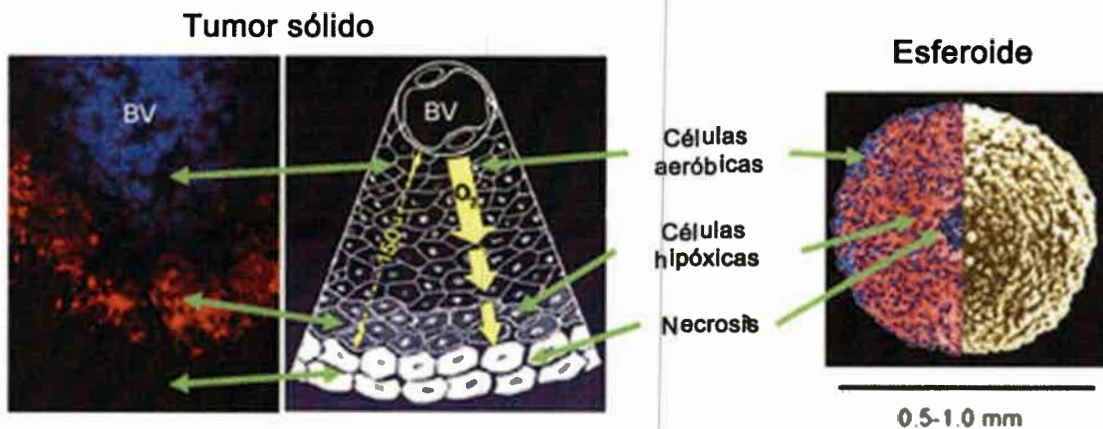
**Figura 15. Microambiente tumoral.**

*Tras el inicio de los tumores epiteliales, las interacciones recíprocas entre células epiteliales transformadas y estromales desempeñan un papel clave en la conmutación de un microambiente normal a uno que apoya el crecimiento tumoral y la diseminación. Imagen adaptada de Rumie Vittar y col, 2013<sup>60</sup>.*

### 1.16. Cultivos tridimensionales *in vitro* que imitan la arquitectura del microambiente tumoral

Los ensayos preclínicos de terapias antitumorales se han realizado tradicionalmente sobre plataformas de estudio en dos dimensiones (2D), es decir, monocapa de células, y/o sobre modelos animales. Los cultivos en 2D proporcionan información muy valiosa en relación a los mecanismos

celulares y moleculares que gobiernan la respuesta a la terapéutica aplicada. Sin embargo, las células en monocapa crecen restringidas fisiológicamente por la adhesión a un sustrato rígido y plano, lo que aumenta la superficie celular expuesta al medio de cultivo y reduce las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Estas limitaciones pueden obstaculizar la traslación de resultados experimentales a aplicaciones clínicas debido a que el crecimiento de tumores en ambientes disímiles revelan reacciones diferentes frente al mismo tratamiento<sup>80</sup>. Los modelos animales muestran las respuestas integradas que resultan de interacciones complejas entre los tejidos y órganos. Sin embargo, son muy costosos, consumen mucho tiempo y son éticamente controvertidos. Es por esto que surgió la demanda de modelos que recreen con precisión la complejidad de los tejidos humanos, como los modelos animales, pero que además conserven la capacidad de alto rendimiento y de nivel de estudio celular y molecular de los cultivos 2D. Es por ello que se han desarrollado sistemas de estudio en tres dimensiones (3D), denominados “esferoides”, que se basan fundamentalmente en la capacidad de las células a crecer bajo una estructura 3D que integre las señales mecánicas y químicas imitando así la arquitectura del microambiente tumoral en vivo (Figura 16)<sup>81,82</sup>.



**Figura 16.** Los esferoides imitan la arquitectura 3D de los tumores sólidos.

En los tumores sólidos, a medida que las células se alejan del vaso sanguíneo (BV, del inglés “blood vessel”, color azul por tinción con Hoechst 33342) comienzan a desarrollarse en un ambiente hipóxico (color rojo por tinción con pimonidazole). Las células aeróbicas son las que se encuentran más cerca de la vasculatura tumoral mientras que las más alejadas comienzan a morir por necrosis. Este mismo patrón de organización celular se observa dentro del esferoide. En este cultivo 3D se genera un gradiente de oxígeno al igual que en un tumor sólido, con la diferencia que las células necróticas anóxicas son las del centro de la estructura y la capa celular aeróbica se encuentra hacia la periferia oxigenada. La población de células hipóxicas se desarrolla entre las dos mencionadas anteriormente. Imagen adaptada de <http://www.bccrc.ca/dept/ic/radiation-biology-unit/kevin-bennewith><sup>83</sup>.

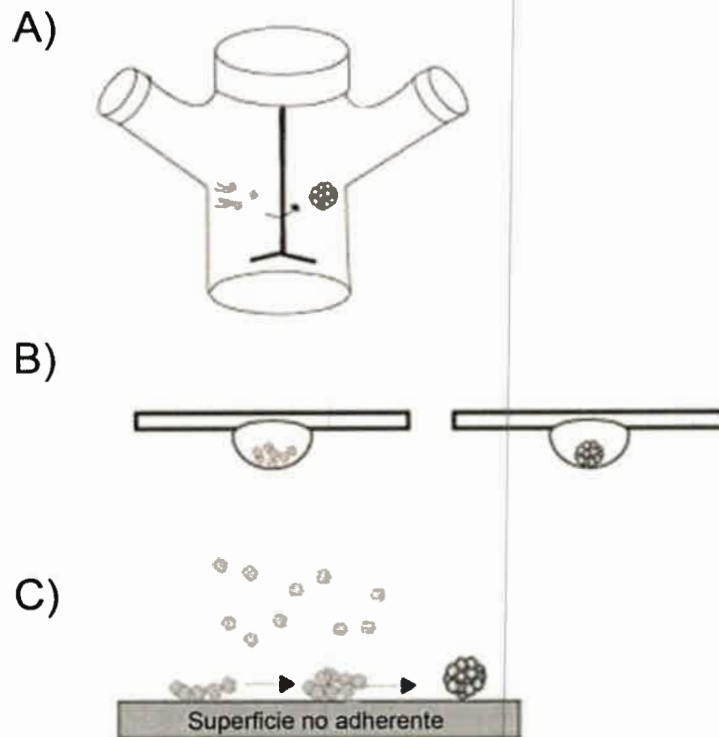
La formación de esferoides se basa en un único principio, que es permitir la agregación de células evitando al mismo tiempo su adhesividad al soporte de cultivo. Al igual que durante el desarrollo embrionario y la morfogénesis de tejidos, los complejos procesos de adhesión y diferenciación celular contribuyen fuertemente al establecimiento de estas estructuras celulares 3D<sup>84</sup>.

Los parámetros que determinan la eficiencia de formación de esferoides y la uniformidad de tamaño y forma incluyen el tipo celular, la densidad de siembra, composición del medio de cultivo, y si necesitan agitación o crecimiento estático<sup>85</sup>. Debido a que incluso células del mismo origen de tejido pueden formar esferoides mediante técnicas diferentes, debe ser probado empíricamente el método más efectivo para cada línea celular.

Los cultivos “spinner”, ampliamente utilizados, consisten en mantener un movimiento permanente de células evitando que se adhieran a la superficie de cultivo. En consecuencia, éstas se adhieren unas a otras formando esferoides. Si bien este método tiene la ventaja de que los cultivos pueden ser producidos a gran escala, las fuerzas mecánicas ejercidas pueden ejercer daño sobre las células. Por otro lado, este tipo de técnica requiere equipamiento especializado y los esferoides generados tienden a ser de diferente tamaño y forma, por lo que la estandarización resulta problemática<sup>86</sup> (Figura 17A).

La técnica de la gota colgante (HD, del inglés “hanging drop”) fue desarrollada inicialmente para el cultivo de cuerpos embrioides de células madre. El protocolo consiste en depositar gotas de 15-30  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular en la parte inferior de la tapa de una placa de cultivo. Cuando se invierte la tapa, las gotas se mantienen en su lugar gracias a la tensión superficial. La microgravedad en el medioambiente de cada gota concentra las células, que entonces forman esferoides individuales en la interfaz líquido-aire libre<sup>87</sup> (Figura 17B).

La técnica de cubierta líquida (LO, del inglés “liquid overlay”) consiste en generar artificialmente una superficie no adherente para las células. En general se utilizan placas de 96 pocillos, los cuales son recubiertos previamente con una película delgada de algún compuesto no adherente para las células, como la agarosa<sup>88</sup>, o polímeros hidrofóbicos como el polimetacrilato<sup>89</sup> (Figura 17C).



**Figura 17. Esquema representativo de diferentes técnicas experimentales para generar cultivos 3D.**

(A) Cultivos "spinner": Las células se mantienen en constante movimiento evitando así que se adhieran a la superficie de cultivo y favoreciendo la unión entre ellas. (B) Gota colgante (HD): La microgravedad en el medioambiente de cada gota invertida concentra las células y promueve la formación de la estructura 3D. (C) Cubierta líquida (LO): Las células crecen sobre una superficie no adherente, lo que fomenta el agregado de uniones célula-célula. Imagen adaptada de Achili y col, 2012<sup>90</sup>.

### 1.17. Secretoma del cáncer

Las nuevas herramientas de proteómica y espectrometría de masa tienen un rol central en el campo de investigación relacionado a proteínas, especialmente en los procesos de identificación, cuantificación y caracterización simultáneos de miles de proteínas que forman parte de muestras complejas<sup>91</sup>. El desarrollo de estas novedosas técnicas de alto rendimiento ("high throughput") generó nuevos enfoques de estudio en el campo de la investigación oncológica. De esta manera, surge una nueva rama de investigación conocida como "oncoproteómica", que aplica la proteómica a la oncología clínica y molecular. En un futuro cercano, se espera que la oncoproteómica juegue un rol fundamental en el diagnóstico y diseño terapéutico del cáncer, apuntando al desarrollo de la medicina personalizada<sup>92</sup>.

El análisis de secretoma ha sido recientemente introducido como un sub-campo de la oncoproteómica, orientado a la búsqueda de biomarcadores y dianas terapéuticas. El término "secretoma" fue introducido por Tjalsma y colaboradores con el fin de describir a las proteínas

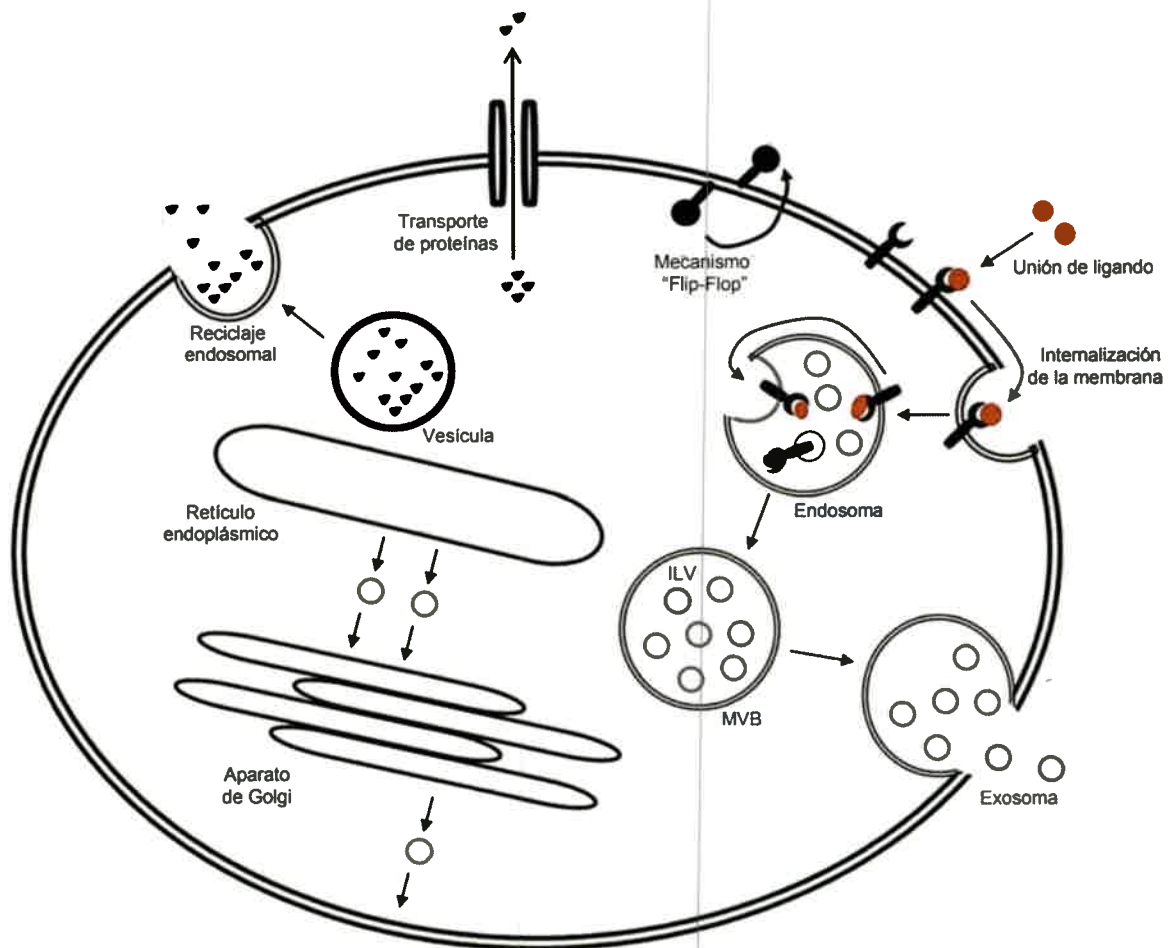
liberadas por una células, un tejido o un organismo a través de diferentes mecanismos de secreción<sup>93</sup>. El secretoma tumoral incluye tanto a los componentes de la matriz extracelular como a aquellas proteínas que son excretadas al medio circundante, por ejemplo, factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión, receptores y proteasas. La composición del secretoma en estudio representa la funcionalidad de un determinado tipo de células a un tiempo dado y caracteriza el diálogo autócrino y parácrino llevado a cabo en un determinado microambiente tumoral<sup>94</sup>.

Las proteínas secretadas representan un 10-15% del total de proteínas codificadas por el genoma humano. Estas proteínas que constituyen el secretoma participan en diversos procesos fisiológicos como la defensa inmunitaria, coagulación de la sangre, remodelamiento de la matriz extracelular y señalización celular, aunque también adquieren relevancia en procesos patológicos incluyendo angiogénesis, diferenciación, invasión y metástasis<sup>92</sup>.

En las células eucariotas, las proteínas solubles son secretadas al espacio extracelular a través de exocitosis de vesículas secretorias o mediante la liberación de gránulos de almacenamiento luego de la estimulación y activación de vías de señalización intracelulares. La vía de secreción clásica es utilizada sólo por aquellas proteínas sintetizadas como precursores que contienen un péptido señal N-terminal que dirige su traslocación hacia el retículo endoplásmico (RE). Estas proteínas son luego transportadas al aparato de Golgi y posteriormente a la superficie celular. Las proteínas son liberadas al espacio extracelular a través de la fusión de las vesículas derivadas del Golgi con la membrana plasmática<sup>95,96</sup> (Figura 18). Sin embargo, otras proteínas pueden ser transportadas a través de vías independientes del sistema RE/Golgi y que conforman las vías de secreción no clásica<sup>97</sup>. Las proteínas secretadas por estas vías no presentan el péptido señal requerido por el mecanismo clásico. Cuatro mecanismos no clásicos de secreción han sido descriptos (Figura 18):

- Reciclaje endosomal (“endosomal recycling”): Las proteínas son importadas dentro de una vesícula intracelular, la cual es un compartimiento endosomal. Esta vesícula endosomal se fusiona con la membrana plasmática y de esta forma se libera su contenido al espacio extracelular. La interleuquina-1b (IL-1b) es secretada a través de este mecanismo<sup>98</sup>
- Sistema de transporte celular: Las proteínas son liberadas al espacio extracelular mediante una traslocación directa a través de la membrana plasmática utilizando diferentes sistemas de transportes intracelulares. Los factores de crecimiento fibroblásticos 1 y 2 (FGF-1 y -2) son secretados a través de este mecanismo<sup>99,100</sup>.

- Mecanismo “Flip-flop”: Las proteínas se anclan a la membrana plasmática a través de una acilación dual del extremo N-terminal. De esta manera, son translocadas al espacio extracelular mediante un proceso de “flip-flop” (traslocación transmembranal)<sup>101</sup>.
- Exosomas: Los exosomas son vesículas que se originan por la internalización de receptores activados junto con las proteínas de andamiaje (“scaffolding proteins”) presentes, seguido por un tráfico a través de endosomas tempranos. Los endosomas tempranos se encuentran cargados con proteínas ubiquitiniladas. Mediante el reconocimiento por ESCRT (Complejo de Clasificación Endosomal requerido para el transporte), se forman vesículas intraluminales (ILVs) que, a su vez, se convierten en cuerpos multivesiculares (MVBs). Algunos se degradan en los lisosomas, aunque la fusión de los MVBs supervivientes con la membrana plasmática provoca la liberación de los exosomas en el espacio extracelular. Los exosomas contienen una composición compleja de moléculas (incluyendo proteínas, lípidos, microARN y ARNm). Los exosomas juegan un papel clave en la comunicación célula-célula mediante la fusión con una célula receptora. Pueden permanecer de forma estable asociados con la membrana plasmática o ser internalizados a través de una vía endocítica, liberando su contenido. La propiedad biológica de la célula diana puede entonces ser alterada a nivel genético (ARN exosomal), epigenético (miARN exosomal) o proteico<sup>102</sup>.



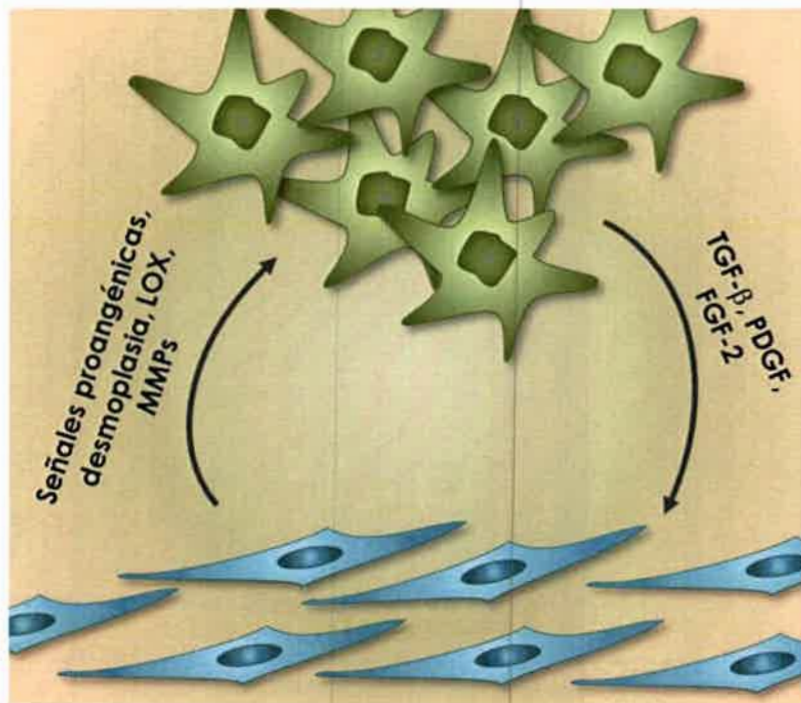
**Figura 18. Vías de secreción clásicas y no clásicas de proteínas**

La vía de secreción clásica requiere de la presencia del péptido señal en las proteínas a ser exportadas e involucra el transporte mediado por Reticulo Endoplásmico/Golgi. Por otro lado, las vías de secreción no clásicas son independientes de la presencia del péptido señal e incluyen los siguientes mecanismos: "Reciclaje endosomal", "Sistemas de transporte celular", "Mecanismo Flip-Flop" y "Exosomas". Imagen adaptada de Karagiannis y col, 2010<sup>92</sup>.

### 1.18. Microambiente tumoral, cáncer colorrectal y fibroblastos asociados al tumor

El hecho de que el CCR metastásico siga siendo incurable llevó a muchos investigadores a realizar estudios más profundos sobre los factores que determinan la progresión del cáncer. En los últimos años comenzó a tomar relevancia la idea de que la evolución del tumor primario hacia la adquisición de un fenotipo maligno/invasivo no depende únicamente de la estimulación autócrina de las células neoplásicas, sino que además es influenciada por la presencia de poblaciones estromales dentro de su microambiente<sup>103,104</sup>. Teniendo en cuenta el éxito limitado que han tenido las terapéuticas que atacan sólo al tumor, ha surgido la necesidad de la comprensión del microambiente tumoral y su contribución precisa en el proceso de carcinogénesis<sup>105</sup>.

Dentro del microambiente, la población fibroblástica es la mayoritaria y la principal responsable de la síntesis y remodelamiento de la matriz extracelular, a través de la expresión de las proteínas que la componen (colágeno, fibronectina) y de las enzimas que realizan modificaciones postraduccionales sobre ellas (metaloproteinasas de matriz, MMPs). La activación de los fibroblastos es iniciada por factores secretados por el tumor bajo el estímulo hipóxico; en respuesta a ellos, los fibroblastos adoptan un fenotipo miofibroblástico pro-inflamatorio, así denominados “fibroblastos asociados al cáncer” (CAFs, del inglés “cancer associated fibroblasts”)<sup>106</sup>. De esta forma, se establece un diálogo en dos vías entre los fibroblastos estromales y el parénquima tumoral. Por un lado, a través de la “vía eferente”, las células tumorales inducen la activación y proliferación de las células fibroblásticas, eventos mediados por los factores TGF- $\beta$ , PDGF, FGF-2, entre otros; por el otro, a través de la “vía aferente”, los fibroblastos activados contribuyen a la progresión tumoral a través de la secreción de factores solubles que influyen sobre el desarrollo del fenotipo maligno/invasivo<sup>104</sup> (Figura 19).



**Figura 19. Diálogo tumor-fibroblasto**

*Dentro del microambiente tumoral, se establece un diálogo en dos vías entre los fibroblastos estromales y el parénquima tumoral; ambas poblaciones obtienen beneficios proliferativos y de supervivencia a través de esta asociación.*

Recientemente en nuestro laboratorio hemos realizado un revisión sobre la participación del estroma en el desarrollo y evolución del microambiente tumoral, focalizándonos principalmente en la respuesta molecular a la intervención fotodinámica<sup>60</sup>. Se concluyó que **resulta sumamente**



necesario caracterizar cómo el microambiente tumoral hipóxico, agravado en muchos casos por la intervención fotodinámica, colabora de manera directa en la promoción y evolución de las células tumorales hacia un fenotipo pro-tumoral. Conociendo más sobre el diálogo molecular establecido entre la célula tumoral y su entorno, resultaría posible la intervención el MAT utilizando a la TFD como estrategia terapéutica.

## Referencias

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G. & Lollini, P. 2011: the immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunol Immunother* **60**, 316–326 (2011).
3. Organización Mundial de la Salud. *Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles 2010*. (2011).
4. Instituto Nacional del Cáncer/Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Análisis de la situación del cáncer en Argentina. [http://www.msal.gov.ar/inc/equipos\\_analisis.php](http://www.msal.gov.ar/inc/equipos_analisis.php) (2012).
5. World Health Organization. Globocan. (2012).
6. Brenner, H., Kloor, M. & Pox, C. in *Lancet* 1490–1502 (2014).
7. Lynch, H. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**, 919–932 (2003).
8. Fearon, E. Molecular genetics of colorectal cancer. *2 Annu Rev Pathol* **6**, 479–507 (2011).
9. Chung, T. P. & Fleshman, J. W. The Genetics of Sporadic Colon Cancer. *Semin. Colon Rectal Surg.* **15**, 128–135 (2004).
10. Mundade, R., Imperiale, T., Prabhu, L., Loehrer, P. & Lu, T. Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience* **1**, 400–406 (2014).
11. Calvert, P. & Frucht, H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* **137**, 603–612 (2002).
12. Rajagopalan, H., Nowak, M., Vogelstein, B. & Lengauer, C. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* **3**, 695–701 (2003).
13. Instituto Nacional del Cáncer/Ministerio de Salud de la Nación Argentina. *Cáncer colorrectal en la Argentina: Organización, cobertura y calidad de las acciones de prevención y control*. (2011).
14. Weis, S. M. & Cheresch, D. A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* **17**, 1359–1370 (2011).
15. Dukes, C. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol.* **35**, 323–332 (1932).
16. Fisher, E., Sass, R., Palekar, A., Fisher, B. & Wolmark, N. Dukes' classification revisited. Findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects (Protocol R-01). *Cancer.* **64**, 2354–2360. (1989).

17. NIH. Drugs Approved for Colon and Rectal Cancer. (2015). at <<http://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/colorectal#dal1>>
18. Sauer, R. *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol.* **30**, 1926–1933 (2012).
19. Pai, S. & Fuloria, J. Novel therapeutic agents in the treatment of metastatic colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* **8**, 99–104. (2016).
20. Agostinis, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin* **61**, 250–281 (2011).
21. St-Pierre, J., Buckingham, J., Roebuck, S. & Brand, M. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* **277**, 44784–44790 (2002).
22. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* **82**, 47–95 (2002).
23. Allison, R. & Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* **46**, 24–29 (2013).
24. Milla Sanabria, L. *et al.* Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* **1835**, 36–45 (2013).
25. Castano, A., Mroz, P. & Hamblin, M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* **6**, 535–545 (2006).
26. Donnelly, R., McCarron, P. & Woolfson, A. Derivatives of 5-aminolevulinic Acid for photodynamic therapy. *Perspect Med. Chem* **1**, 49–63 (2008).
27. DeLaney, T. *et al.* Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* **25**, 445–457 (1993).
28. Barr, H., Krasner, N., Boulos, P., Chatlani, P. & Bown, S. Photodynamic therapy for colorectal cancer: a quantitative pilot study. *Br J Surg* **77**, 93–96 (1990).
29. Kashtan, H., Haddad, R., Yossiphov, Y., Bar-On, S. & Skornick, Y. Photodynamic therapy of colorectal cancer using a new light source: from in vitro studies to a patient treatment. *Dis Colon Rectum.* **39**, 379–383 (1996).
30. Bhuvanewari, R. *et al.* Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol Cancer* **7**, 56 (2008).
31. Mitra, S. & Foster, T. Photochemical oxygen consumption sensitized by a porphyrin phosphorescent probe in two model systems. *Biophys J* **78**, 2597–2605 (2000).

32. Bertout, J. a, Patel, S. a & Simon, M. C. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 967–75 (2008).
33. Wilson, W. R. & Hay, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**, 393–410 (2011).
34. Harris, A. L. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38–47 (2002).
35. Harada, H. in *Targets Gene Ther.* 185–200 (2011).
36. Carmeliet, P. & Jain, R. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
37. Rohwer, N. & Cramer, T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat* **14**, 191–201 (2011).
38. Poon, E., Harris, A. L. & Ashcroft, M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev. Mol. Med.* **11**, e26 (2009).
39. Richard, D., Berra, E. & Pouyssegur, J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **275**, 26765–26771 (2000).
40. Wenger, R. H., Stiehl, D. P. & Camenisch, G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE* **306**, re12 (2005).
41. Semenza, G. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634 (2010).
42. Huang, L. Carrot and stick: HIF- $\alpha$  engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ.* **15**, 672–677 (2008).
43. Huang, L. Biochemistry. How HIF-1 $\alpha$  handles stress. *Science.* **339**, 1285–1286 (2013).
44. Yoo, Y., Christensen, J. & Huang, L. HIF-1 $\alpha$  confers aggressive malignant traits on human tumor cells independent of its canonical transcriptional function. *Cancer Res.* **71**, 1244–1252 (2011).
45. Dang, C. V, Kim, J., Gao, P. & Yustein, J. The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature* **8**, 51–56 (2008).
46. Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells.* **29**, 435–442 (2010).
47. Epstein, A. *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* **107**, 43–54 (2001).
48. Maxwell, P. *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **339**, 271–275 (1999).

49. Bell, E. *et al.* The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol.* **177**, 1029–1036 (2007).
50. Semenza, G. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721–732 (2003).
51. Poon, E., Harris, A. L. & Ashcroft, M. Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. *Expert Rev Mol Med* **11**, e26 (2009).
52. Kizaka-Kondoh, S., Tanaka, S., Harada, H. & Hiraoka, M. The HIF-1-active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 623–632 (2009).
53. Déry, M., Michaud, M. & Richard, D. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* **37**, 535–540 (2005).
54. Galanis, A. *et al.* Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett* **266**, 12–20 (2008).
55. Van Uden, P., Kenneth, N. & Rocha, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem J.* **412**, 477–484 (2008).
56. Rius, J. *et al.* NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature.* **453**, 807–811 (2008).
57. Tacchini, L., De Ponti, C., Matteucci, E., Follis, R. & Desiderio, M. Hepatocyte growth factor-activated NF-kappaB regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* **25**, 2089–2100 (2004).
58. Belaiba, R. *et al.* Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* **18**, 4691–4697 (2007).
59. Bonello, S. *et al.* Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arter. Thromb Vasc Biol.* **27**, 755–761 (2007).
60. Rumie Vittar, N. *et al.* Ecological photodynamic therapy: new trend to disrupt the intricate networks within tumor ecosystem. *Biochim Biophys Acta.* **1835**, 86–89 (2013).
61. Mitra, S. *et al.* Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cancer Ther* **5**, 3268–3274 (2006).
62. Koukourakis, M. I. *et al.* Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a ) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* **61**, 1830–1832 (2001).
63. Ferrario, A. *et al.* Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* **4066–4069** (2000).
64. Jiang, Y. *et al.* Expression and significance of PTEN, hypoxia-inducible factor-1 alpha in colorectal adenoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* **9**, 491–494 (2003).

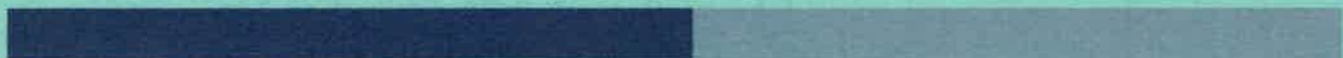
65. Simiantonaki, N., Taxeidis, M., Jayasinghe, C., Kurzik-Dumke, U. & Kirkpatrick, C. Hypoxia-inducible factor 1 alpha expression increases during colorectal carcinogenesis and tumor progression. *BMC Cancer*. **8**, 320 (2008).
66. Greijer, A. *et al.* Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. *Virchows Arch*. **452**, 535–544 (2008).
67. Fan, L., Dong, W., Jiang, C., Qian, Q. & Yu, Q. Role of Hypoxia-inducible factor-1 alpha and Survivin in colorectal carcinoma progression. *Int J Color. Dis*. **23**, 1057–1064 (2008).
68. Baltaziak, M. *et al.* The relationships between hypoxia-dependent markers: HIF-1alpha, EPO and EPOR in colorectal cancer. *Folia Histochem Cytobiol*. **51**, 320–325 (2013).
69. Liao, D. & Johnson, R. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **26**, 281–290 (2007).
70. Weis, S. & Cheresh, D. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. **17**, 1359–1370 (2011).
71. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936 (2005).
72. Bergers, G. & Benjamin, L. E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**, 401–10 (2003).
73. Herbert, S. P. & Stainier, D. Y. R. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 551–564 (2011).
74. Rahimi, N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther*. **11**, 538–548 (2012).
75. Hanahan, D. & Coussens, L. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. **21**, 309–322 (2012).
76. Peddareddigari, V. G., Wang, D. & Dubois, R. N. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron*. **3**, 149–66 (2010).
77. Allen, M. & Jones, J. L. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*. **223**, 162–176 (2011).
78. Wang, D., Dubois, R. N. & Richmond, A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Curr Opin Pharmacol*. **9**, 688–696 (2009).
79. Erreni, M., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumor-associated macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer. *Cancer Microenviron*. **4**, 141–154 (2011).
80. Bates, R. C., Edwards, N. S. & Yates, J. D. Spheroids and cell survival. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. **36**, 61–74 (2000).
81. Alemany-Ribes, M. *et al.* Why Not Introducing the Third Dimension in Photodynamic Therapy Research? *J Anal Bioanal Tech* En prensa (2013).

82. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. a. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* **4**, 309–324 (2009).
83. BC Cancer Agency. Kevin L. Bennewith. (2012).
84. Lin, R. Z., Chou, L. F., Chien, C. C. M. & Chang, H. Y. Dynamic analysis of hepatoma spheroid formation: roles of E-cadherin and  $\beta$ 1-integrin. *Cell Tissue Res.* **324**, 411–422 (2006).
85. Hamilton, G., Westmorel, C. & George, A. Effects of medium composition on the morphology and function of rat hepatocytes cultured as spheroids and monolayers. *Vitr. Cell Dev Biol Anim.* **37**, 656–667. (2001).
86. Sakai, Y., Naruse, K., Nagashima, I., Muto, T. & Suzuki, M. Large-scale preparation and function of porcine hepatocyte spheroids. *Int J Artif Organs.* **19**, 294–301 (1996).
87. Lin, R. Z. & Chang, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* **3**, 1172–1184 (2008).
88. Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O. & Ladman, A. J. A Simplified Method for Production and Growth of Multicellular Tumor Spheroids. *Cancer Res.* **37**, 3639–3643 (1977).
89. Landry, J., Bernier, D., Ouellet, C., Goyette, R. & Marceau, N. Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: Histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities. *J. Cell Biol.* **101**, 914–923 (1985).
90. Achilli, T., Meyer, J. & Morgan, J. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther.* **12**, 1347–1360 (2012).
91. Jain, K. Innovations, challenges and future prospects of oncoproteomics. *Mol Oncol.* **2**, 153–160 (2008).
92. Karagiannis, G., Pavlou, M. & Diamandis, E. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol.* **4**, 496–510 (2010).
93. Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J., Bron, S. & van Dijk, J. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**, 515–547 (2000).
94. Kulasingam, V. & Diamandis, E. Tissue culture-based breast cancer biomarker discovery platform. *Int J Cancer.* **123**, 2007–2012 (2008).
95. Walter, P., Gilmore, R. & Blobel, G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell.* **38**, 5–8 (1984).
96. Mellman, I. & Warren, G. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell.* **100**, 99–112 (2000).
97. Nickel, W. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem.* **270**, 2109–2119 (2003).

98. Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. & Sitia, R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 1990 May;9(5)1503-10 **9**, 1503–1510 (1990).
99. Mignatti, P., Morimoto, T. & Rifkin, D. Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol.* **151**, 81–93 (1992).
100. Trudel, C., Faure-Desire, V., Florkiewicz, R. & Baird, A. Translocation of FGF2 to the cell surface without release into conditioned media. *J Cell Physiol.* **185**, 260–280 (2000).
101. Denny, P., Gokool, S., Russell, D., Field, M. & Smith, D. Acylation-dependent, protein export in Leishmania. *J Biol Chem.* **275**, 11017–11025 (2000).
102. Simpson, R., Jensen, S. & Lim, J. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics.* **8**, 4083–4099 (2008).
103. Giannoni, E., Parri, M. & Chiarugi, P. EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy. *Antioxid Redox Signal.* **16**, 1248–1263 (2012).
104. Cirri, P. & Chiarugi, P. Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* **31**, 195–208 (2012).
105. Peddareddigari, V. G., Wang, D. & Dubois, R. N. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* **3**, 149–66 (2010).
106. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblast in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 392–401 (2006).



**Hipótesis**  
**Objetivos**



## 2. Hipótesis

El microambiente tumoral promueve vías de supervivencia mediadas por HIF-1 $\alpha$  en respuesta a la terapia fotodinámica, por ello el silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  optimiza este tratamiento antitumoral.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo general

Estudiar la participación del factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) en los protocolos de terapia fotodinámica y su relación con señales de supervivencia en el microambiente tumoral.

### 3.2. Objetivos específicos

- Estudiar el efecto de Terapia Fotodinámica sobre la expresión de HIF en células de cáncer de colon humano con diferente grado de malignidad.
- Estudiar los detonantes de la expresión, activación, y/o estabilidad de HIF.
- Examinar si el silenciamiento de HIF optimiza el efecto de la Terapia Fotodinámica.
- Determinar el impacto de HIF inducido por Terapia Fotodinámica sobre la activación del proceso de angiogénesis.
- Investigar el impacto de la activación de HIF mediada por TFD sobre el rol de células tumorales de cáncer colorrectal y fibroblastos, protagonistas mayoritarios del microambiente tumoral, en eventos involucrados en angiogénesis.

# Materialles y Métodos



## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Cultivos celulares

Como modelo de carcinoma colorrectal se utilizaron las líneas celulares SW480, indiferenciada<sup>1</sup>, y la línea Caco-2, con mayor grado de diferenciación y morfología epitelial<sup>1,2</sup>. Como modelo de fibroblastos, se utilizó la línea MRC-5, derivada de pulmón de paciente sano. La línea HMEC se utilizó como modelo representativo de microvasculatura<sup>3</sup>. Se cultivaron y almacenaron de acuerdo a las recomendaciones detalladas en el ATCC (American Type Culture Collection)<sup>4,5</sup>. Los medios de cultivos utilizados fueron:

- Medio de crecimiento proliferativo: Medio mínimo DMEM (Gibco) suplementado con antibiótico-antimicótico (Gibco) al 1% y suero fetal bovino (SFB, Internegocios) al 10%.
- Medio de crecimiento no proliferativo: Medio mínimo DMEM (Gibco), suplementado con antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco) y suero fetal bovino (Internegocios) al 5%.
- Medio mínimo (para incubación de drogas): Medio mínimo DMEM (Gibco), suplementado con antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco).
- Medio de selección (para seleccionar clones transfectados establemente): Medio de crecimiento proliferativo suplementado con geneticina (2 mg/ml) o puromicina (2 µg/ml), según correspondiera.
- Medio de congelamiento celular: Suero fetal bovino al 90% (Internegocios) y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) al 10%.

### 4.2. Drogas

El inhibidor de MEK1/2 (U0126), inhibidor de ROS: N-acetilcisteína (NAC), el derivado metilado del ácido 5-aminolevulínico (Me-ALA), la puromicina y el CoCl<sub>2</sub> (mimético de hipoxia) fueron adquiridos a Sigma. La geneticina (Gibco) fue adquirida a Life Technologies. Las drogas fueron resuspendidas y almacenadas según instrucciones del fabricante. Las diluciones de trabajo se obtuvieron diluyendo el stock inicial en medio mínimo.

### 4.3. Plásmidos

Los plásmidos utilizados se describen a continuación:

- pEF/myc/cyto5HRE-EGFP (pHRE-GFP): Codifica para el reportero de HIF denominado HRE-GFP. Este reportero está constituido por el gen de la proteína GFP bajo el control de un promotor que contiene 5 copias de 35 pb de la región HRE del promotor de VEGF<sup>6</sup>. Confiere

resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y resistencia a neomicina (geneticina) para su selección en eucariotas. Fue cedido por el Dr. Foster (Universidad de Rochester, EE UU)<sup>7</sup>.

- pZsGreen1-N1 (pZ-Green): Codifica para la proteína fluorescente verde salvaje de *Zoanthus* sp. (ZsGreen1), optimizada en codones para su expresión en humanos, con expresión constitutiva (promotor de citomegalovirus). Confiere resistencia a kanamicina para su selección en bacterias y resistencia a neomicina (geneticina) para su selección en eucariotas. Fue adquirido de Clontech.

- pLKO.1-shRNA-HIF-1 $\alpha$ -1: Codifica para el ARN de interferencia contra el ARNm de la subunidad HIF-1 $\alpha$ . Confiere resistencia a ampicilina para su selección en bacterias y resistencia a puromicina para su selección en eucariotas y es utilizado en vectores lentivirales. Fue cedido por el Dr. Eric Metzen (China)<sup>8</sup>.

#### 4.4. Generación de bacterias DH5 $\alpha$ competentes

Se inocularon 5 ml de medio LB (extracto de levadura 5 g/l, triptona 10 g/l, NaCl 5g/l) libre de antibiótico con una colonia de células de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  cedida por la Dra. Tania Taurián (UNRC). Se incubó el cultivo toda la noche a 37°C bajo agitación constante en agitador orbital. Al día siguiente, se inocularon 20 ml de medio LB con 0.5 ml del cultivo anteriormente mencionado, y se incubó a 37°C bajo agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de aproximadamente 0,6. Posteriormente, el cultivo se transfirió a un tubo de 50 ml para centrifuga preenfriado y se incubó inmediatamente en hielo 10 min. La suspensión se centrifugó a 6000 rpm por 6 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el cultivo suavemente en 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 100 mM frío y se incubó en hielo por 10 min. La suspensión se centrifugó nuevamente y el precipitado se resuspendió en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. La suspensión obtenida se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a 4°C y el precipitado obtenido que contenía las bacterias competentes se resuspendió nuevamente en 1,7 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío y 0,3 ml de glicerol. Las bacterias competentes se fraccionaron en crioviales estériles (100  $\mu$ l/tubo) y se congelaron a -80°C hasta su uso<sup>9</sup>.

#### 4.5. Transformación de bacterias competentes

Se preparó la mezcla de transformación con 100  $\mu$ l de bacterias competentes adicionadas con 2-5  $\mu$ l de plásmido resuspendido en H<sub>2</sub>O estéril (aproximadamente 150-500 ng de ADN). La mezcla se incubó en hielo 30 min, seguidos de 1.5 min a 42°C y luego 2 min en hielo. Posteriormente, la mezcla transformada se colocó en tubos con 900  $\mu$ l de medio LB y se incubó durante 1 h a 37°C bajo

agitación. Transcurrido ese tiempo se centrifugó la mezcla a 12000 rpm durante 1 min y se resuspendió el sobrenadante obtenido en 300  $\mu$ l de LB. A continuación, las bacterias se sembraron en placas con medio LB suplementado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (LB<sub>AMP</sub>) para pHRE-GFP y pLKO.1-shRNA-HIF-1 $\alpha$ -1 y con 100  $\mu$ g/ml de kanamicina (LB<sub>KAN</sub>) para pZ-Green para seleccionar las colonias que incorporaron el plásmido. Dichas placas se incubaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente las placas con aparición de colonias (bacterias transformadas) fueron repicadas y aisladas en placas con medio LB<sub>AMP</sub> o LB<sub>KAN</sub> según correspondiera<sup>9</sup>.

#### 4.6. Amplificación y purificación de los plásmidos

Se inocularon 5 ml de medio LB<sub>AMP</sub> o LB<sub>KAN</sub> según correspondiera con una colonia de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas. Se incubó el cultivo a 37°C bajo agitación constante hasta crecimiento saturado. La extracción de los plásmidos se realizó utilizando QIAGEN Plasmid Maxi Kit, siguiendo el protocolo provisto por el proveedor. La concentración del DNA plasmídico se determinó utilizando Qubit® Fluorometer (Invitrogen), según indicaciones del fabricante.

#### 4.7. Generación de líneas celulares estables

##### 4.7.1. SW480 HRE y SW480 G – Transfección estable

Antes de generar las líneas celulares estables se determinó las dosis de selección de geneticina óptima para la línea celular SW480. La dosis de selección se definió como el doble de la mínima concentración de antibiótico necesaria para eliminar el 100% de las células de tipo salvaje (no transfectadas), y fue de 2 mg/ml. Los clones celulares SW480-HRE y SW480-G se generaron por transfección utilizando el reactivo comercial FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche) con 4  $\mu$ g cada 100.000 células del plásmido pHRE-GFP y pZ-Green, respectivamente, según instrucciones de fabricante. Después de 72 h post-transfección, se agregó medio de selección, el cual fue renovado cada 3 días y al cabo de 21 días, se aislaron clones individuales utilizando el método del “anillo de clonación”<sup>10</sup>. Los niveles de expresión constitutiva de GFP en el clon SW480-G e inducible por CoCl<sub>2</sub> en el clon SW480-HRE se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia directa y/o invertida.

##### 4.7.2. SW480 HRE-shHIF – Infección lentiviral

Antes de generar las líneas celulares estables se determinó las dosis de selección de puromicina óptima para la línea celular SW480-HRE. La dosis de selección se definió

como el doble de la mínima concentración de antibiótico necesaria para eliminar el 100% de las células de tipo salvaje (no transfectadas), y fue de 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Para la producción de las partículas lentivirales, las células HEK 293 crecidas en placas de 10 cm hasta 80-90% de confluencia fueron transfectadas con los siguientes tres plásmidos usando el reactivo PEI, según instrucciones del fabricante: a) 8  $\mu\text{g}$  de pCMV $\Delta$ 8.91 (codifican para Gag/Pol de HIV-1), b) 4  $\mu\text{g}$  de pVSV-G (codifica la glicoproteína G del Virus de la estomatitis vesicular), y c) 8  $\mu\text{g}$  de pLKO.1-shRNA-HIF-1 $\alpha$ -1. A las 24 horas post-transfección los sobrenadantes que contenían las partículas lentivirales fueron cosechadas y filtradas a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Posteriormente, las partículas fueron centrifugadas a 12000 rpm por 2 h y luego inoculadas en las células SW480-HRE. Después de 72 h post-infección, se agregó medio de selección, el cual fue renovado cada 3 días y al cabo de 21 días, se aislaron clones individuales utilizando el método del “anillo de clonación”<sup>10</sup>.

#### 4.8. Generación de esferoides

Para la generación de esferoides se utilizaron 2 métodos: “gota colgante” (HD, de inglés “hanging drop”) y “cubierta líquida” (LO, del inglés “liquid overlay”), partiendo de 1000, 5000, 10000 y 20000 células por cada esferoide. Para la técnica HD, se utilizaron como soporte placas de Petri de 100 mm de diámetro. Las células fueron resuspendidas en medio de crecimiento no proliferativo según la concentración deseada y sembradas en forma de gotas de 30  $\mu\text{l}$  en la tapa de la placa. La base de la placa se llenó con 20 ml de PBS para evitar la evaporación de líquido de las gotas<sup>11</sup>. Para la técnica LO, se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo redondo previamente recubiertos con agarosa al 1%. Las células se sembraron en cada pocillo en 100  $\mu\text{l}$  de medio de crecimiento no proliferativo según la concentración deseada<sup>12</sup>. En ambos casos, los cultivos se incubaron en estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 3 días para permitir la formación de los esferoides. Se tomaron fotografías en campo claro utilizando un microscopio directo para HD y un microscopio invertido para LO. Las mediciones del diámetro de los esferoides se realizó con el software libre ImageJ 1.42q. Finalmente, se seleccionó la técnica LO para continuar con los estudios sobre esferoides homotípicos (compuestos sólo por células tumorales) y heterotípicos (compuestos por células tumorales y fibroblastos en diferentes proporciones: 5,5, 10, 15, 25, 50% de fibroblastos).

#### 4.9. Cuantificación de la actividad del reportero de HIF por citometría de flujo

Los esferoides generados a partir del clon SW480 HRE luego del tratamiento correspondiente fueron disgregados con tripsina y luego resuspendidos en PBS. La cuantificación de GFP fue realizada por citometría de flujo (Epics XL Flow Cytometer)<sup>13</sup> sobre la población de células vivas y los histogramas se evaluaron mediante el software FlowJo 7.6.2.

#### 4.10. Identificación de zonas hipóxicas (GFP +) por microscopía confocal

Para determinar la localización de las zonas hipóxicas dentro de los esferoides, se utilizó el protocolo descrito por Indovina, Collini, Chiricob & Santini, 2007<sup>14</sup>. Las zonas GFP + de esferoides de 20000 células del clon SW480-HRE fueron analizados mediante microscopía confocal utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000 (Spectral) (CIQUIBIC-UNC-CONICET). Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33342 (Sigma). Se obtuvieron imágenes transversales de secciones en el eje z del esferoide cada 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.11. Incorporación de protoporfirina IX (PpIX) en cultivos 3D

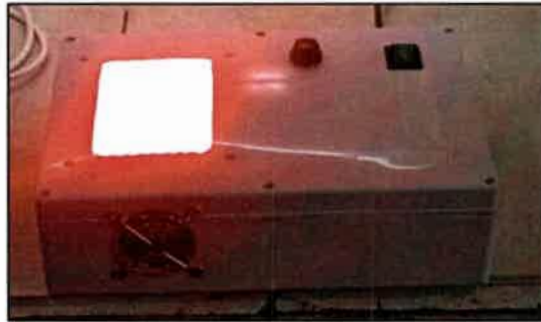
Para determinar la incorporación de PpIX en los cultivos 3D se siguió el protocolo descrito por Bigelow, Mitra, Knuechel, & Foster, 2001<sup>15</sup>. Los esferoides de 20000 células de SW480 G fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 4 y 24 h. La incorporación de PpIX se evaluó mediante microscopía confocal ( $\lambda_{\text{exc}}$ : 514 nm;  $\lambda_{\text{em}}$ : 585 nm) utilizando el microscopio confocal Olympus FV1000 (Spectral) (CIQUIBIC-UNC-CONICET). Las células GFP + fueron consideradas viables. Se realizó un gráfico del perfil de intensidad de fluorescencia de PpIX a lo largo de la dirección horizontal de la sección media del eje z del esferoide (Plot profile), utilizando el software libre ImageJ 1.42q.

#### 4.12. Tratamiento fotodinámico

La intervención fotodinámica de las células tumorales se realizó siguiendo el protocolo descrito por Lamberti, Rumie Vittar, De Carvalho da Silva, Ferreira, & Rivarola, 2013<sup>16</sup>. Los esferoides de 3 días fueron lavados con PBS e incubados con 0,3 mM de la prodroga Me-ALA. Luego de 24 h de incubación, fueron irradiados con una dosis de luz letal a temperatura ambiente (0,7 J/cm<sup>2</sup>). Una vez concluida la irradiación, se removió el medio mínimo con la droga y se adicionó medio de crecimiento proliferativo, manteniendo las células en estufa gaseada. Para realizar los tratamientos fotodinámicos, los esferoides fueron irradiados con un equipo dotado de un sistema de



iluminación de multiLEDs (luz coherente), con una longitud de onda de 636 nm. La intensidad de irradiación de la lámpara fue de  $0,89 \text{ mW/cm}^2$  (Figura 20).



*Figura 20. Equipo de irradiación.*

*Sistema de iluminación de multiLEDs (luz coherente), con una longitud de onda de 636 nm e intensidad de irradiación de  $0,89 \text{ mW/cm}^2$ .*

### 4.13. Evaluación de la viabilidad celular

#### 4.13.1. MTT

La viabilidad de las células se determinó luego del tratamiento fotodinámico utilizando el ensayo colorimétrico de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium (MTT)<sup>17</sup>. El MTT puede ser reducido por deshidrogenasas mitocondriales presentes en células vivas, formando un compuesto coloreado insoluble (formazán). Después de los tratamientos realizados sobre las células crecidas en monocapa o como esferoides, se agregó la solución de MTT 5 mg/ml en PBS en una relación 1/10 del volumen final durante el tiempo requerido según el experimento (3 h para cultivos 2D, 4 h para cultivos 3D). Los cristales formados se disolvieron con DMSO. Luego, la absorbancia se midió utilizando un lector de ELISA (Multiskan, Thermo) a una longitud de onda de 540 nm y se consideró directamente proporcional a la cantidad de células viables.

#### 4.13.2. Ensayo de exclusión del colorante vital azul tripán

El azul tripán (azul diamina, azul niágara, azul vital) es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas. Los esferoides fueron disgregados con tripsina y diluidos 1:1 con azul tripán. Se sembró una alícuota de la dilución en la cámara de Neubauer y se tomaron microfotografía de campo claro y fluorescencia verde. De esta forma, se cuantificaron la cantidad de células tumorales viables GFP + y fibroblastos viables GFP -. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células GFP + viables en relación al recuento realizado en esferoides homotípicos sin tratar (100% GFP +)<sup>18</sup>.

#### 4.14. Medición del estado oxidativo de los esferoides

Inmediatamente después del tratamiento fotodinámico descrito en la sección 4.12, los esferoides de SW480 fueron lavados con PBS e incubados con 7  $\mu$ M de diacetato de 2'7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA, Sigma) en medio mínimo sin rojo fenol durante 30 minutos a 37°C. Las células son permeables al DCFH-DA y éste, en presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), se convierte en 2'7'-diclorofluoresceína (DCF), producto que no puede atravesar la membrana celular y que fluoresce a 530 nm, luego de una excitación a 488 nm<sup>19</sup>. La fluorescencia de las imágenes obtenidas por microscopía invertida se cuantificó utilizando el software libre ImageJ 1.42q.

#### 4.15. Western Blot

Para la obtención de muestras para el análisis de expresión de proteínas, se preparó un extracto celular de cada tratamiento realizado utilizando buffer RIPA (Tris HCl 25 mM, ClNa 150 mM, NP-40 1%, Desoxicolato de Na 1%, SDS 0.1%, pH 7,6). Las muestras fueron conservadas a -80 °C hasta su uso. El contenido proteico total de los lisados celulares fue medido siguiendo el protocolo del kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo - 23225). Posteriormente, se realizaron geles discontinuos para SDS-PAGE, empleando un equipo MiniProtean® 3 (BioRad) según el protocolo descrito por Lamberti, Rumie Vittar, De Carvalho da Silva, Ferreira, & Rivarola, 2013<sup>16</sup>. El gel de resolución se confeccionó con una concentración de acrilamida de 8% para la detección HIF-1 $\alpha$  y de 10% para la detección de p-ERK1/2 y p-Akt mientras que el gel de apilamiento fue de 4%. Se sembraron 60  $\mu$ g de proteínas por calle y en paralelo un marcador de amplio rango de peso molecular (Rainbow, Amersham). Antes del sembrado, las muestras se sometieron a 100°C durante 5 minutos en buffer muestra 2X (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% glicerol, 2% SDS, 0,01% azul de bromofenol). La corrida electroforética se efectuó a 120 voltios constantes durante 2 horas. Luego se recuperaron los geles para realizar la transferencia de las proteínas a membranas PVDF (Sigma) en un equipo Trans Blot™ Cell (Bio-Rad) durante 80 minutos a una intensidad de 250 mAmp constantes<sup>9</sup>. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 hora en solución de bloqueo (5% Leche descremada en PBS 1X 0,05% Tween, denominado PBS-T). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno. La incubación con el anticuerpo primario contra HIF-1 $\alpha$  (R&D - MAB1536, 1/200) se realizó en solución de bloqueo y con el anticuerpo primario contra pERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology - sc-7383, 1/750) y p-Akt (Cell Signaling #9271, 1/1000) se realizó en PBS-T, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente,

luego de otros 3 ciclos de lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse (Bio-Rad, 1/2000) 2 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Se removió el exceso de este último anticuerpo mediante lavados con PBS-T y finalmente, los complejos inmunes fueron detectados con el reactivo Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo - 32106), según instrucciones del fabricante. Como control de carga se utilizó b-Actina, ERK1/2 y Akt total, según correspondiera.

#### **4.16. Generación de medios condicionados (MCs).**

Los esferoides fueron lavados tres veces con PBS para eliminar toda traza de suero. Se incubaron durante 24 h con medio de cultivo libre de suero fetal bovino sin rojo fenol según la relación  $6 \times 10^5$  cél/ml MC<sup>20</sup>. Los MCs obtenidos fueron cosechados y clarificados por centrifugación durante 10 min a 10000 rpm y se almacenaron posteriormente en freezer -80°C hasta el momento de su uso. Los MCs utilizados para el análisis secretómico fueron liofilizados.

#### **4.17. Ensayo de migración celular en esferoides endoteliales**

Con el objetivo de estudiar el efecto sobre la capacidad de migración de las células HMEC en respuesta al estímulo tumoral mediado por factores solubles, se realizó el ensayo de migración celular a partir de esferoides de células HMEC. Para realizar este ensayo se generaron esferoides de 20000 células HMEC utilizando la técnica LO. Se colocaron 10 esferoides en placas de 35 mm y una vez adheridos a la superficie, el medio de cultivo fue reemplazado por medios condicionados obtenidos a partir de esferoides de células tumorales durante 24 h. Posteriormente, los esferoides fueron fijados con metanol, teñidos con azul de toluidina y se tomaron fotografías<sup>21</sup>.

#### **4.18. Ensayo de formación de tubos**

Este ensayo está basado en la diferenciación de células endoteliales y la formación de estructuras de tipo tubular sobre una matriz extracelular de Matrigel (BD Bioscience). Para determinar el efecto del estímulo parácrino tumoral sobre el proceso de tubulogénesis, se sembraron células HMEC a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células/ml en placas de 96 pocillos cubiertas con 50 ul de Matrigel®. Una vez adheridas, se les adicionaron los MCs provenientes de las esferoides tumorales. Luego de 3 h, se tomaron fotografías utilizando un microscopio óptico invertido<sup>21</sup>.

#### **4.19. Cuantificación del ARNm de VEGF por RT-qPCR**

El ARN total fue extraído con Trizol, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies). Para la retrotranscripción se utilizó la enzima M-MLV (Invitrogen), partiendo de 1

µg de RNA, según protocolo del fabricante. Las expresiones génicas fueron determinadas mediante qPCR con el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France) usando SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio). Los niveles relativos de ARNm se calcularon según:  $2^{-\Delta\Delta CT} = [(CT \text{ gen en la muestra} - CT \text{ 18S en la muestra}) - (CT \text{ gen en el control} - CT \text{ } \beta\text{-18S en el control})]^{22}$ .

Los primers utilizados fueron los siguientes:

Para VEGFa (humano):

Forward: 5' GGCGAGGCAGCTTGAGTTAA 3'

Reverse: 5' CACCGCCTCGGCTTGTC 3'

Para 18S (humano):

Forward: 5' AACCCGTTGAACCCCATTCGTGAT 3'

Reverse: 5' AGTCAAGTTCGACCGTCTTCTCAG 3'

## 4.20. Análisis secretómico

### 4.20.1. Preparación de las muestras

Los MCs (1 ml) liofilizados se reconstituyeron en 100 µl de buffer conteniendo 50 mM HEPES pH: 8,5, 1% SDS, 1X Protease Inhibitor Cocktail y se adicionó 1 µl de la nucleasa benzonasa. Las proteínas fueron reducidas utilizando 0,5 µl de 200 mM DTT en 200 mM HEPES a 45°C durante 30 min. Luego, se agregó 1 µl de 400 mM iodoacetamida en 200 mM HEPES como agente alquilante; las muestras se incubaron en esta solución durante 30 min a 24°C en oscuridad. La reacción se detuvo con 1 µL de 200 mM DTT durante 4 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 2 µl de perlas magnéticas Sera-Mag SP3 a cada muestra y se homogeneizó adecuadamente. La mezcla proteínas-perlas magnéticas se acidificó (pH 2) a través del agregado de 5 µl de 5% ácido fórmico y acetonitrilo (100% stock) hasta obtener una concentración final de 50% (v/v). Luego, las muestras fueron incubadas al menos 8 minutos a temperatura ambiente y se colocaron en el magneto durante 2 min, para posteriormente descartar el sobrenadante. Las perlas magnéticas fueron lavadas con 200 µl de 70% etanol, incubadas 15 s, descartándose luego el sobrenadante. Este paso fue repetido una vez más. Posteriormente, las perlas magnéticas fueron lavadas con 180 µl de 100% acetonitrilo, incubadas 15 s, descartándose el sobrenadante. Todos los lavados fueron realizados con las muestras montadas en el magneto. Finalmente, las perlas magnéticas lavadas se reconstituyeron en 5 µl de buffer de digestión (50 mM HEPES pH 8, 0,5 µg tripsina/lisina C por muestra) y se incubaron durante 14 h a 37°C. Concluido el tiempo de incubación, se agregó acetonitrilo a cada muestra hasta obtener un porcentaje final de 95%. Las

muestras fueron incubadas durante 8 min a temperatura ambiente, luego se colocaron en el magneto por 2 min y se descartó el sobrenadante. Las perlas magnéticas fueron lavadas con 180  $\mu$ l de acetonitrilo, incubadas 15 s, y luego se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se reconstituyeron en 20  $\mu$ l de 2% DMSO y se sonicaron durante 5 min. Las muestras sonicadas se colocaron en el magneto y se colectaron los péptidos eluidos. Para su posterior análisis de espectrometría de masa, la solución peptídica se acidificó mediante el agregado de 1  $\mu$ l de 10% de ácido fórmico<sup>23</sup>.

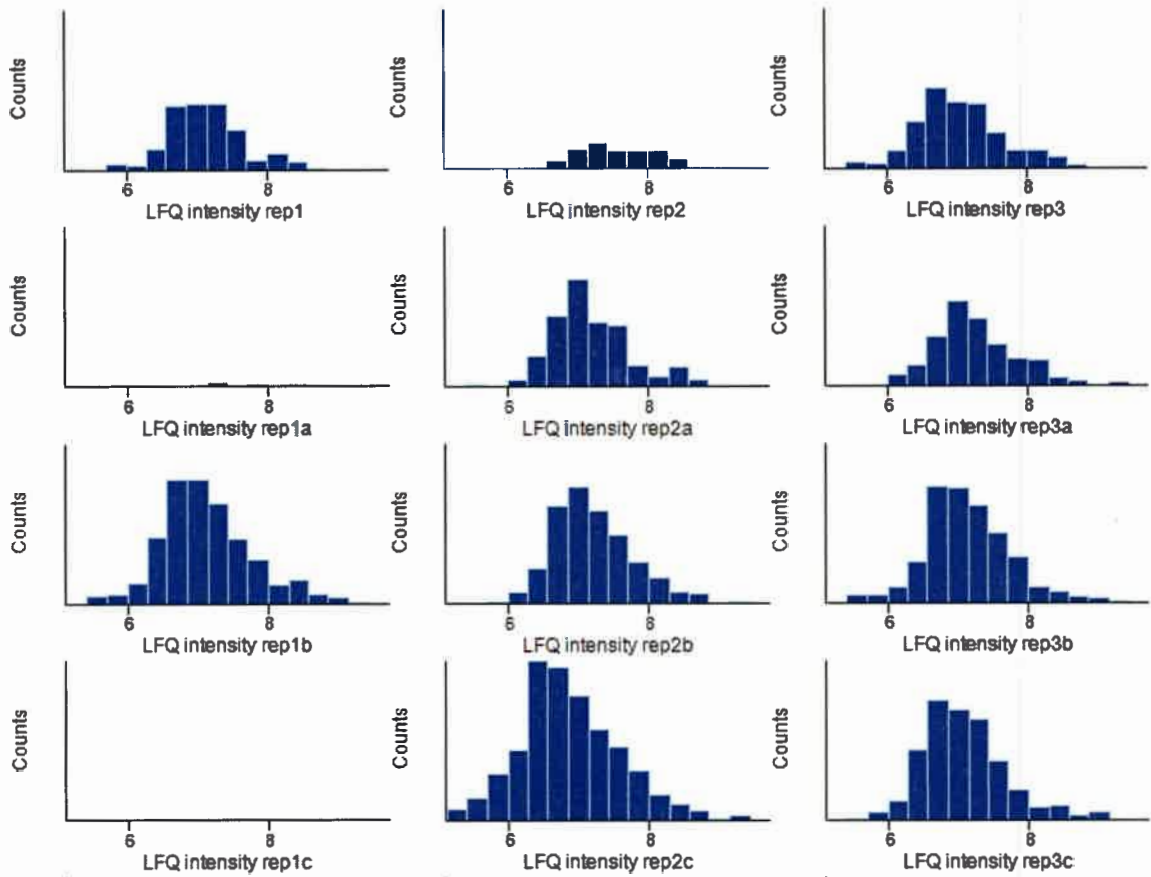
#### 4.20.2. Cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) e identificación de proteínas

Las muestras fueron analizadas utilizando el espectrómetro de masas Orbitrap Velos. Los datos crudos fueron analizados con el software libre MSQuant para la identificación de los péptidos y la cuantificación en ausencia de sondas (LFQ, “label free quantification”)<sup>24</sup>, aplicando la base de datos de origen humano. Las muestras se rotularon como se indica a continuación:

- CT: Esferoides homotípicos no tratados (Repeticiones biológicas: rep1, rep2, rep3)
- CT + F: Esferoides heterotípicos no tratados (Repeticiones biológicas: rep1a, rep2a, rep3a)
- CT TFD: Esferoides homotípicos tratados con TFD (Repeticiones biológicas: rep1b, rep2b, rep3b)
- CT + F TFD: Esferoides heterotípicos tratados con TFD (Repeticiones biológicas: rep1c, rep2c, rep3c).

#### 4.20.3. Análisis de datos

El valor LFQ correspondiente a cada proteína en cada muestra se consideró proporcional a su concentración<sup>25,26</sup>. Estos datos fueron analizados utilizando el software Perseus. Los valores LFQ fueron logaritmizados ( $\log_{10}(x)$ ) y con estos resultados se confeccionaron histogramas con el objetivo de estudiar la distribución normal de los datos (Figura 21).



**Figura 21. Histogramas**

*Los histogramas se realizaron utilizando los valores LFQ logaritmizados ( $\log_{10}(x)$ ) para visualizar la distribución normal de los datos*

Los valores de LFQ fueron nuevamente logaritmizados ( $\log_2(x)$ ) y con estos datos se realizó el gráfico multiscatter y la matriz de correlación de Perseus, para identificar la correlación de datos entre los replicados (Figura 22, Tabla IV).

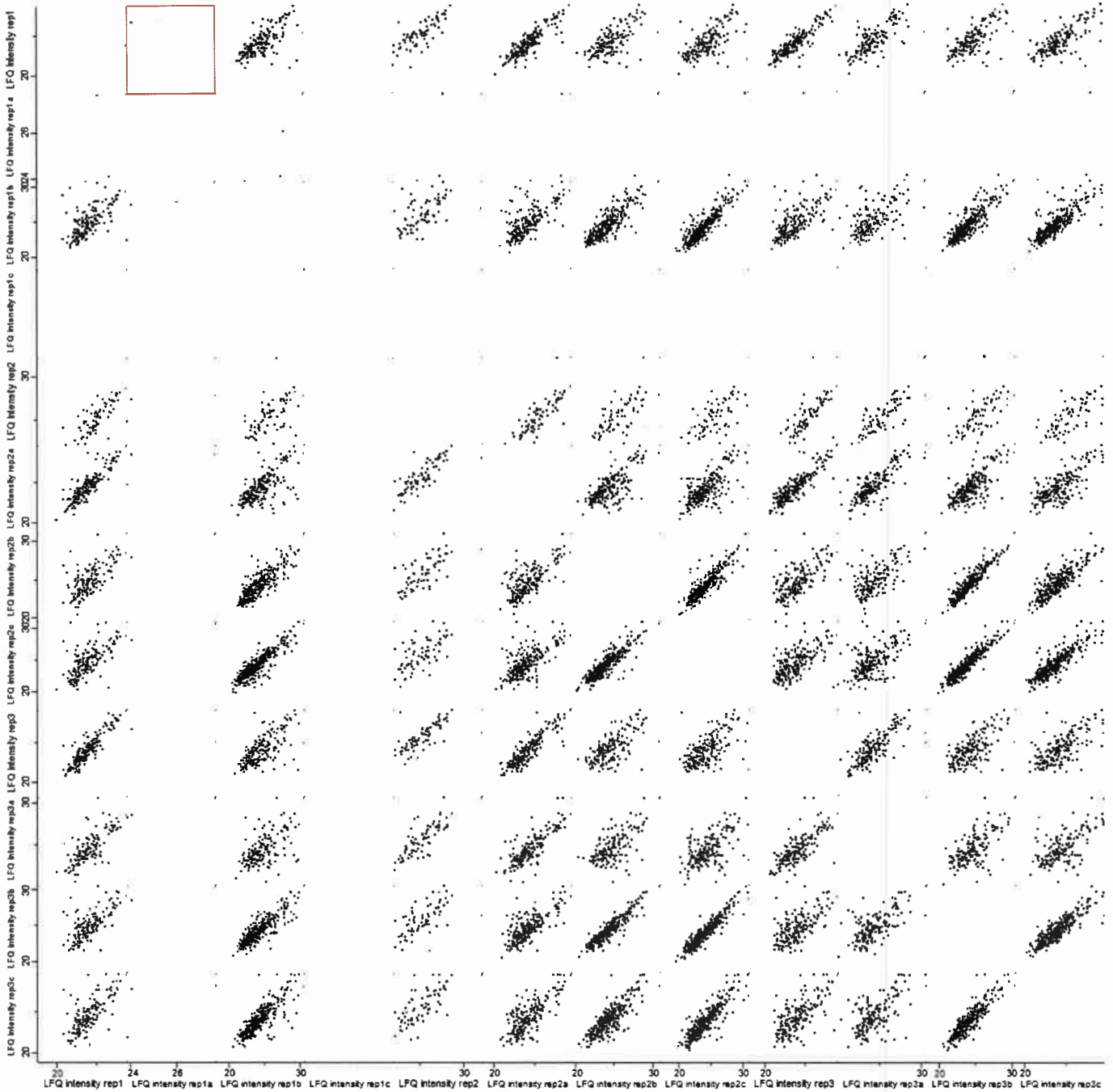


Figura 22. Gráfico multiscatter

El gráfico multiscatter se realizó utilizando los valores LFQ logaritmizados ( $\log_2(x)$ ) para visualizar la correlación entre los replicados

**Table IV. Matriz de correlación de Perseus.** Los coeficientes de correlación cuyo valor fue mayor a 0.7 se consideraron de alta correlación; en la tabla se identificaron con rojo aquellos valor menores a 0.7

rep1	rep1a	rep1b	rep1c	rep2	rep2a	rep2b	rep2c	rep3	rep3a	rep3b	rep3c	
NeuN	0,07	0,66	0,00	0,77	0,87	0,66	0,64	0,89	0,72	0,66	0,71	rep1
0,067	NeuN	0,83	0,00	0,65	0,57	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,60	rep1a
0,66	0,83	NeuN	0,00	0,55	0,67	0,84	0,88	0,66	0,57	0,85	0,81	rep1b
0,00	0,00	0,00	NeuN	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	rep1c
0,77	0,65	0,55	0,00	NeuN	0,80	0,70	0,62	0,71	0,81	0,62	0,71	rep2
0,87	0,57	0,67	0,00	0,80	NeuN	0,71	0,66	0,87	0,80	0,74	0,76	rep2a
0,66	0,00	0,84	0,00	0,70	0,71	NeuN	0,88	0,66	0,63	0,93	0,84	rep2b
0,64	0,00	0,88	0,00	0,62	0,66	0,88	NeuN	0,59	0,55	0,94	0,87	rep2c
0,89	0,00	0,66	0,00	0,71	0,87	0,66	0,59	NeuN	0,75	0,67	0,68	rep3
0,72	1,00	0,57	0,00	0,81	0,80	0,63	0,55	0,75	NeuN	0,64	0,62	rep3a
0,66	0,00	0,85	0,00	0,62	0,74	0,93	0,94	0,67	0,64	NeuN	0,89	rep3b
0,71	0,60	0,81	0,00	0,71	0,76	0,84	0,87	0,68	0,62	0,89	NeuN	rep3c

Los replicados biológicos rep1a y rep1c no se utilizaron para los posteriores análisis debido a que no cumplían con los criterios de distribución normal ni de correlación entre replicados.

#### 4.20.4. Análisis bioinformático de proteínas

Los archivos FASTA que contenían la secuencia de las proteínas identificadas en cada grupo fueron analizados utilizando los softwares libres Secretome P 2.0 y Signal P 4.1. Secretome P genera predicciones sobre las proteínas secretadas por la vía no clásica<sup>27</sup>, mientras que SignalP informa la presencia del péptido señal y los sitios de clivaje<sup>28</sup>. Para que la secreción de una proteína se considere mediada por vías no clásicas, ésta debe obtener un score > 0.5 y no contener la secuencia consenso del péptido señal. Las interacciones proteína-proteína se visualizaron a través del software String 10<sup>29</sup>. Los procesos biológicos enriquecidos en las muestras de proteínas se identificaron mediante la base de datos NCI-Pathway Interaction Database (PID)<sup>30</sup>.

#### 4.21. Ensayo de angiogénesis *in vivo*

Para el estudio de la angiogénesis *in vivo* se implantaron subcutáneamente estructuras de matrigel (“plugs”) en el flanco de ratones nude (BALB/c nu/nu). Dichas estructuras contenían una mezcla de 250 µl de Matrigel®, bajo en factores de crecimiento, sin rojo fenol (BD Bioscience), con 200 esferoides en 50 µl de DMEM. Para la implantación del correspondiente “plug”, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina, diazepam y atropina. A los 21 días de la implantación, los animales fueron sometidos a eutanasia mediante dislocación cervical. Se tomaron fotografías de la angiogénesis periférica, es decir, los vasos sanguíneos que irrigaban al “plug” implantado. Luego, los “plugs” fueron extraídos, fotografiados y pesados<sup>31</sup>.



#### 4.22. Análisis estadístico

Los resultados mostrados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar (SEM) de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó utilizando el software Infostat, versión 2012 (Universidad de Córdoba, Córdoba, Argentina). Las diferencias entre grupos se determinaron por el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías. Para comparar las diferencias entre grupos se realizó el post-test de Bonferroni. La normalidad fue analizada utilizando la prueba de Shapiro Wilks, mientras que la homogeneidad de varianza fue analizada con el test de Levene. Cuando las variables no seguían una distribución normal o no cumplían con la homogeneidad de varianza fueron transformadas con operaciones aritméticas. Se consideraron significativos los valores de p igual o menor a 0,05. Los gráficos se realizaron con el software GraphPad Prism 4. Referencia de figuras:  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ;  $p < 0,001 = ***$ .

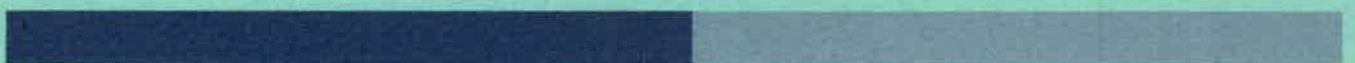
## Referencias

1. Leibovitz, A. *et al.* Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res* **36**, 4562–4569 (1976).
2. Fogh, J., Wright, W. & Loveless, J. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* **58**, 209–214 (1977).
3. Ades, E. *et al.* HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* **99**, 683–690 (1992).
4. ATCC. SW480. (2015). at <<http://www.atcc.org/products/all/CCL-228.aspx>>
5. ATCC. MRC-5. (2015). at <<http://www.atcc.org/products/all/CCL-171.aspx>>
6. Vordermark, D., Shibata, T. & Brown, J. Green Fluorescent Protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation. *Neoplasia* **3**, 527–534 (2001).
7. Mitra, S. *et al.* Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cancer Ther* **5**, 3268–3274 (2006).
8. Jin, F., Brockmeier, U., Otterbach, F. & Metzen, E. New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol Cancer Res.* **10**, 1021–1031 (2012).
9. Sambrook, J. & Russel, D. *Molecular Cloning Book.* (Cold Spring Harbor - Laboratory Press USA, 2001).
10. Mathupala, S. & Sloan, A. An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones. *Biotechniques.* **46**, 305–307 (2009).
11. Timmins, N. & Nielsen, L. Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med.* **140**, 141–151 (2007).
12. Metzger, W. *et al.* The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. *Cytotherapy* **13**, 1000–1012 (2011).
13. Ducrest, A., Amacker, M., Lingner, J. & Nabholz, M. Detection of promoter activity by flow cytometric analysis of GFP reporter expression. *Nucleic Acids Res.* **30**, e65 (2002).
14. Indovina, P., Collini, M., Chirico, G. & Santini, M. Three-dimensional cell organization leads to almost immediate HRE activity as demonstrated by molecular imaging of MG-63 spheroids using two-photon excitation microscopy. *FEBS Lett.* **581**, 719–726 (2007).

15. Bigelow, C. E., Mitra, S., Knuechel, R. & Foster, T. H. ALA- and ALA-hexylester-induced protoporphyrin IX fluorescence and distribution in multicell tumour spheroids. *Br J Cancer*. **85**, 727–734 (2001).
16. Lamberti, M., Rumie Vittar, N., de Carvalho da Silva, F., Ferreira, V. & Rivarola, V. Synergistic enhancement of antitumor effect of B-Lapachone by photodynamic induction of quinone oxidoreductase (NQO1). *Phytomedicine* **20**, 1007–1012 (2013).
17. Merlin, J. *et al.* MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur J Cancer*. **28A**, 1452–1458. (1992).
18. Stocker, F., King, E., Lucas, D. & Georgiade, N. A comparison of two different staining methods for evaluating corneal endothelial viability. *Arch Ophthalmol*. **76**, 833–835 (1966).
19. Eruslanov, E. & Kusmartsev, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*. **594**, 57–72 (2010).
20. Valcárcel, M. *et al.* Three-dimensional growth as multicellular spheroid activates the proangiogenic phenotype of colorectal carcinoma cells via LFA-1-dependent VEGF: implications on hepatic micrometastasis. *J Transl Med* **6**, 57 (2008).
21. Lamberti, M., Pansa, M., Vera, R., Rumie Vittar, N. & Rivarola, V. Photodynamic therapy potentiates the paracrine endothelial stimulation by colorectal cancer. *Laser Phys*. **24**, 8 (2014).
22. Zheng, X. *et al.* The transcription factor Gli1 mediates TGF $\beta$ 1 driven EMT in hepatocellular carcinoma via a SNAIL1-dependent mechanism. *PLoS One* **7**, e49581 (2012).
23. Hughes, C. & Krijgsveld, J. Developments in quantitative mass spectrometry for the analysis of proteome dynamics. *Trends Biotechnol*. **30**, 668–676 (2012).
24. Gouw, J. & Krijgsveld, J. MSQuant: a platform for stable isotope-based quantitative proteomics. *Methods Mol Biol*. **893**, 511–522 (2012).
25. Arntzen, M., Karlskås, I., Skaugen, M., Eijsink, V. & Mathiesen, G. Proteomic Investigation of the Response of *Enterococcus faecalis* V583 when Cultivated in Urine. *PLoS One* **10**, e0126694 (2015).
26. Zhang, Y. *et al.* Proteomics of larval hemolymph in *Bombyx mori* reveals various nutrient-storage and immunity-related proteins. *Amin. Acids*. **46**, 1021–1031 (2014).
27. Bendtsen, J., Jensen, L., Blom, N., Von Heijne, G. & Brunak, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel*. **17**, 349–356 (2004).
28. Petersen, T., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. **8**, 785–786 (2011).
29. Von Mering, C. *et al.* STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res*. **31**, 258–261 (2003).

30. Schaefer, C. *et al.* PID: the Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Res.* **37**, D674–D679 (2009).
31. Szade, K. *et al.* Spheroid-plug model as a tool to study tumor development, angiogenesis, and heterogeneity in vivo. *Tumour Biol.* In press (2015).

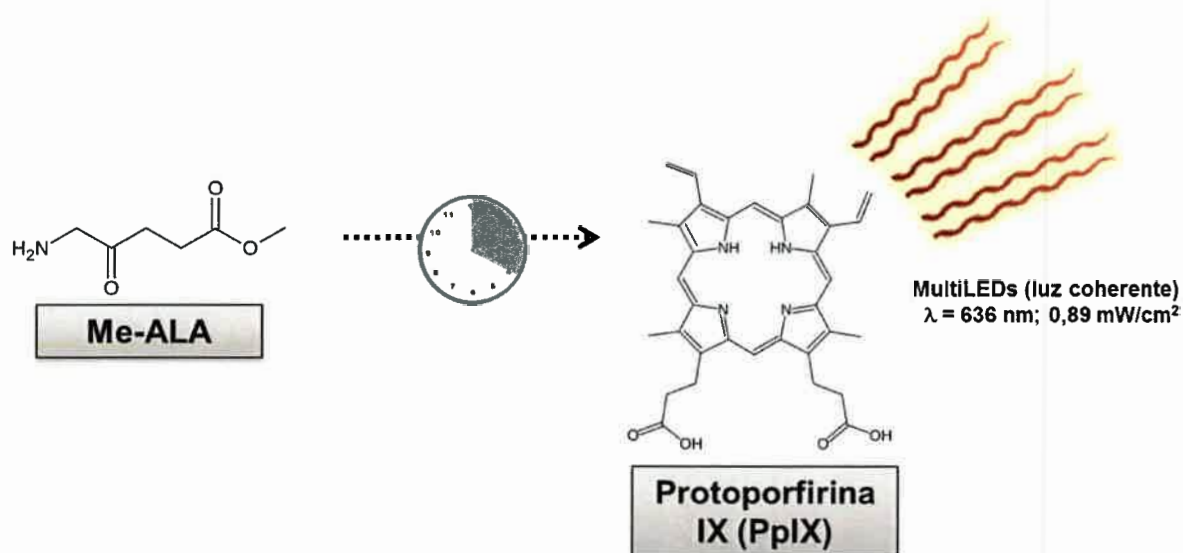
# Resultados y Discusión



## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Actividad fotodinámica sobre células de cáncer colorrectal con diferente grado de diferenciación

En el presente estudio se utilizaron inicialmente dos modelos de carcinoma colorrectal: la línea celular SW480, indiferenciada<sup>1</sup>, y la línea Caco-2, con mayor grado de diferenciación y morfología epitelial<sup>2</sup>. Para los ensayos de fotosensibilización, se aplicó el protocolo convencional de TFD que consistió en incubar las células neoplásicas con la droga precursora Me-ALA durante 4 h para permitir la formación de protoporfirina IX (PpIX, fotosensibilizador endógeno), y posteriormente exponerlas a dosis de luz crecientes<sup>3</sup> (Figura 23).

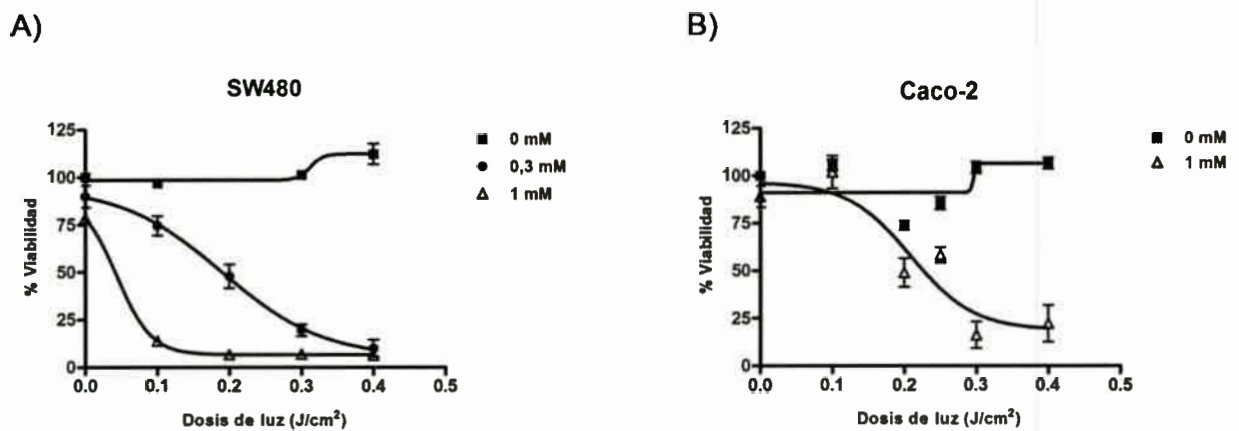


**Figura 23. Protocolo de fotosensibilización convencional.**

*Las células tumorales fueron incubadas en presencia de la prodroga Me-ALA durante 4 h para permitir la formación del fotosensibilizador PpIX. Posteriormente, las células fueron irradiadas con luz roja ( $\lambda$ : 636 nm) para excitar al fotosensibilizador.*

Al combinar la incorporación del FS con la luz, la viabilidad de las células tumorales disminuyó de forma proporcional al incremento de la dosis de irradiación empleada, evidenciando actividad fotodinámica y sensibilidad celular (Figura 24A y 24B). Para conocer si el grado de diferenciación del tumor puede influir sobre la respuesta a la TFD, se compararon las DL50 (dosis de TFD que ocasiona el 50% de muerte celular) de las diferentes líneas de cáncer de colon aplicando una regresión no lineal a los datos. Utilizando 1 mM de Me-ALA, fue necesaria una irradiación de  $0,032 \pm 0,002 \text{ J/cm}^2$  y  $0,211 \pm 0,002 \text{ J/cm}^2$  para la línea SW480 y Caco-2 respectivamente.

Teniendo en cuenta que la especificidad de la TFD está en parte determinada por la acción combinada de tres componentes (FS, luz y  $O_2$ ), el daño causado en forma individual por alguno de ellos desestima su posible aplicación, ya que dichos componentes por sí solos deben ser inocuos<sup>4</sup>. En este sentido, la proliferación de las células tumorales creciendo en monocapa no se vio afectada cuando fueron irradiadas sin la previa incorporación de la pro-droga (Me-ALA 0 mM) ni cuando fueron incubadas con Me-ALA sin irradiación posterior ( $0 \text{ J/cm}^2$ ), excepto en el caso de la línea SW480, cuya viabilidad disminuyó significativamente en presencia de 1 mM de Me-ALA (Figura 24). Por esta razón, esta concentración de la prodroga fue excluida en posteriores estudios sobre la línea SW480.



**Figura 24. La intervención fotodinámica disminuye la viabilidad de células de carcinoma colorrectal.**

Las células SW480 (A,  $2 \times 10^5$  cél/ml) y Caco-2 (B,  $1 \times 10^5$  cél/ml) crecidas en monocapa fueron incubadas durante 4 h en presencia de Me-ALA (1 mM para Caco-2, 0,3 mM y 1 mM para SW480) y luego irradiadas con dosis de luz creciente ( $0-0,4 \text{ J/cm}^2$ ). A las 24 h post-tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control sin irradiar. Los valores de DL50 para cada línea celular fueron determinados a través de la confección de curvas dosis-respuesta aplicando una regresión no-lineal a los datos (GraphPad Prism).

Los datos obtenidos sugieren una correlación entre el grado de diferenciación celular y la resistencia terapéutica. Estas observaciones pueden ser explicadas, al menos en parte, por la expresión diferencial que presentan estas líneas celulares en las enzimas responsables de la acumulación intracelular de PpIX: PBGD (porfobilinógeno deaminasa, Figura 7), productora de PpIX, y FC (ferroquelatasa, Figura 7) y ABCG2 (del inglés, “ATP-binding cassette sub-family G member 2”) removedoras de PpIX<sup>3,5</sup>. Mientras Caco-2 presenta alta actividad de FC y ABCG2 y baja actividad de PBGD, la línea SW480 demuestra lo contrario, lo que argumenta una mayor acumulación de PpIX y consecuentemente una mayor sensibilidad a los posteriores ensayos de irradiación<sup>3,6</sup>. Por otro lado, estudios recientes demostraron que la diferenciación celular afectó la

susceptibilidad de células tumorales de neuroblastoma al tratamiento fotodinámico, en concordancia con lo observado en nuestros ensayos<sup>7</sup>.

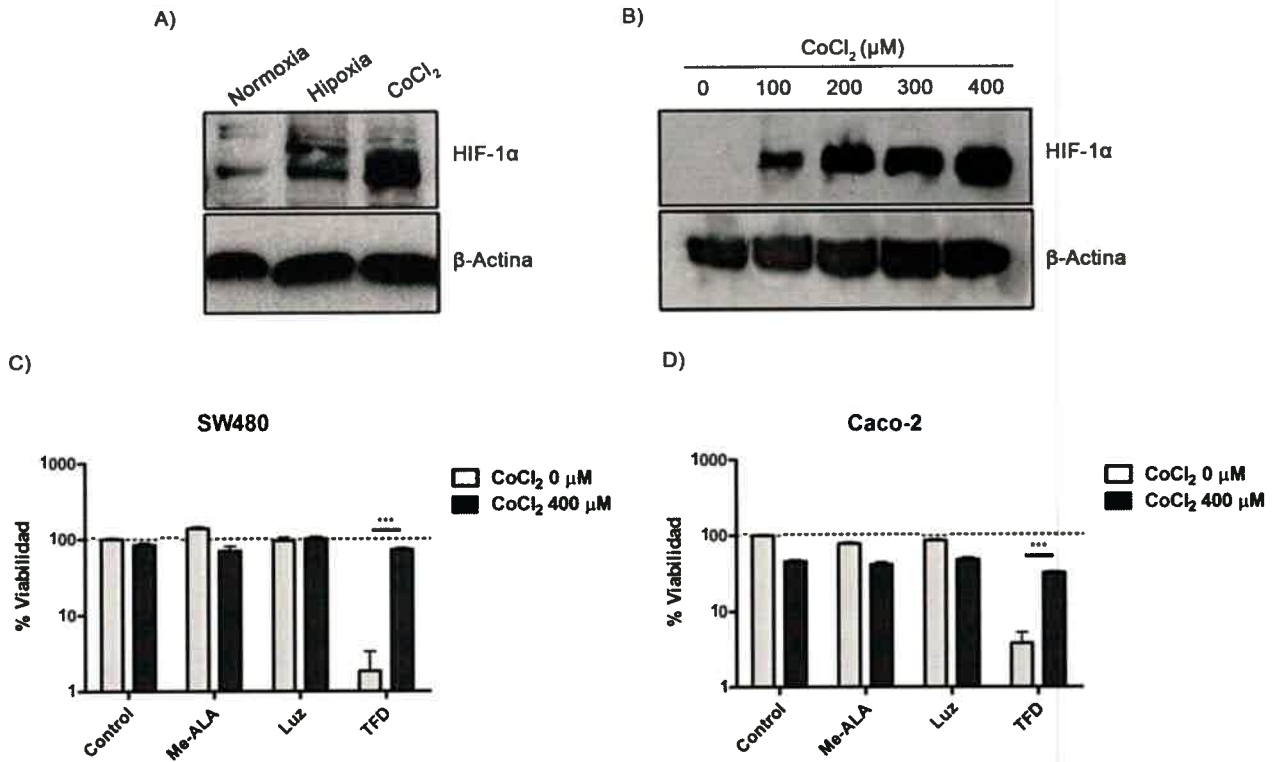
## 5.2. Implicancia de la hipoxia en la resistencia al tratamiento fotodinámico

Como se mencionó en la sección 1.10, las condiciones dentro del microambiente tumoral difieren considerablemente de aquéllas dentro del tejido normal. La hipoxia, definida como baja presión de oxígeno, caracteriza a los tumores y afecta significativamente la respuesta de las células neoplásicas a la quimio y radioterapia<sup>8</sup>. El factor de transcripción HIF-1, activado por hipoxia, es clave en la modulación de la resistencia a intervenciones antitumorales, debido a que regula la transcripción de genes involucrados en el eflujo de drogas, inhibición de apoptosis, senescencia y daño al ADN e inducción de autofagia<sup>8</sup>. Además, en lo que respecta a la TFD como modalidad terapéutica, el oxígeno molecular ha sido señalado en sí mismo como factor fundamental dentro del mecanismo de fototoxicidad, siendo esta terapia altamente dependiente de O<sub>2</sub><sup>9</sup>. Es por ello que desde hace muchos años se investiga cómo afecta el microambiente hipóxico donde se desarrolla el tumor en la respuesta a la intervención fotodinámica.

Las enzimas prolil hidroxilasas (PHDs) son las iniciadoras de la cascada de señales que finaliza en la desestabilización de HIF-1 $\alpha$  en normoxia. Las PHDs son dioxigenasas que catalizan la hidroxilación de residuos de prolina específicos en la subunidad alfa de HIF, requerimiento esencial para su posterior ubiquitinación y degradación por proteasoma. Estas dioxigenasas utilizan oxígeno y 2-oxoglutarato como co-substratos, por lo cual su actividad se inhibe bajo condiciones hipóxicas, y ascorbato y hierro como cofactores. Se ha reportado que el cobalto (II) inhibe a las PHDs debido a que reduce el ascorbato intracelular. Por ello, en el presente trabajo se utilizó el tratamiento con CoCl<sub>2</sub> como mimético de hipoxia debido a su actividad inhibitoria sobre las enzimas PHDs<sup>10,11</sup>. Para corroborar su eficiencia como herramienta para imitar la estabilización de HIF-1 $\alpha$  que caracteriza las regiones hipóxicas del tumor, se analizó la expresión de esta subunidad proteica en la línea SW480 creciendo bajo condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) en ausencia y presencia de CoCl<sub>2</sub> y en condiciones hipóxicas (1% O<sub>2</sub>) (Figura 25A). Se demostró que tanto la hipoxia como el CoCl<sub>2</sub> estabilizaron exitosamente la expresión de HIF-1 $\alpha$ . La inducción química de HIF-1 $\alpha$  también se observó en la línea Caco-2, de forma proporcional a la concentración de CoCl<sub>2</sub> (Figura 25B).

Posteriormente, las células creciendo en presencia de CoCl<sub>2</sub> fueron sometidas al tratamiento fotodinámico. La sobreexpresión de HIF-1 $\alpha$  manifestó una correlación positiva con un aumento de la resistencia de las células tumorales a la intervención fotodinámica (Figura 25C y 25D).





**Figura 25. La activación de HIF-1 $\alpha$  induce resistencia al tratamiento fotodinámico.**

Las células (A) SW480 ( $2 \times 10^5$  cél/ml) crecidas en monocapa fueron incubadas durante 24 h en normoxia en ausencia y presencia de  $400 \mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  y bajo condiciones hipóxicas. Las células Caco-2 ( $1 \times 10^5$  cél/ml) crecidas en monocapa fueron incubadas con concentraciones crecientes de  $\text{CoCl}_2$  durante 24 h. Posteriormente se extrajeron las proteínas celulares totales. Aliquotas conteniendo cantidades equivalentes de proteínas ( $60 \mu\text{g}$ ) fueron sembradas en un gel al 8% y transferidas a membranas PVDF. Para la detección de HIF-1 $\alpha$  se utilizó un anticuerpo monoclonal contra HIF-1 $\alpha$  (R&D – MAB1536) y para la detección de  $\beta$ -actina se utilizó un anticuerpo monoclonal contra  $\beta$ -actina (Calbiochem – CP01). Los complejos inmunes fueron detectados por quimioluminiscencia. Para el ensayo de viabilidad, las células (C) SW480 ( $1,6 \times 10^5$  cél/ml) y (D) Caco-2 ( $0,8 \times 10^5$  cél/ml) crecidas en monocapa fueron incubadas durante 24 h con  $\text{CoCl}_2$  ( $400 \mu\text{M}$ ). Luego, fueron incubadas durante 4 h en presencia de Me-ALA ( $1 \text{ mM}$  para Caco-2 y  $0,3 \text{ mM}$  para SW480) e irradiadas ( $0,3 \text{ J/cm}^2$ ). 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control sin tratar (100%, línea de puntos). Referencias: Control, células sin tratar; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; Luz, células irradiadas sin la droga; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas. Análisis estadístico: Anova en dos vías, Bonferroni post-test, \*\*\*  $p < 0,001$ .

En concordancia con nuestros hallazgos, otro estudio *in vitro* utilizando ALA como FS asoció la inducción química de HIF-1 $\alpha$  en normoxia con la resistencia a la TFD<sup>10</sup>. Por otro lado, se correlacionó la disminución de la sensibilidad al tratamiento fotodinámico bajo hipoxia con una menor conversión de ALA a PpIX<sup>12</sup>.

Muchos autores han investigado la relación existente entre la oxigenación del tumor y la eficiencia terapéutica de la TFD, principalmente sobre modelos *in vivo*. Se ha reportado una asociación negativa entre la hipoxia y la citotoxicidad de la TFD sólo cuando los FSs aplicados actúan a través del mecanismo de tipo II, dependiente de oxígeno, como es el caso de

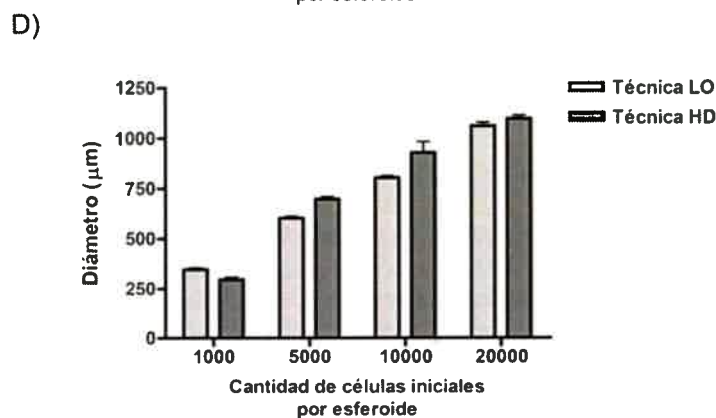
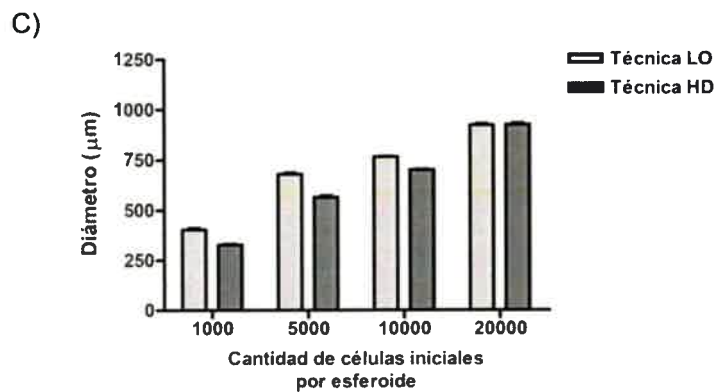
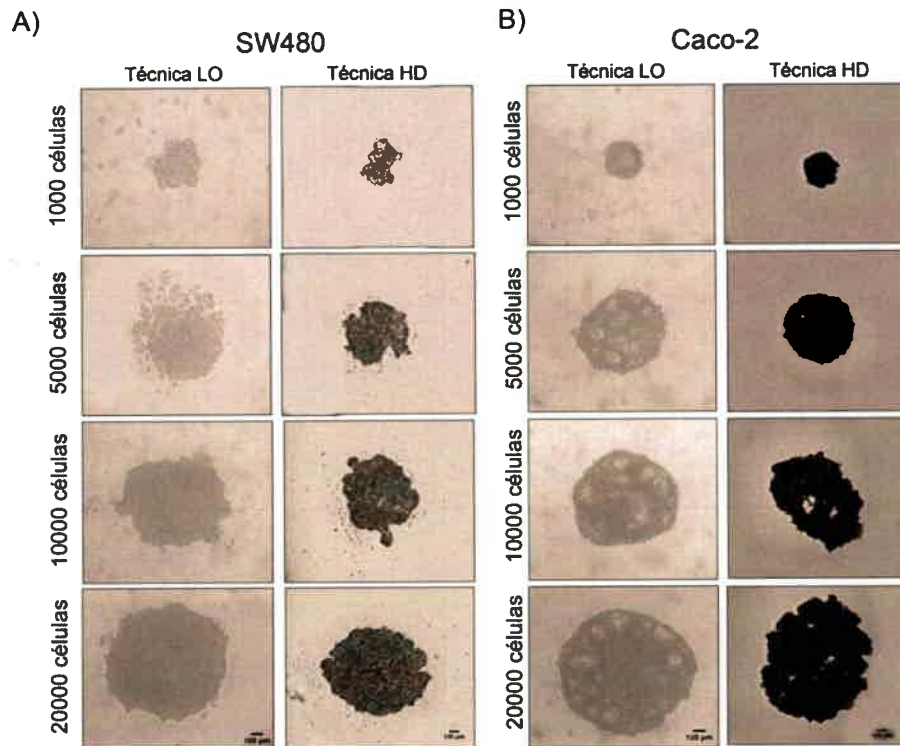
dihematoporfirina eter<sup>13</sup>, 5,10,15,20-tetrakis (meso-hidroxifenil) porfirina (m-THPP)<sup>14</sup>, hipericina<sup>15</sup>, porfímero sódico (Photofrin®)<sup>16</sup>. La mayoría de estos estudios coinciden en que no se observó fototoxicidad en anoxia, y que la viabilidad tumoral disminuyó de forma proporcional al aumento de la presión de oxígeno. La incorporación del FS en las células no se vio influenciado por la hipoxia, indicando que el mecanismo de resistencia reportado no está relacionado a fenómenos de transporte o eflujo de drogas. En muchos casos, la hiperoxigenación revirtió la resistencia a la TFD<sup>17,18</sup>. Una estrategia sugerida por otros investigadores consistió en la aplicación de FSs cuyo mecanismo de acción no involucre al O<sub>2</sub>, es decir, de tipo I, con preferencia en localizarse en regiones hipóxicas, tal es el caso de 5-etilamino-9-dietilaminobenzo(a)fenotiazinio (EtNBS)<sup>19,20</sup>.

En estudios clínicos, se demostró que pacientes con cáncer colorrectal con marcada expresión de HIF-1 $\alpha$  en el área tumoral previa al tratamiento mostraron una escasa respuesta a la posterior intervención terapéutica. Teniendo en cuenta que la proteína HIF-1 $\alpha$  es un marcador clave de la hipoxia, y que esta condición influye significativamente en la respuesta a la TFD, se propuso como factor predictivo de la efectividad del tratamiento fotodinámico<sup>21</sup>.

### **5.3. Modelo de cultivo tridimensional como estrategia para imitar la arquitectura tumoral**

En los últimos años, se ha demostrado que la simulación de las condiciones 3D representativas de la morfología tumoral asegura la reproducción de interacciones célula-célula y célula-matriz existentes en los tejidos reales<sup>22</sup>. Los modelos de cultivos en esferoides permiten el estudio de procesos biológicos en un ambiente que imita la arquitectura tumoral *in vivo*, recreando de forma más precisa el contexto fisiológico en donde se desarrolla la enfermedad.

Las técnicas HD y LO son especialmente útiles para generar esferoides tridimensionales de tamaños definidos que puedan ser empleados en el estudio de eventos celulares o moleculares durante la invasión tumoral<sup>23</sup> y la interacción de dos tipos diferentes de células<sup>24,25</sup>. Por ello, en el presente trabajo, inicialmente se ensayaron estas dos técnicas para generar cultivos 3D, partiendo de diferentes cantidades de células en medio de crecimiento no proliferativo. Se observó que el tamaño de los esferoides generados luego de 3 días de incubación fue proporcional a la cantidad de células iniciales (Figura 26). Luego de un exhaustivo análisis, se seleccionó a la técnica LO sobre HD por ser más reproducible, rápida y por generar esferoides más homogéneos.



**Figura 26. Crecimiento tridimensional de las células de cáncer colorrectal.**

Las células (A y C) SW480 y (B y D) Caco-2 (1000, 5000, 10000 y 20000 células) fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo redondo previamente recubiertas de agarosa 1% (técnica LO) o en gotas de 30 µl en la tapa de placas de Petri (técnica HD) en medio de crecimiento no proliferativo. Luego de 3 días de incubación, se tomaron las fotos con el aumento 4X del objetivo. El diámetro de los esferoideos generados se midió utilizando el software ImageJ.

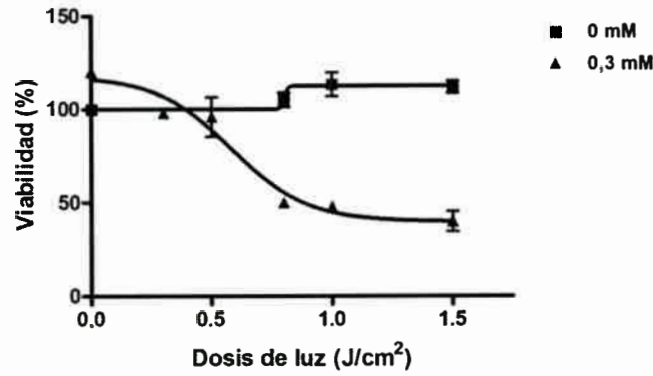
En los cultivos 3D generados a partir de la línea Caco-2, más diferenciada, se observó la presencia de cistos en la periferia. Este patrón de distribución espacial es considerado un paso crucial para la morfogénesis epitelial ya que dentro de estas estructuras las células se conectan unas con otras y adoptan la polarización característica desde la superficie apical hacia el lumen intestinal<sup>26,27</sup>. Una correcta polarización es fundamental para el desarrollo de órganos y tejidos, y se ha observado que en muchos tipos de cáncer este proceso presenta anomalías que se asocian con la promoción neoplásica<sup>28</sup>. En este sentido, la línea Caco-2 ha sido utilizada como modelo de estudio en ensayos de diferenciación de epitelio intestinal<sup>29-31</sup> y de transporte transepitelial<sup>32,33</sup>, debido a su capacidad de expresar marcadores morfológicos y bioquímicos asociados a enterocitos adultos diferenciados. Además, ciertos reportes indican que cuando las células Caco-2 crecen sobre membranas recubiertas de colágeno generan una monocapa de células polarizadas similar a aquellas descritas en el epitelio simple columnar del intestino. Bajo estas condiciones, son capaces de diferenciarse en células similares a las de las criptas y microvellosidades intestinales, dependiendo de la fase de crecimiento en la que se encuentren<sup>33-35</sup>.

Teniendo en cuenta la semejanza de la línea celular Caco-2 con los enterocitos no malignos, en el presente proyecto no consideramos pertinente continuar con el estudio en este modelo debido a que no cuenta con características propias del microambiente tumoral.

#### **5.4. Implicancia de la arquitectura tumoral en la respuesta a la intervención fotodinámica**

Para determinar la implicancia de la arquitectura tridimensional sobre la eficiencia de la TFD en términos de viabilidad celular, se generaron los esferoides de la línea SW480 según los parámetros definidos previamente.

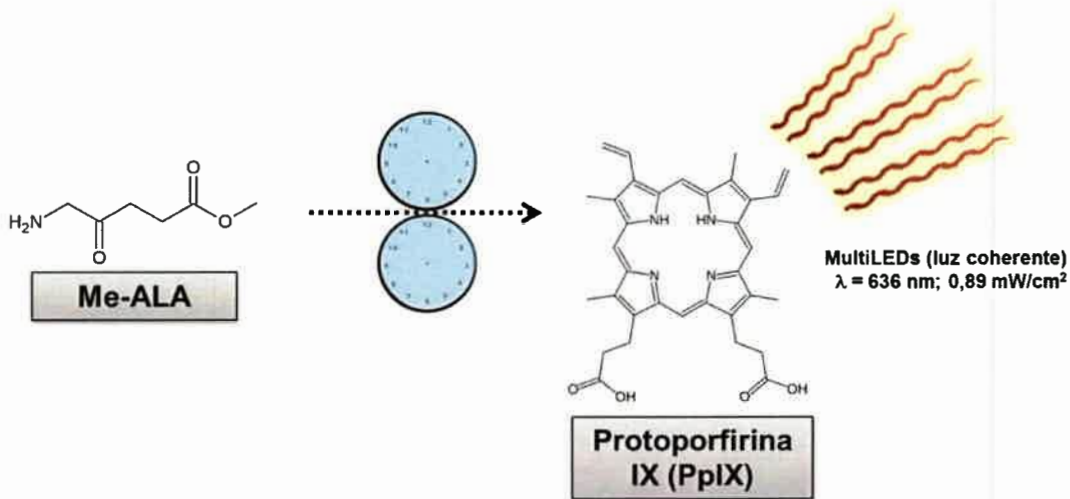
Las condiciones de tratamiento fotodinámico para los cultivos tumorales 3D fueron establecidas teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los cultivos en monocapa, correspondientes al protocolo convencional descrito previamente (Figura 23). De esta forma, los primeros ensayos de fotosensibilización de esferoides de SW480 mostraron que la combinación de la incubación de 0,3 mM de Me-ALA durante 4 h y la irradiación posterior no logró reducir la viabilidad celular a más de un 40%, independientemente del aumento de la dosis de luz aplicada (Figura 27). La DL50 sobre los cultivos 3D se obtuvo al irradiarlos con  $0,883 \pm 0,005 \text{ J/cm}^2$ . La comparación de este valor con lo reportado en los ensayos sobre cultivos 2D (DL50 para 0.3 mM de Me-ALA:  $0,301 \pm 0,002 \text{ J/cm}^2$ ) sugiere que la arquitectura tumoral está fuertemente asociada a un aumento de la resistencia terapéutica.



**Figura 27.** El protocolo convencional de terapia fotodinámica no afecta significativamente la viabilidad de esferoides de células de cáncer colorrectal.

Los esferoides de SW480 (20000 células por esferoide) se incubaron durante 4 h en ausencia (0 mM) y presencia de Me-ALA (0,3 mM) y luego fueron irradiados con dosis de luz creciente (0-1,5 J/cm<sup>2</sup>). A las 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control sin irradiar. Los valores de DL50 fueron determinados a través de la confección de curvas dosis-respuesta aplicando una regresión no-lineal a los datos (GraphPad Prism).

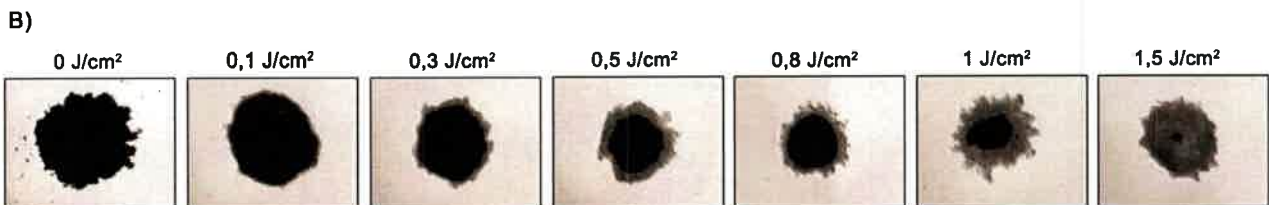
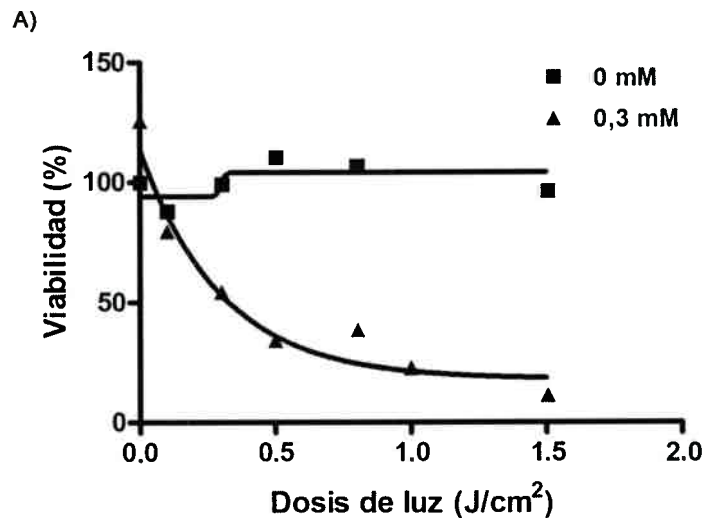
A continuación, se modificó el protocolo de fotosensibilización con el objetivo de incrementar la citotoxicidad de la TFD sobre los esferoides tumorales. Para ello, el tiempo de incubación de los cultivos 3D de células de cáncer colorrectal SW480 en presencia de la prodroga Me-ALA se prolongó a 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con dosis de luz crecientes (Figura 28).



**Figura 28.** Nuevo protocolo de fotosensibilización.

Las células tumorales fueron incubadas en presencia de la prodroga Me-ALA durante 24 h para permitir la formación del fotosensibilizador PpIX. Posteriormente, las células fueron irradiadas con luz roja ( $\lambda: 636 \text{ nm}$ ) para excitar al fotosensibilizador.

Se demostró que el nuevo protocolo de fotosensibilización redujo significativamente la viabilidad de los microtumores de forma proporcional al incremento de la dosis de irradiación empleada (Figura 29A). Asimismo, el aumento del tiempo de incubación con la prodroga se tradujo en una notable disminución de la DL50 ( $0,326 \pm 0,005 \text{ J/cm}^2$ ). A medida que aumentó la dosis de luz aplicada y consecuentemente la citotoxicidad terapéutica, la población de células viables (MTT positivas) se concentró en el centro del esferoide (Figura 29B). La viabilidad de las células sin tratar o incubadas con la droga sin ser posteriormente irradiadas no fue afectada (Figura 29A).



**Figura 29. La terapia fotodinámica disminuye la viabilidad de esferoides de células de cáncer colorrectal.**

(A) Los esferoides de SW480 (20000 células por esferoide) se incubaron durante 24 h en ausencia (0 mM) y presencia de Me-ALA (0,3 mM) y luego fueron irradiados con dosis de luz creciente (0-1,5  $\text{J/cm}^2$ ). A las 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control sin irradiar. Los valores de DL50 para cada línea celular fueron determinados a través de la confección de curvas dosis-respuesta aplicando una regresión no-lineal a los datos (GraphPad Prism). (B) Imágenes en campo claro de los esferoides en donde se evidencia en oscuro el área de células vivas (MTT positivas).

Estos resultados mostraron que con condiciones terapéuticas equivalentes en términos de concentración de prodroga y dosis de luz, los esferoides debieron ser incubados 20 h adicionales en presencia de Me-ALA para obtener efectos citotóxicos comparables entre los cultivos 2D y 3D.

Numerosos trabajos han demostrado una mayor sensibilidad de los cultivos 2D a la intervención fotodinámica en comparación con los cultivos 3D, aplicando diversos FSs como

Photofrin®<sup>36</sup>, derivado de hematoporfirina<sup>37</sup>, hipericina<sup>38</sup>, mTHPC<sup>39</sup>. Asimismo, también se observó que la sensibilidad de los esferoides disminuye de forma proporcional al aumento de su tamaño<sup>36,40</sup>. Otros investigadores mostraron que la proliferación de los esferoides fotosensibilizados se correlacionó con la intensidad de irradiación<sup>41</sup>. Asimismo, la distribución espacial del consumo fotoquímico de oxígeno dentro del esferoide es dependiente de la intensidad de la luz, afectando la citotoxicidad de la terapia<sup>42</sup>.

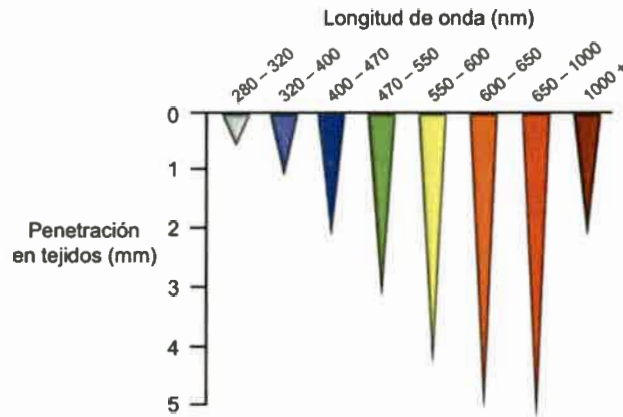
Con estos resultados iniciales, se concluye que la arquitectura tumoral influye en la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento fotodinámico. Las vías de señalización dependientes del contacto célula-célula y células-matriz, la incorporación y metabolismo heterogéneos de la droga, la hipoxia y las barreras físicas que impiden la penetración de la luz son algunos factores que pueden explicar la resistencia de los cultivos 3D a la intervención fotodinámica.

### **5.5. Análisis de factores asociados a la fotorresistencia terapéutica de los microtumores**

Como se mencionó anteriormente, los responsables del efecto fotodinámico son el FS, luz y el oxígeno. La combinación espacio-temporal de ellos resulta fundamental para la eficiencia terapéutica y es el determinante clave de la selectividad de la TFD. Del mismo modo, la falta o carencia de alguno de estos agentes condiciona el éxito del tratamiento<sup>4</sup>. Es por ello que a continuación se propuso estudiar el comportamiento de estos parámetros en relación a la respuesta fotodinámica de los cultivos tridimensionales.

#### *5.5.1. Profundidad de penetración de la luz visible*

Una de las principales limitaciones de la TFD es la profundidad de la lesión a tratar. La luz de longitud de onda de 636 nm, utilizada para excitar ciertos FS como PpIX y Photofrin, tiene la capacidad de penetrar hasta aproximadamente 5 mm (Figura 30). En este sentido, se ha reportado que el tratamiento con Photofrin logró una reducción tumoral con una profundidad promedio de 0,6 cm (rango: 0,3 a 1,5 cm) en pacientes con adenocarcinomas rectales y sigmoides<sup>43</sup>.



**Figura 30. Penetración de la luz en los tejidos a diferentes longitudes de onda..**

La profundidad de penetración en los tejidos aumenta de forma proporcional a la longitud de onda dentro del espectro UV-visible.

Imagen obtenida de <http://www.cicnetwork.es/entornoc/nuevos-materiales-de-conversion/><sup>44</sup>.

Los factores más relevantes que obstaculizan la llegada de la luz incluyen tanto la presencia de coágulos de sangre y necrosis dentro del tumor como la absorción de luz por el propio fotosensibilizador<sup>45</sup>. Otro inconveniente es el costo y el mantenimiento de las fuentes de irradiación, principalmente los equipos acoplados a láser de longitud de onda específica. Si bien este instrumental cuenta con una alta especificidad e intensidad, cuando se utiliza como FS a la PpIX, como en el presente estudio, resulta de gran utilidad la incorporación de equipos de irradiación cuyo alcance incorpore un rango más amplio de longitudes de onda. Esto se debe a que la activación de la PpIX promueve la formación de un fotoproducto denominado fotoprotoporfirina, el cual se fotoactiva al ser irradiado a una longitud de onda de 670 nm<sup>46</sup>. Es por esto que el equipo de irradiación seleccionado en este proyecto si bien cuenta con un pico de emisión de 636 nm, mantiene la capacidad de emitir, aunque a menor intensidad, longitudes de onda dentro del espectro de luz roja.

Nuestro modelo de estudio está representado por esferoides que imitan las primeras etapas de los microtumores avasculares, con un diámetro no supera 1 mm (Figura 26). Por ello, descartamos que la penetración de la luz de  $\lambda=636$  nm, con un máximo de 5 mm, sea un factor limitante que condicione el éxito terapéutico de la TFD.

### 5.5.2. Generación de Protoporfirina IX (PpIX) en esferoides de carcinoma colorrectal

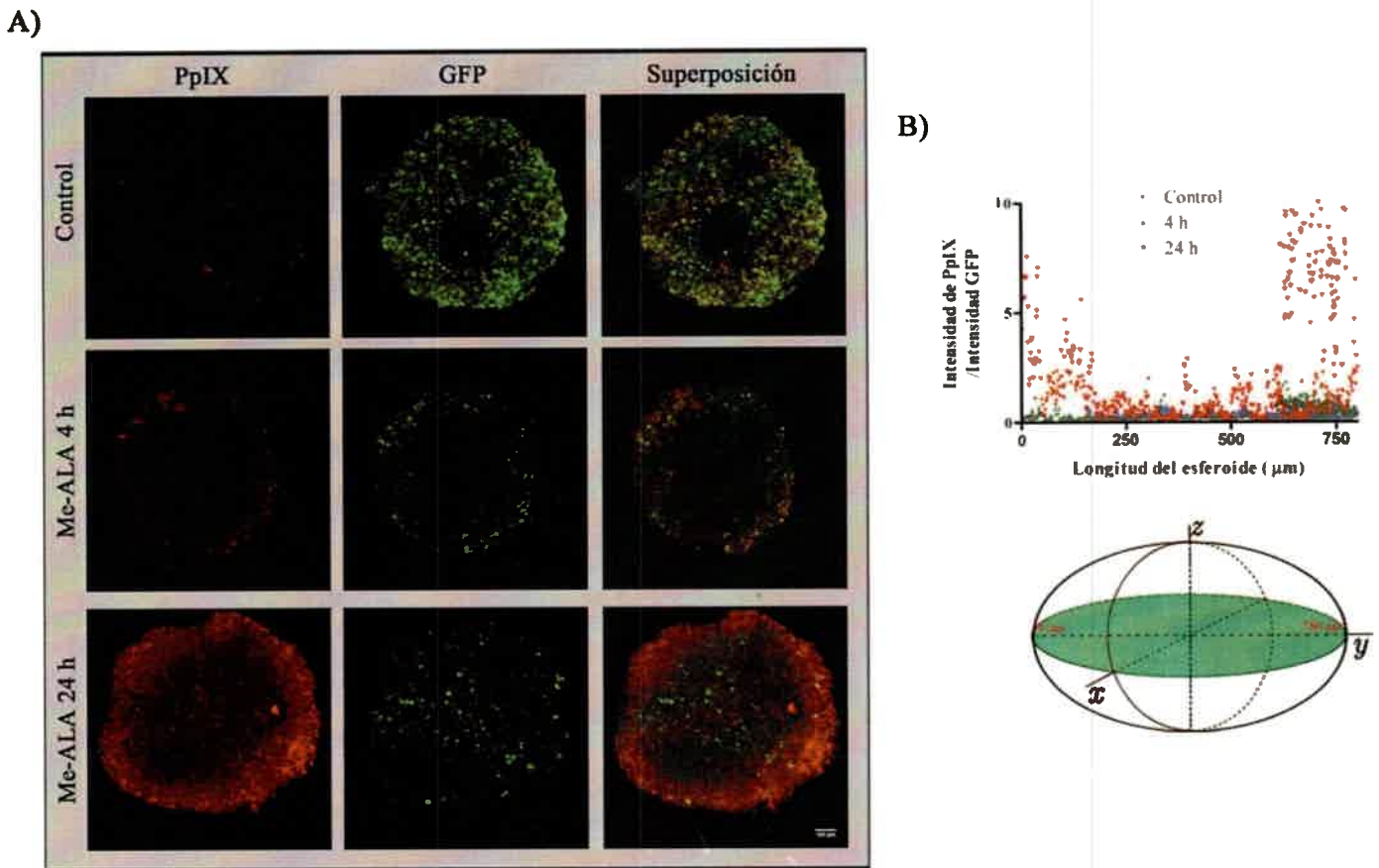
En general, se considera que la administración exógena de fotosensibilizadores otorga una mayor flexibilidad en el tiempo de espera para la posterior irradiación, ya que no requieren de la conversión de los mismos en compuestos fotorreactivos en el tejido diana. En este sentido, se ha



reportado que la irradiación utilizando Photofrin como FS puede realizarse entre 40 a 50 h después de la administración del fármaco, mientras que las aplicaciones secundarias se pueden realizar 96 a 120 horas posteriores a la inyección. Sin embargo, la fotosensibilización endógena con ALA y sus derivados requiere de la síntesis PpIX por parte del tumor. La generación de la PpIX presenta una cinética que varía entre los pacientes. Resulta fundamental determinar el momento post-inoculación en el que la concentración de PpIX en el tejido diana alcanza un nivel suficiente para que la TFD pueda ser eficiente<sup>47</sup>.

Por ello, se propuso investigar la incorporación de Me-ALA y su posterior generación de PpIX en los esferoides de carcinoma colorrectal. Para optimizar el análisis, se generó una línea estable que expresa constitutivamente GFP (SW480-G). Utilizando el clon SW480-G se generaron cultivos 3D y se incubaron con Me-ALA durante 4 y 24 h, tiempos correspondientes al tratamiento convencional y al protocolo modificado propuesto en este trabajo, respectivamente. De esta forma, la población de células viables fue GFP +, mientras que PpIX presentó fluorescencia roja.

La generación de PpIX fue significativa a las 24 h de incubación de los esferoides con Me-ALA (Figura 31). Los valores de fluorescencia de PpIX se normalizaron con los valores de fluorescencia de GFP, marcador de células viables, para descartar que la disminución de la fluorescencia del FS se deba a una disminución de la viabilidad celular (Figura 31B). De esta manera, al analizar los perfiles de intensidad de las señales en la sección media del eje z por microscopía confocal, se observó que la distribución del fotosensibilizador no fue homogénea en todo el plano xy del esferoide, siendo mayor en la periferia del mismo y disminuyendo hacia el centro (Figura 31).



**Figura 31. La formación de PpIX en cultivos no es homogénea luego de 24 hs de incubación con Me-ALA.**

Los esferoides de SW480-G (20000 células por esferoide) se incubaron durante 4 y 24 h con Me-ALA (0,3 mM). (A) La fluorescencia de PpIX ( $\lambda_{exc}$ : 514 nm;  $\lambda_{em}$ : 585 nm) y GFP (células viables) se observó por microscopía confocal en la sección media del esferoide.

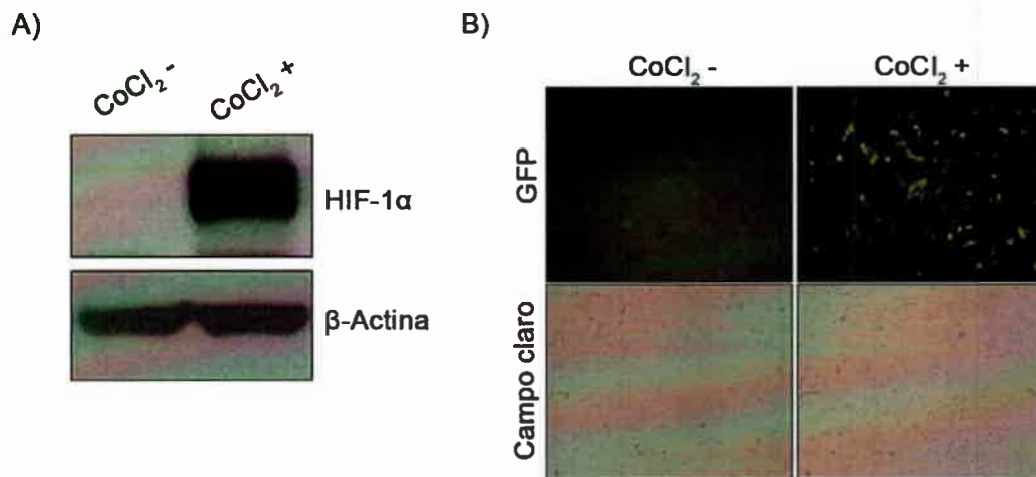
(B) La cuantificación de PpIX se realizó mediante un gráfico del perfil de intensidad de fluorescencia a lo largo de la dirección horizontal de la sección media del eje z del esferoide (línea roja sobre la zona verde en la representación esquemática del esferoide), utilizando el software libre ImageJ 1.42q.

Reportes previos han mostrado una disminución de la sensibilidad al tratamiento fotodinámico bajo hipoxia debido a una menor conversión de ALA a PpIX<sup>12</sup>. La disminución del fotosensibilizador podría fundamentar al menos en parte la resistencia a la TFD observada previamente en dicho estrato celular dentro del cultivo tridimensional.

### 5.5.3. Estudio de la activación de HIF en el modelo tridimensional desarrollado

La hipoxia intratumoral es clave en la modulación de la resistencia a intervenciones antitumorales, debido en parte a que regula la incorporación y acumulación de drogas terapéuticas, evento comandados por el factor de transcripción HIF<sup>8</sup>. Por ello, se propuso caracterizar la actividad del factor de transcripción activado por hipoxia en los cultivos 3D de carcinoma colorrectal.

Como herramienta de estudio, las células SW480 fueron transfectadas de forma estable con el plásmido pEF/myc/cyto 5HRE-EGFP, cedido por el Dr. Foster (Universidad de Rochester, EE UU)<sup>48</sup>, el cual codifica para el reportero de HIF denominado HRE-GFP. Este reportero está constituido por el gen de la proteína GFP bajo el control de un promotor que contiene 5 copias de 35 pb de la región HRE del promotor de VEGF<sup>49</sup>. Las células se seleccionaron con neomicina y se aislaron a través del método de anillo de clonación (del inglés, “cloning ring”); el clon celular obtenido fue denominado SW480-HRE. La estabilización de HIF-1 $\alpha$  luego del tratamiento de las células SW480-HRE con CoCl<sub>2</sub> (Figura 32A) se correlacionó con un aumento en la fluorescencia de GFP (Figura 32B). De esta manera se corroboró la sensibilidad y especificidad de esta herramienta para investigar los cambios en el patrón de expresión de HIF en función de los diferentes tratamientos o esquemas experimentales que posteriormente serán aplicados. Teniendo en cuenta que HIF-1 y HIF-2, a pesar de regular la expresión génica de forma diferencial, comparten características estructurales y se unen al elemento HRE<sup>50-52</sup>, la línea SW480-HRE permitirá evaluar eficientemente la actividad de ambas isoformas.

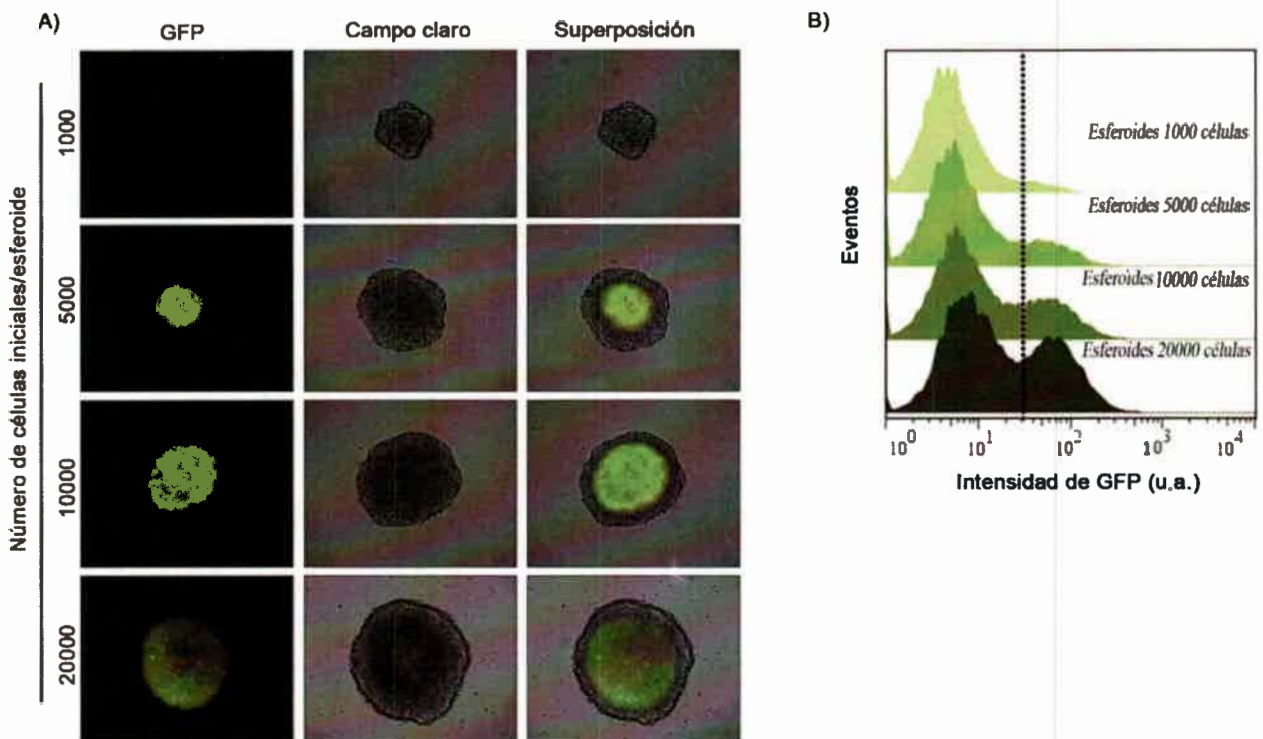


**Figura 32. El clon celular SW480-HRE es un herramienta eficiente para detectar la actividad de HIF.**

La línea celular SW480 fue transfectada establemente con el plásmido pEF/myc/cyto5HRE-EGFP, el cual codifica para el reportero de HIF denominado HRE-GFP. Este reportero está constituido por el gen de la proteína GFP bajo el control de un promotor que contiene 5 copias de 35 pb de la región HRE del promotor de VEGF. El clon celular aislado fue denominado SW480-HRE. Para corroborar la sensibilidad y especificidad de esta herramienta, el clon SW480 HRE fue tratado con CoCl<sub>2</sub> (400  $\mu$ M) durante 24 h. (A) Posteriormente, las proteínas se recolectaron utilizando el buffer RIPA y alícuotas conteniendo cantidades equivalentes (60  $\mu$ g) fueron sembradas en SDS-PAGE 8% y transferidas a membranas PVDF. Para la detección de HIF-1 $\alpha$  se utilizó un anticuerpo monoclonal contra HIF-1 $\alpha$  (R&D – MAB1536) y para la detección de  $\beta$ -actina se utilizó un anticuerpo monoclonal contra  $\beta$ -actina (Calbiochem – CP01). Los complejos inmunes fueron detectados por quimioluminiscencia. (B). La expresión se correlacionó con el aumento de fluorescencia de GFP observado por microscopia de fluorescencia directa.

Los esferoides multicelulares son novedosos modelos experimentales que imitan los gradientes de  $O_2$ , pH y nutrientes que se observa en un tumor real vivo<sup>53,54</sup>. Antecedentes previos demostraron que los cultivos tridimensionales desarrollan los estratos hipóxicos característicos de las neoplasias<sup>55-59</sup>.

Para confirmar que los cultivos tridimensionales de células SW480 representan un microambiente hipóxico con alta actividad de HIF, se generaron esferoides del clon SW480-HRE a partir de número de células iniciales crecientes. Luego de 3 días, los microtumores resultantes presentaron un aumento del diámetro proporcional al número de células iniciales. Las imágenes de microscopía de fluorescencia demostraron que la activación de HIF incrementó proporcionalmente con el diámetro de los esferoides (Figura 33A), lo que se corroboró al cuantificar la expresión de GFP (células HIF +) por citometría de flujo (Figura 33B).

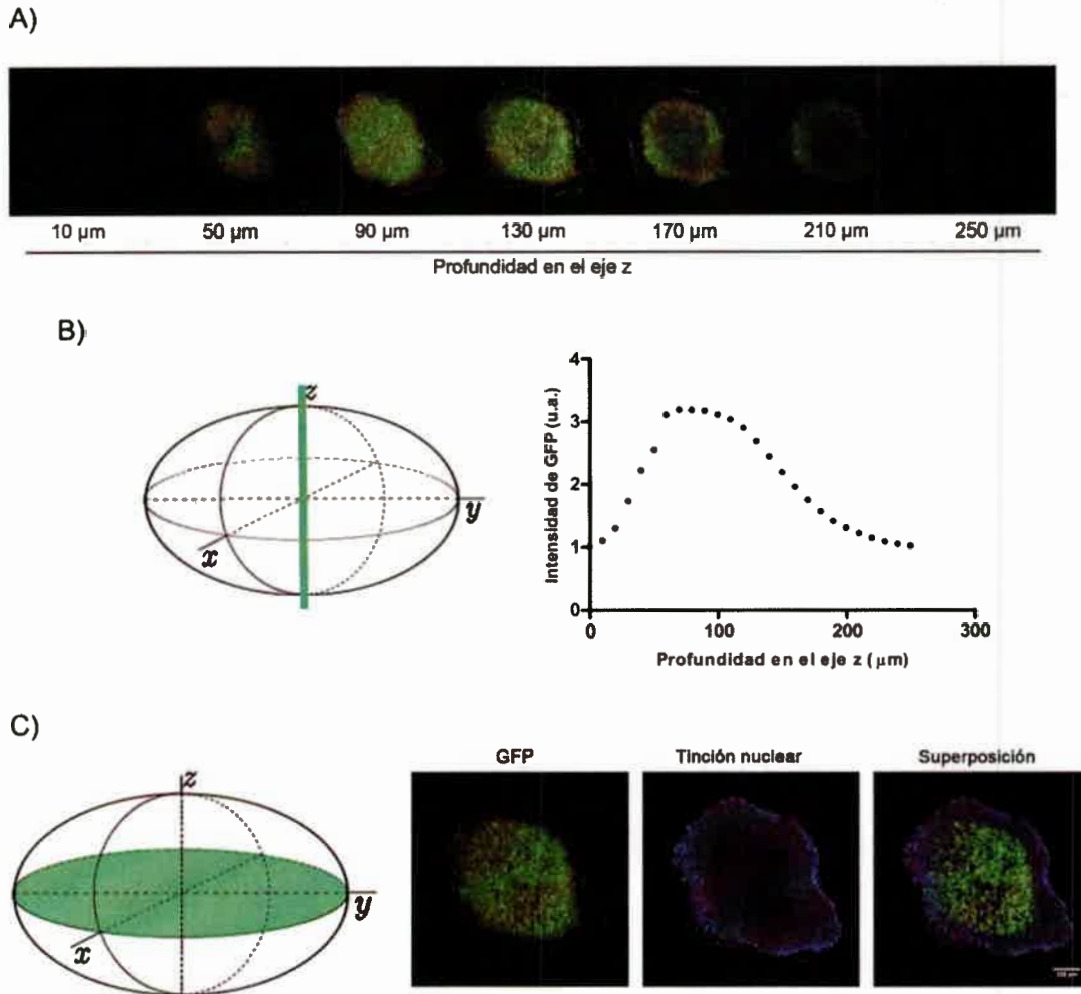


**Figura 33. La actividad de HIF en los esferoides tumorales es proporcional a su tamaño.**

Se generaron esferoides a partir de 1000, 5000, 10000 y 20000 células iniciales del clon SW480-HRE utilizando la técnica "cubierta líquida" durante 72 h. (A) Se tomaron fotografías de campo claro y fluorescencia utilizando un microscopio de epifluorescencia. (B) Los histogramas correspondientes a la fluorescencia de GFP cuantificada por citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo; la línea de puntos vertical marca la división entre la población GFP positiva (derecha) y GFP negativa (izquierda).

El análisis de las diferentes secciones en el eje z del cultivo 3D se realizó por microscopía confocal (Figura 34A). Al cuantificar la expresión de GFP en los diferentes estratos intratumorales, se demostró que las células hipóxicas GFP + comenzaron a observarse a aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de

la periferia (Figura 34A y 34B), probablemente debido a la distancia máxima de difusión del  $O_2$ <sup>60</sup>. Al evaluar la imagen correspondiente al corte medio del esferoide donde convergen los ejes y, x y z, se confirmó que las regiones hipóxicas GFP + se concentraron en el centro del esferoide (Figura 34C), zona que anteriormente se observó que era más resistente a la TFD.



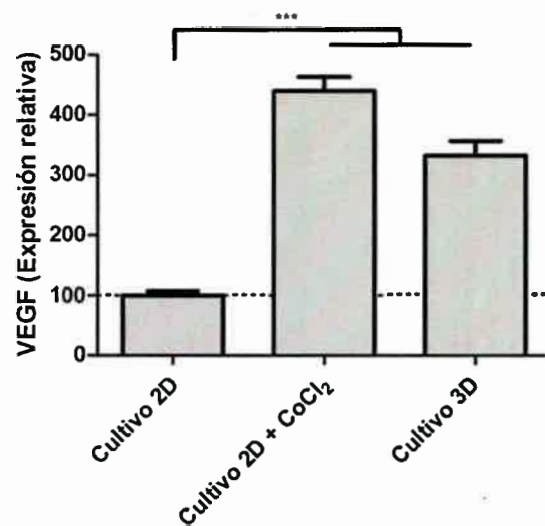
**Figura 34. Los esferoides multicelulares de SW480 representan el microambiente hipóxico.**

Se generaron esferoides a partir de 20000 células iniciales del clon SW480-HRE utilizando la técnica "cubierta líquida", durante 72 h. (A) Se tomaron fotografías por microscopía confocal a lo largo del eje z. (B) La fluorescencia de GFP en los diferentes estratos intratumorales se cuantificó utilizando el software ImageJ 1.42q. (C) Las regiones hipóxicas (GFP +) se concentraron en el centro de los esferoides, evento observado a través de la superposición con imágenes representativas de tinción nuclear. Este análisis fue realizado en fotografías correspondientes a la sección media donde convergen los ejes y, x y z (zona verde en la representación esquemática del esferoide).

La activación de HIF en las zonas de baja presión de  $O_2$  dentro del tumor regula la expresión de numerosos genes asociados a fenómenos de progresión tumoral. Entre ellos se encuentra el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), modulador clave del proceso de angiogénesis

desencadenado como mecanismo de adaptación a la hipoxia intratumoral<sup>61</sup>. Por ello, a continuación, con el fin de corroborar la semejanza de los esferoides de carcinoma colorrectal con los microtumores avasculares hipóxicos, se cuantificó el ARNm de VEGF.

La expresión de VEGF aumentó significativamente luego de la incubación de los cultivos 2D con el mimético de hipoxia  $\text{CoCl}_2$  y en los cultivos 3D (Figura 35), en comparación a los cultivos creciendo en monocapa, evento asociado positivamente al aumento de HIF reportado en ensayos anteriores (sección 5.2 y 5.5.3). Estos resultados sustentan la aplicación de esferoides tumorales como estrategia experimental utilizada para imitar microtumores hipóxicos, cuyo fenotipo de adaptación a la hipoxia se encuentra activo y regulado por HIF.

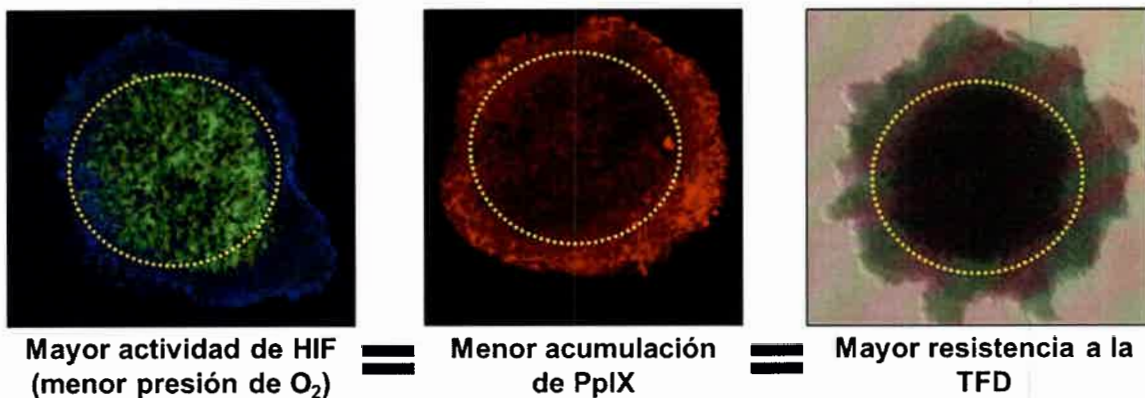


**Figura 35. VEGF se encuentra sobreexpresado en esferoides tumorales.**

Las células SW480 crecidas en monocapa fueron incubadas durante 24 h en normoxia en ausencia (Cultivo 2D) y presencia de  $400 \mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  (Cultivo 2D +  $\text{CoCl}_2$ ) y bajo condiciones experimentales que permitieran la formación de esferoides tridimensionales (20000 células iniciales, técnica LO, 72 h de incubación en medio no proliferativo) (Cultivos 3D). El ARN total fue extraído con Trizol, según las instrucciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies). Para la retrotranscripción se utilizó la enzima M-MLV (Invitrogen), partiendo de 1  $\mu\text{g}$  de RNA, según protocolo del fabricante. Las expresiones génicas fueron determinadas mediante qPCR con el termociclador LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France) usando SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio). Los niveles relativos de ARNm se calcularon según:  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = [(CT \text{ gen en la muestra} - CT \text{ 18S en la muestra}) - (CT \text{ gen en el control} - CT \text{ } \beta\text{-18S en el control})]$  y los valores de expresión se normalizaron a los valores obtenidos en el cultivo 2D. Análisis estadístico: Anova en una vía, Bonferroni post-test, \*\*\*  $p < 0,001$ .

Dentro de los genes regulados por HIF se encuentran la ferroquelatasa, enzima removedora de PpIX debido a que cataliza la adición de hierro para convertirla en hemo<sup>62,63</sup>, y ABCG2 (del inglés “ATP-binding cassette sub-family G member 2”), bomba exportadora de PpIX al exterior de la célula<sup>3,5,64,65</sup>. Asimismo, se ha reportado una asociación directa entre la inhibición de la sensibilidad al tratamiento fotodinámico bajo hipoxia con una menor conversión de ALA a PpIX<sup>12</sup>.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de genes regulados por el factor HIF-1 $\alpha$ , independientemente de la presión de oxígeno ambiental, le confiere a las células tumorales un fenotipo resistente al tratamiento fotodinámico. Estas observaciones podrían ser fundamentadas al menos en parte por la correlación entre la disminución de la fluorescencia de PpIX observada en el centro del esferoide con la activación de HIF evidenciada en esta misma zona (Figura 36). Estos resultados concuerdan con lo observado en la sección 5.2, en donde se evidencia que la inducción química de hipoxia confiere resistencia a la intervención fotodinámica *in vitro*.

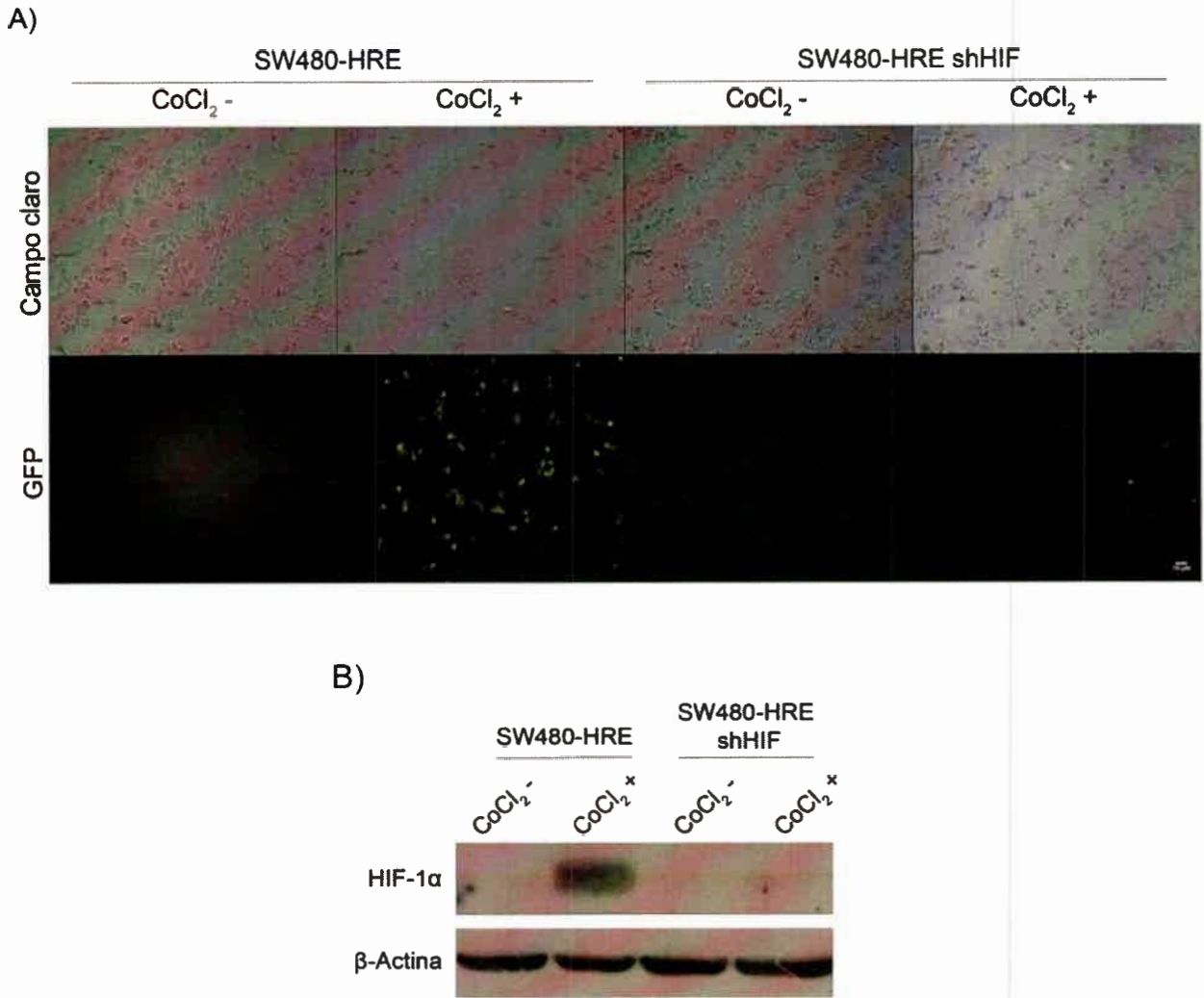


**Figura 36. Relación entre actividad de HIF, acumulación de PpIX y eficiencia terapéutica de la TFD.**

*En las áreas centrales de los esferoides tumorales se observa un aumento significativo de la actividad de HIF. Por otro lado, se genera un gradiente negativo de PpIX desde la periferia hacia el centro. Estos eventos podrían explicar al menos en parte la resistencia a la fotosensibilización reportada en el interior de los microtumores.*

### 5.6. Relevancia del bloqueo de HIF-1 $\alpha$ en la sensibilidad de las células tumorales al tratamiento fotodinámico

Con el fin de confirmar la relevancia funcional de HIF en la respuesta tumoral a la TFD, las células SW480-HRE se infectaron con lentivirus portadores del vector pLKO.1-shRNA-HIF-1 $\alpha$ -1, cedido por el Dr. Eric Metzen (University of Duisburg-Essen, Alemania)<sup>66</sup>. Este vector codifica el ARN de interferencia contra el ARNm de la subunidad HIF-1 $\alpha$ . Las células se seleccionaron con puromicina y se aislaron a través del método de anillo de clonación (del inglés, “cloning ring”); el clon celular obtenido fue denominado SW480-HRE-shHIF. La estabilización de HIF-1 $\alpha$  luego del tratamiento de las células SW480-HRE con CoCl<sub>2</sub> (Figura 37B, Western Blot) se correlacionó con un aumento en la fluorescencia de GFP (Figura 37A, Microcopia de Fluorescencia). En cambio, en la línea SW480-HRE-shHIF, el tratamiento con CoCl<sub>2</sub> falló en incrementar tanto la expresión como la actividad de HIF-1 $\alpha$  debido a la presencia de ARN interferente (Figura 37). De esta manera, se corroboró la eficiencia de esta nueva línea como herramienta para investigar el papel de HIF en los protocolos de fotosensibilización.



**Figura 37. El clon celular SW480-HRE-shHIF es un herramienta eficiente para detectar la actividad de HIF.**

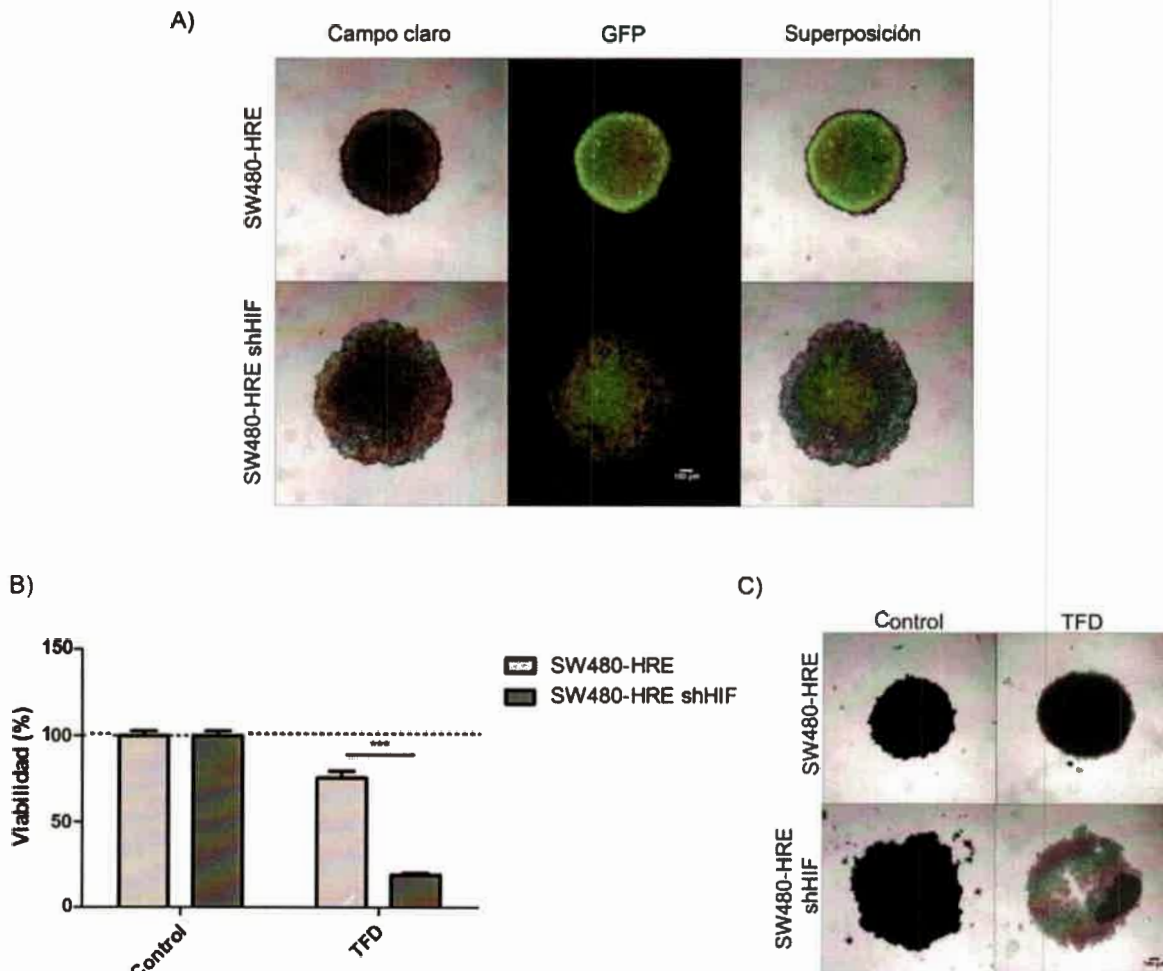
La línea celular SW480-HRE fue infectada con vectores lentivirales portadores del vector pLKO.1-shRNA-HIF-1α-1, el cual codifica para el ARN de interferencia contra el ARNm de la subunidad HIF-1α. El clon celular aislado fue denominado SW480-HRE-shHIF. Para corroborar la sensibilidad y especificidad de esta herramienta, las líneas SW480-HRE y SW480-HRE-shHIF fueron tratadas con CoCl<sub>2</sub> (400 μM) durante 24 h. (A) La inhibición en la expresión de HIF-1 se correlacionó con una disminución de fluorescencia de GFP observado por microscopía de fluorescencia invertida. (B) Las proteínas totales se recolectaron utilizando el buffer RIPA y alícuotas conteniendo cantidades equivalentes (60 μg) fueron sembradas en SDS-PAGE 8% y transferidas a membranas PVDF. Para la detección de HIF-1α se utilizó un anticuerpo monoclonal contra HIF-1α (R&D – MAB1536) y para la detección de β-actina se utilizó un anticuerpo monoclonal contra β-actina (Calbiochem – CP01). Los complejos inmunes fueron detectados por quimioluminiscencia.

Dado que la estabilización de HIF-1α en condiciones de normoxia incrementó la resistencia a la TFD (sección 5.2) y que las zonas hipóxicas dentro de los cultivos 3D fueron menos susceptibles a



la TFD (sección 5.4), se propuso analizar si el silenciamiento de este factor de transcripción podría inducir una mayor sensibilidad terapéutica en esferoides de carcinoma colorrectal.

Para ello, se generaron esferoides a partir de las líneas SW480-HRE y SW480-HRE-shHIF. En primer lugar, se examinaron las diferencias morfológicas y funcionales de los microtumores de tres días de crecimiento. El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  estuvo asociado a un aumento en el diámetro de las estructuras tridimensionales formadas y a una notable supresión de la actividad de HIF en el centro del esferoide, evidenciada por una disminución de la fluorescencia del gen reportero GFP (Figura 38A). Del mismo modo, se buscó determinar el efecto de la inhibición del factor de transcripción en la viabilidad celular luego de la intervención fotodinámica. Se determinó que la citotoxicidad de la TFD fue significativamente mayor sobre esferoides de la línea SW480-HRE-shHIF, en comparación con su contraparte SW480-HRE (Figura 38B y 38C). Estos resultados permiten confirmar la implicancia negativa del factor HIF-1 sobre el efecto citotóxico de la TFD.



**Figura 38. El silenciamiento de HIF-1 $\alpha$  induce sensibilidad a la intervención fotodinámica.**

(A) La expresión de GFP en los esferoides de SW480-HRE y SW480-HRE-shHIF de 3 días de crecimiento (20000 células por esferoide) se observó mediante microscopía de fluorescencia invertida. (B) Los esferoides fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,2 J/cm<sup>2</sup>. A las 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la

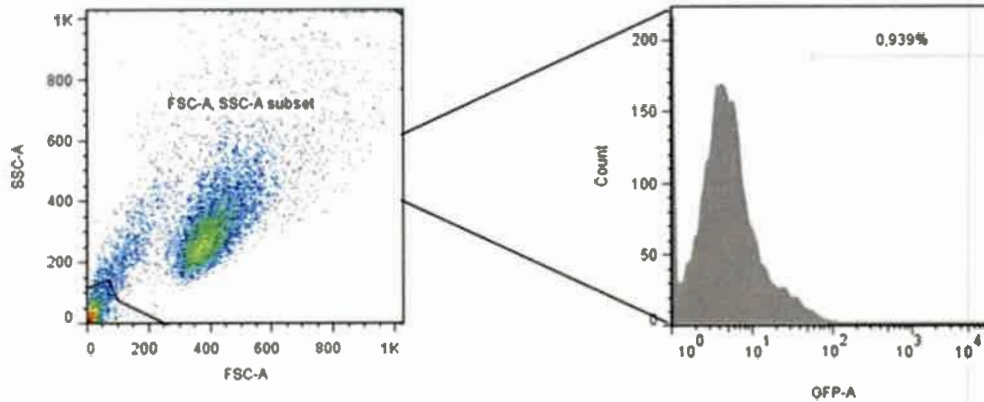
viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control. Análisis estadístico: Anova en dos vías. Bonferroni post-test, \*\*\*  $p < 0,001$ . (C) Imágenes en campo claro de los esferoideos en donde se evidencia en oscuro el área de células vivas (MTT positivas). Referencias: control, células sin tratar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

Recientemente, se reportó un estudio realizado *in vivo* en donde se combinó la terapia fotodinámica con nanopartículas portadoras de HIF-1 $\alpha$  siARN para el tratamiento de cáncer de cuello y cabeza. Los autores demostraron que la combinación de ambas terapéuticas incrementó la regresión tumoral a través de la inducción de apoptosis y la disminución de la proliferación tumoral y angiogénesis<sup>67</sup>. Estos datos apoyan lo observado en el presente trabajo, en donde la inhibición de HIF-1 $\alpha$  indujo una fuerte sensibilidad al posterior tratamiento fotodinámico.

### **5.7. Impacto de la terapia fotodinámica sobre la actividad transcripcional de HIF en microtumores hipóxicos de carcinoma colorrectal**

Experimentalmente, los cultivos 2D convencionales se caracterizan por una oxigenación rica y uniforme. En cambio, los cultivos 3D pueden capturar las limitaciones de oxígeno que caracterizan a un tumor *in vivo*. En este sentido, se evaluará el impacto de la intervención fotodinámica en la expresión de HIF-1 $\alpha$  sobre cultivos 3D, que permiten predecir mejor el resultado de terapias oxígeno-dependiente, como la TFD<sup>68</sup>.

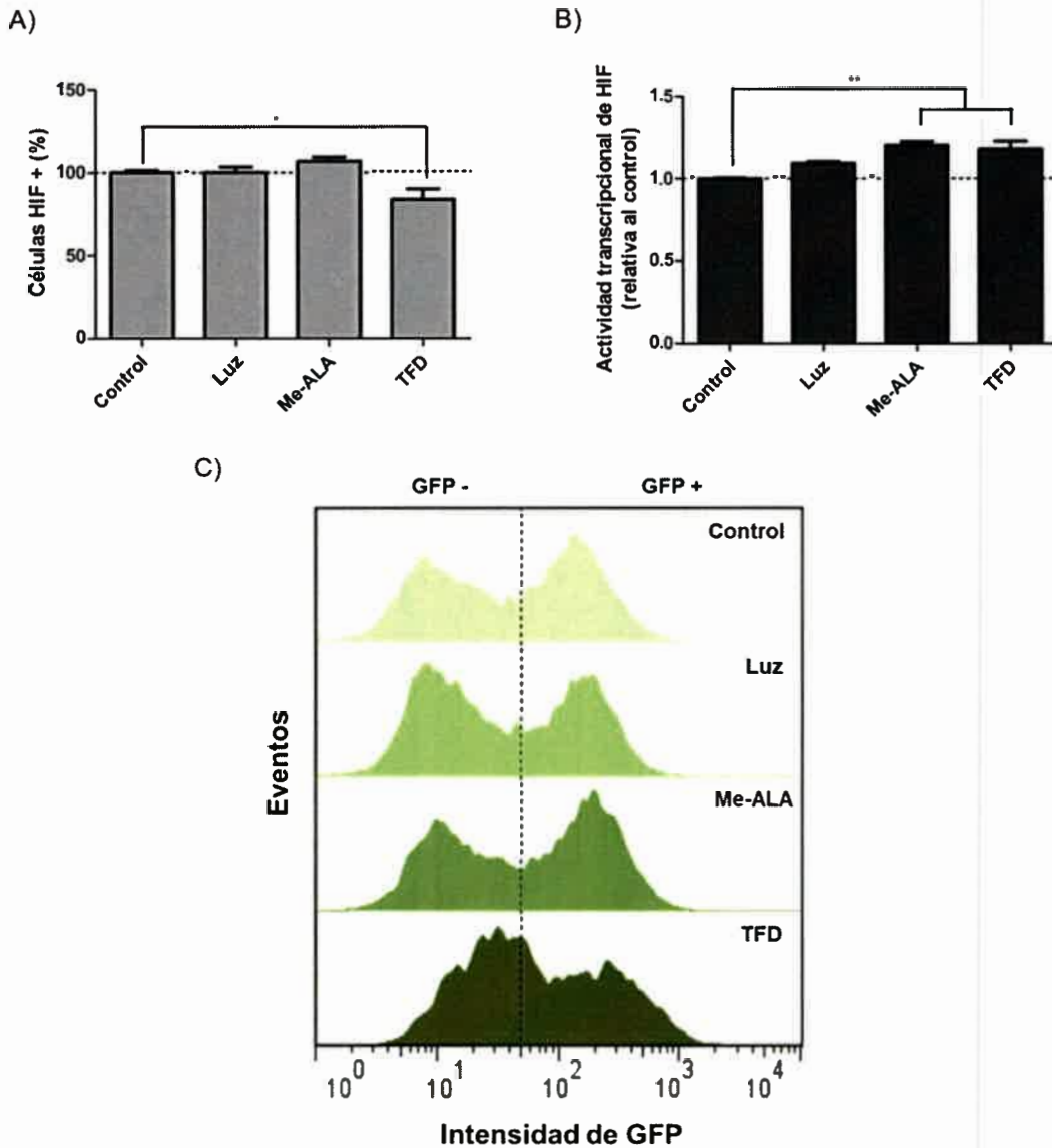
Para evaluar el efecto de la TFD sobre la actividad de HIF, se utilizó como herramienta la línea SW480-HRE. La proteína GFP es considerada un buen reportero de la expresión génica en células eucariotas individuales cuando se mide su fluorescencia por citometría de flujo<sup>69,70</sup>. En este trabajo, el análisis de los datos obtenidos comenzó con la exclusión de los puntos que no representaban a células viables, es decir, aquellos puntos con valores bajos en SSC (granularidad) y FSC (tamaño). A continuación, se identificó la población de células GFP +, indicador de las células HIF +, y se cuantificó la intensidad de fluorescencia mediana (IFM) de esta población, la cual representó la actividad transcripcional de este factor de transcripción. Los puntos de corte se establecieron con el control negativo, es decir, células SW480-HRE crecidas en monocapa (expresión basal de GFP del 1%) (Figura 39).



**Figura 39.** La línea SW480-HRE se utilizó como herramienta para evaluar la expresión y actividad de HIF.

A partir de la región de células viables en el gráfico SCC vs FSC, se seleccionó la población de células GFP + (indicador de las células HIF +) y se cuantificó la intensidad de fluorescencia mediana de GFP (indicador de la actividad transcripcional de HIF). Los puntos de corte se establecieron con el control negativo, es decir, células SW480-HRE crecidas en monocapa (expresión basal de GFP del 1%).

Los cultivos 3D de células SW480-HRE de tres días de crecimiento fueron divididos en 4 grupos: 1) sin tratamiento (control), 2) irradiados en ausencia de Me-ALA, 3) incubados con Me-ALA y 4) incubados con Me-ALA y posteriormente irradiados con dosis de luz letales (TFD). La expresión del gen reportero se evaluó 12 h post-tratamiento por citometría de flujo (Figura 40). El porcentaje de células HIF + disminuyó leve aunque significativamente luego del tratamiento fotodinámico, en comparación con esferoides que no recibieron tratamiento (Figura 40A). Sin embargo, la actividad transcripcional de HIF se vio ligeramente aumentada de forma significativa en aquellos esferoides que sólo recibieron Me-ALA o TFD (Figura 40B).



**Figura 40. La terapia fotodinámica induce la activación de HIF en esferoides de carcinoma colorrectal.**

Los esferoides de SW480-HRE (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. La expresión de GFP se evaluó 12 h post-TFD mediante citometría de flujo. (A) El porcentaje de células HIF + se normalizó con el porcentaje correspondiente a esferoides sin tratamiento (línea de puntos = 100%) \* =  $p < 0,05$  (Anova de una vía, Bonferroni post-test). (B) La actividad transcripcional de HIF, representada por la intensidad de fluorescencia mediana de GFP (IFM), se normalizó con la actividad correspondiente a esferoides sin tratamiento (línea de puntos = 100%) \*\* =  $p < 0,01$  (Anova de una vía, Bonferroni post-test). (D) Los histogramas correspondientes a la fluorescencia de GFP se analizaron con el software FlowJo. La línea de puntos vertical marca la división entre la población GFP + (derecha) y GFP - (izquierda). Referencias: control, células sin tratar; luz, células irradiadas sin la droga; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

Varios reportes han identificado un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  luego de la TFD<sup>21,48,71,72</sup>. En concordancia con nuestros resultados, en estudios *in vitro* se demostró un incremento de la unión de HIF-1 $\alpha$  a su secuencia consenso HRE 12 h post-TFD<sup>72</sup>.

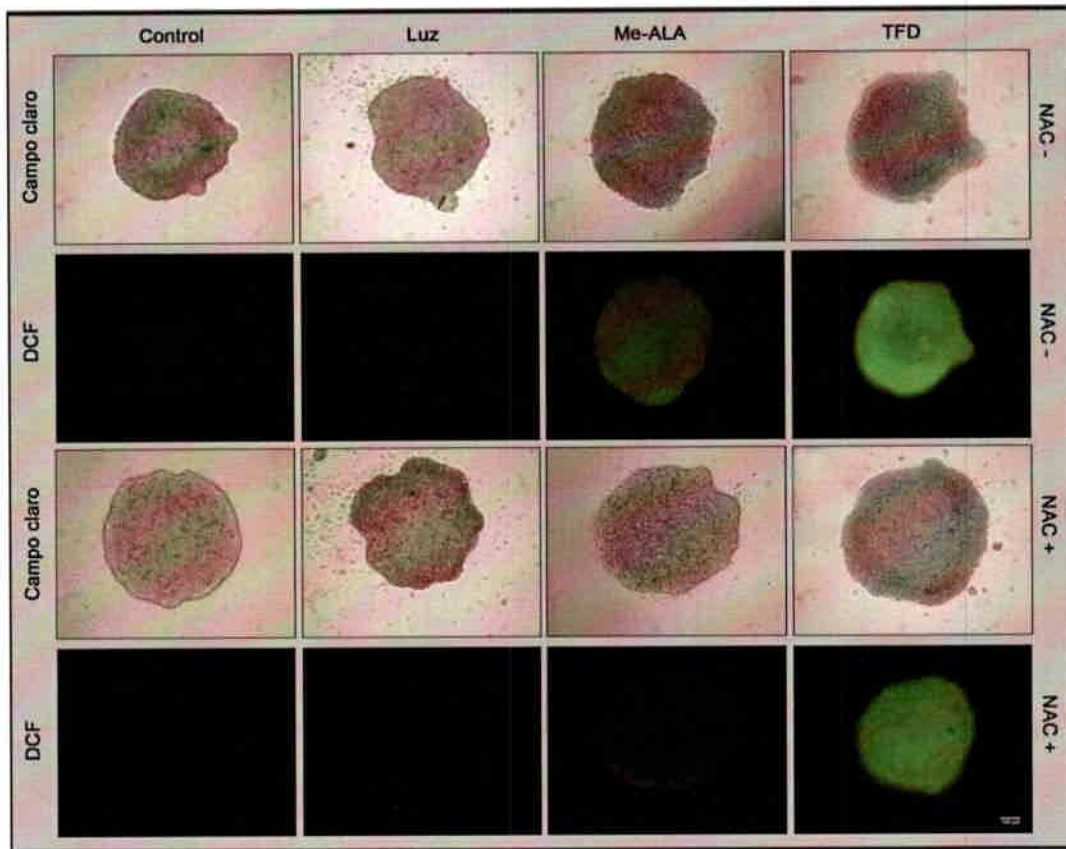
Sin embargo, este aumento de la actividad de HIF luego del tratamiento resulta contradictorio si se considera que las células hipóxicas ubicadas en el centro del esferoide, más resistentes a la TFD, quedarían expuestas al oxígeno (reoxigenadas) al morir las células fotosensibles de la periferia. Se han reportado dos mecanismos que podrían explicar lo observado. En primer lugar, la TFD puede inducir la generación de especies reactivas del oxígeno y éstas producir la activación de HIF<sup>73,74</sup>. En segundo lugar, se ha demostrado que la estabilización de HIF luego de la reoxigenación de tumores sometidos a radioterapia está relacionada a gránulos de estrés. Estos gránulos de estrés están compuestos por complejos proteína-ARNm sintetizados por las células durante periodos de estrés cuya función sería prevenir el consumo de energía debido a la traducción de proteínas. La formación de gránulos de estrés está asociada a la hipoxia, y su desagregación ocurre durante la reoxigenación del tumor. La despolimerización de estos complejos libera transcriptos regulados por HIF, que incluyen aquéllos involucrados en procesos como la supervivencia celular y angiogénesis<sup>70</sup>.

#### **5.8. Participación del estrés oxidativo sobre la activación de HIF antes y después del tratamiento fotodinámico**

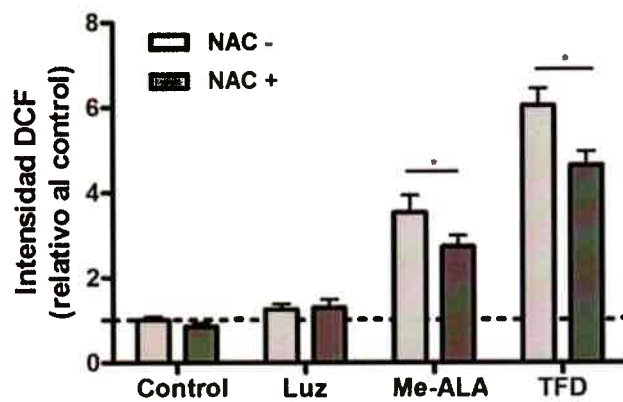
Las especies reactivas del oxígeno han sido involucrados tanto en la regulación de HIF<sup>74</sup> como en el mecanismo de citotoxicidad ejercido por la TFD<sup>73,75</sup>. Por ello, se midió el estrés oxidativo luego del tratamiento fotodinámico utilizando el reactivo fluorescente DCFH-DA<sup>76</sup>.

El estrés oxidativo de los esferoides tumorales aumentó significativamente cuando fueron incubados con Me-ALA (3,53±1,06 veces) y luego del tratamiento fotodinámico (6,04±1,08 veces) en comparación con esferoides sin tratar, proceso revertido parcialmente por la presencia del antioxidante NAC (Figura 41).

A)



B)



**Figura 41. La incubación con Me-ALA y la terapia fotodinámica inducen estrés oxidativo.**

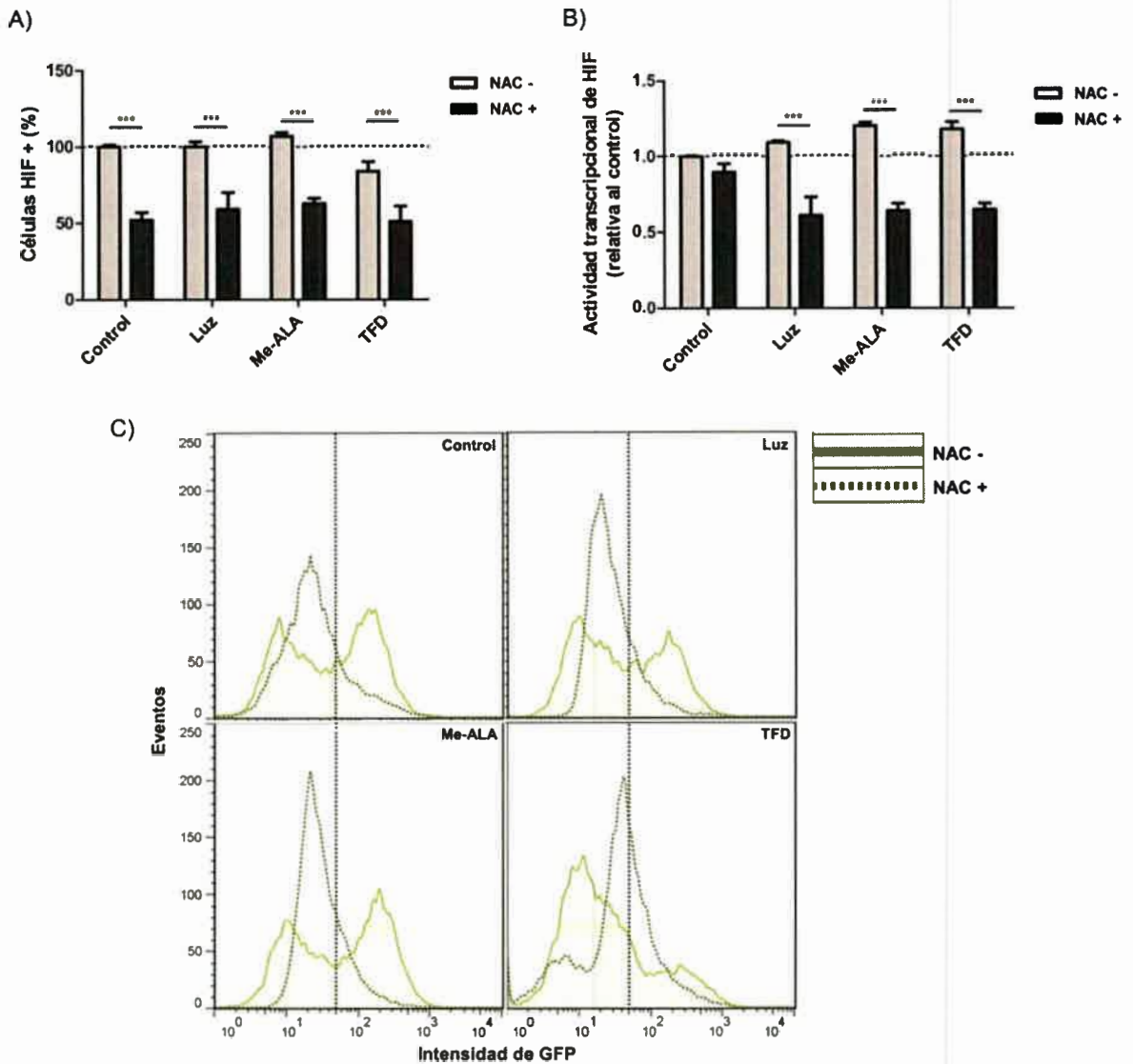
Los esferoides de SW480 (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de  $0,7 \text{ J/cm}^2$ . Inmediatamente después del tratamiento fotodinámico, los esferoides fueron lavados con PBS e incubados con  $7 \mu\text{M}$  de DCFH-DA en medio mínimo sin rojo fenol durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . (A) La fluorescencia de DCF se observó mediante microscopía de fluorescencia invertida. (B) Se cuantificó la fluorescencia en las imágenes obtenidas utilizando el software libre ImageJ 1.42q. \* =  $p < 0,05$  (Anova en dos vías, Bonferroni post-test). Referencias: control, células sin tratar; luz, células irradiadas sin la droga; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

En el presente trabajo se demostró que la generación del fotosensibilizador PpIX a partir de la prodroga Me-ALA, a pesar de no afectar la viabilidad celular, promovió la producción de ROS en esferoides tumorales. La conversión de Me-ALA a PpIX tiene lugar en la mitocondria celular<sup>77</sup>, principal fuente de ROS endógeno. Es probable que el desequilibrio en el metabolismo mitocondrial durante la generación de PpIX altere la cadena transportadora de electrones y consecuentemente induzca el desequilibrio redox intracelular. Durante el tratamiento fotodinámico, al excitar la PpIX con luz de longitud de onda adecuada, la generación de ROS se incrementó significativamente, aumentando el estrés oxidativo con posteriores daños letales para el tumor.

Estos resultados demostraron que la activación de HIF luego del tratamiento fotodinámico o de la incubación con Me-ALA se correlacionó con el aumento del estrés oxidativo en esferoides de carcinoma colorrectal. Por ello, se propuso determinar si el estrés oxidativo generado por el tratamiento fotodinámico está directamente involucrado en la activación de HIF.

Los esferoides generados a partir de la línea SW480-HRE se incubaron con el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) antes de la fotosensibilización, y luego se cuantificó la actividad transcripcional de HIF por citometría de flujo.

El porcentaje de células HIF + disminuyó significativamente (Figura 42A) tanto en los microtumores intervenidos como en los no intervenidos con la terapéutica. Asimismo, la actividad transcripcional de HIF, evidenciada a través de IMF de GFP, se redujo significativamente al inhibir el estrés oxidativo (Figura 42B), excepto en aquellos esferoides que no recibieron tratamiento.

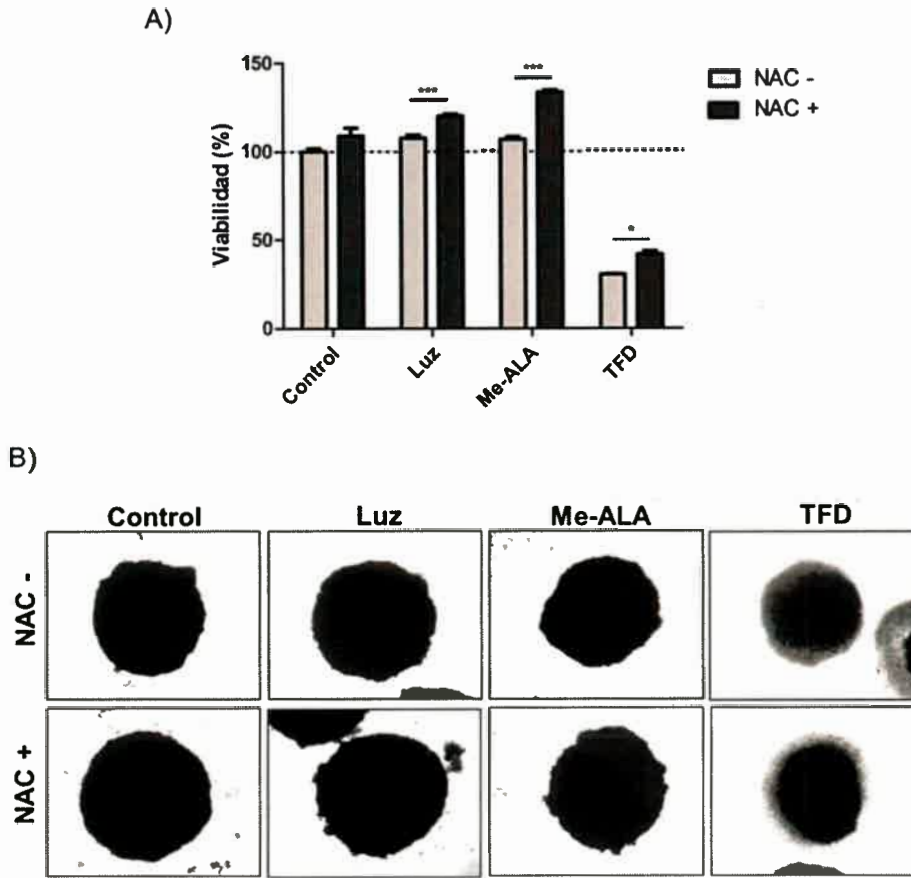


**Figura 42. El estrés oxidativo modula a HIF en esferoides de carcinoma colorrectal.**

Los esferoides de SW480-HRE (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) en presencia o ausencia de inhibidores de estrés oxidativo (NAC, 30 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. La expresión de GFP se evaluó 12 h post-TFD mediante citometría de flujo. (A) El porcentaje de células HIF+ se normalizó con el porcentaje correspondiente a esferoides sin tratamiento (línea de puntos = 100%) \*\*\* =  $p < 0,001$  (Anova de dos vías, Bonferroni post-test). (B) La actividad transcripcional de HIF, representada por la intensidad de fluorescencia mediana de GFP (IFM), se normalizó con la actividad correspondiente a esferoides sin tratamiento (línea de puntos = 100%) \*\*\* =  $p < 0,001$  (Anova de dos vías, Bonferroni post-test). (C) Los histogramas correspondientes a la fluorescencia de GFP se analizaron con el software FlowJo. La línea de puntos vertical marca la división entre la población HIF+ (derecha) y HIF- (izquierda). Referencias: control, células sin tratar; luz, células irradiadas sin la droga; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

A pesar de que HIF está involucrado en mecanismos de supervivencia celular en respuesta a terapias antitumorales<sup>8</sup>, la supresión de su actividad por NAC estuvo acompañada por un aumento de la resistencia al tratamiento fotodinámico (Figura 43), en concordancia con reportes previos<sup>78,79</sup>.





**Figura 43. El antioxidante NAC aumenta la fotorresistencia de esferoides tumorales.**

Los esferoides de SW480-HRE (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) en presencia o ausencia de inhibidores de estrés oxidativo (NAC, 30 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. (A) 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control sin irradiar (línea de puntos = 100%) \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  (Anova de dos vías, Bonferroni post-test). (B) Imágenes en campo claro de los esferoides evidenciando en oscuro el área de células vivas (MTT positivas). Referencias: control, células sin tratar; luz, células irradiadas sin la droga; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

Teniendo en cuenta que el principal mecanismo de acción de la TFD es ejercido por la generación de ROS<sup>73</sup>, la presencia de NAC suprimiría en parte su efecto citotóxico. Por lo tanto, en este modelo experimental, el antioxidante tiene funciones duales y opuestas en relación a la viabilidad celular: por un lado inhibe un mediador molecular clave de supervivencia, y por otro remueve los moduladores del daño celular.

Diversos reportes indican que las especies reactivas del oxígeno estabilizan a HIF-1 debido a su actividad inhibitoria sobre las prolihdroxilasas (PHD), enzimas encargadas de direccionar la degradación de HIF<sup>80,81</sup>. Tanto el anión superóxido como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son capaces de oxidar el ion hierro, cofactor esencial de estas enzimas<sup>82-84</sup>. Recientemente ha tomado relevancia la teoría de que el

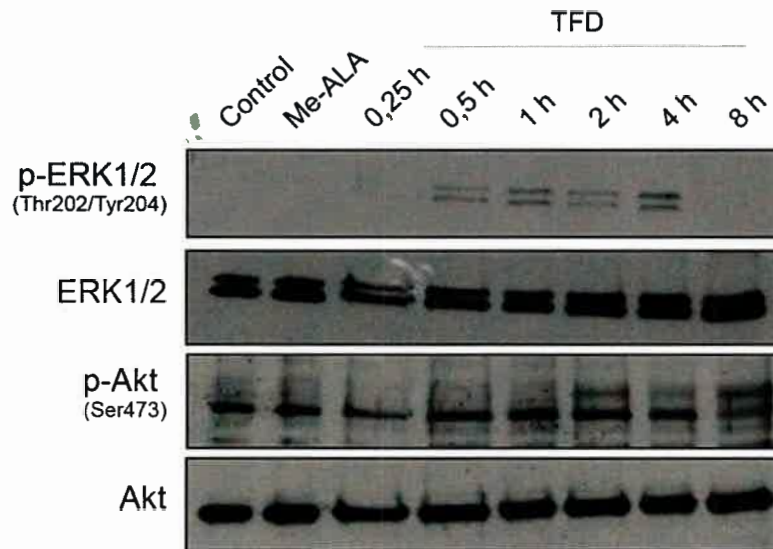
oxígeno en las células no sólo es sentido por las PHDs, sino que son las ROS generadas por las mitocondrias bajo condiciones de hipoxia las que conducen a la estabilización de HIF-1 $\alpha$ <sup>83,84</sup>. En primer lugar, se demostró que células sin mitocondrias funcionales no fueron capaces de aumentar los niveles de HIF-1 $\alpha$  en respuesta a hipoxia. En segundo lugar, estas mismas células estabilizaron HIF-1 $\alpha$  en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo cual fue revertido por catalasa<sup>83</sup>. Estas evidencias explicarían lo observado en este trabajo con respecto a la correlación entre el estrés oxidativo de los esferoides de carcinoma colorrectal sometidos o no al tratamiento fotodinámico y la activación de HIF.

Estos resultados demuestran que las ROS, tanto endógenas como las inducidas por la TFD, actúan como reguladores positivos de la actividad de HIF en cultivos tridimensionales hipóxicos de carcinoma colorrectal. Sin embargo, el rol que juegan las especies reactivas en controlar los niveles y actividad de HIF es complejo e interrelacionado, y puede involucrar diferentes señalizaciones intercelulares. En este sentido, se ha señalado al estrés oxidativo como estimulador de las vías PI3K/Akt y RAF/MEK/ERK, ambas involucradas en la regulación transcripcional y post-traducciona de HIF-1 $\alpha$ <sup>80</sup>.

### **5.9. Participación de vías de transducción de señales sobre la activación de HIF post-TFD**

La expresión y actividad de HIF está regulada por una variedad de mecanismos que actúan sobre su transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, interacción proteína-proteína y degradación dependiente de ubiquitinación, tanto en normoxia como en hipoxia. El estrés oxidativo y su relación sobre las vías de señalización MEK/ERK y PI3K/Akt, han sido involucrados tanto en la regulación de HIF<sup>74</sup> como en la respuesta intracelular a la intervención fotodinámica<sup>85</sup>. Por esta razón, a continuación se propuso investigar el efecto de la TFD sobre la activación de estas vías de transducción de señales.

Los esferoides de SW480-HRE fueron sometidos a condiciones letales del tratamiento fotodinámico, y se evaluó la fosforilación de Akt y ERK1/2 a diferentes tiempos luego de la irradiación en presencia de Me-ALA por Western Blot. No se evidenció un cambio significativo en la activación de Akt. Sin embargo, se demostró que pERK1/2 aumentó a partir de los 30 min posteriores a la TFD y se mantuvo activada hasta las 4 h (Figura 44).



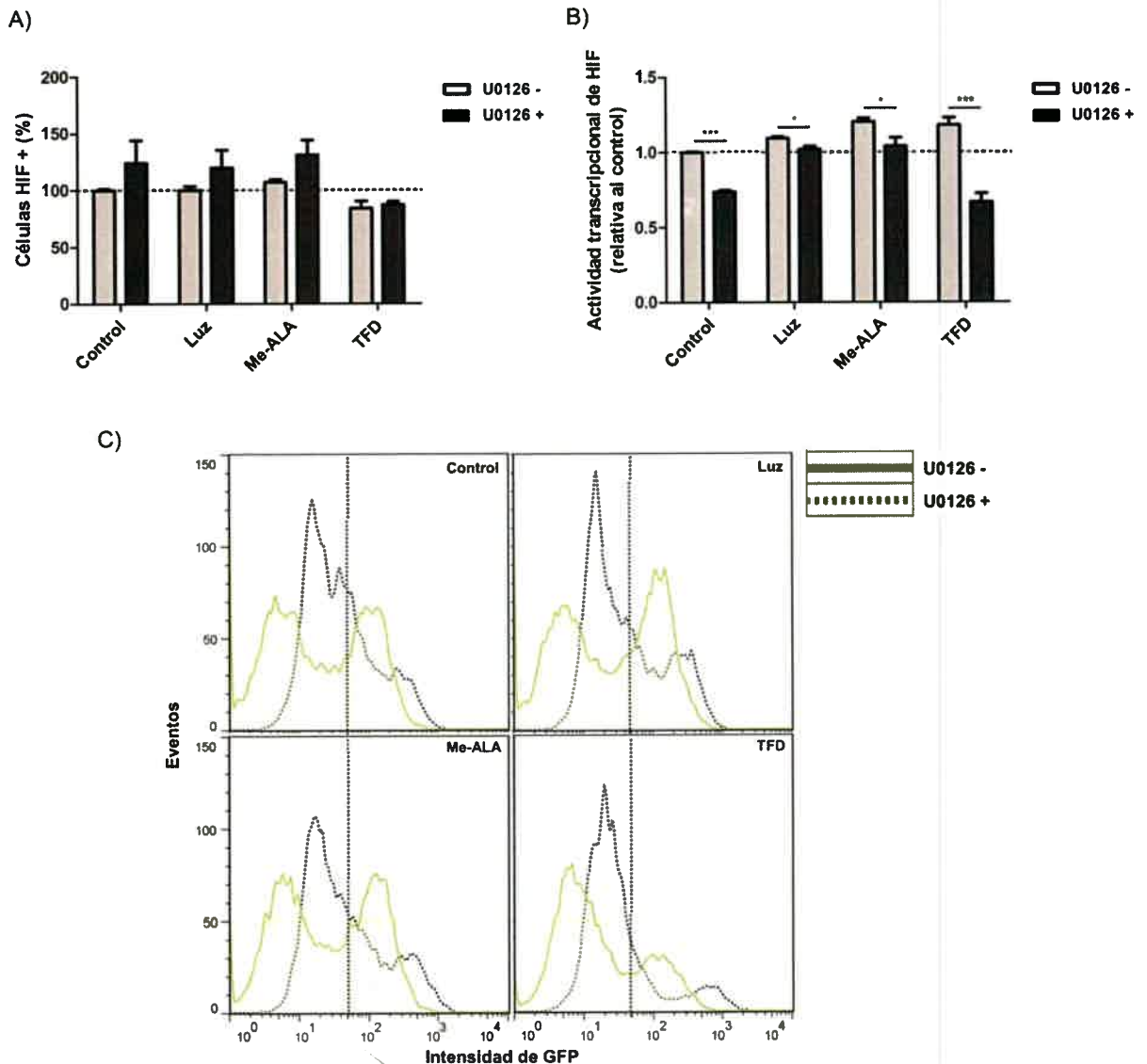
**Figura 44. La terapia fotodinámica aumenta la fosforilación de ERK1/2 sin modificar a Akt.**

Los esferoides de SW480 (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. Se recolectaron proteínas a diferentes tiempos post-tratamiento (0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 8 horas) utilizando el buffer RIPA. Aliquotas conteniendo cantidades equivalentes de proteínas (60 µg) fueron sembradas en SDS-PAGE 10% y luego transferidas a membranas PVDF. Para la detección de pERK1/2 se utilizó un anticuerpo monoclonal contra p-ERK1/2 (sc-7383) y para la detección de p-Akt se utilizó un anticuerpo policlonal (Cell Signaling #9271); como control de carga se utilizó ERK1/2 y Akt totales. Referencias: Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

Tanto la activación de ERK1/2 como la de Akt se encuentra asociada a la supervivencia celular. Sin embargo, los datos reportados en relación a la modulación fotodinámica de estas proteínas resultan ambiguos, por lo que se concluye que su actividad varía dependiendo del tipo de célula, el fotosensibilizador utilizado y la dosis de luz aplicada<sup>85</sup>. En el modelo experimental y bajo las condiciones utilizadas en el presente trabajo, se demostró que sólo la vía de supervivencia que involucra la activación de ERK1/2 fue regulada positivamente por la intervención fotodinámica.

Con el fin de determinar si la fosforilación observada de ERK1/2 es relevante en la activación de HIF, los cultivos 3D de células SW480-HRE de tres días de crecimiento se incubaron durante 24 h con el inhibidor de MEK1/2 denominado U0126.

La inhibición selectiva de ERK1/2 indujo una disminución de la actividad de HIF, evidenciada a través de la intensidad de GFP por citometría de flujo (Figura 45B), aunque sin cambio significativo en el porcentaje de células HIF + (Figura 45A). Estos datos sugieren a la vía MEK/ERK como regulador positivo de la actividad transcripcional de HIF.



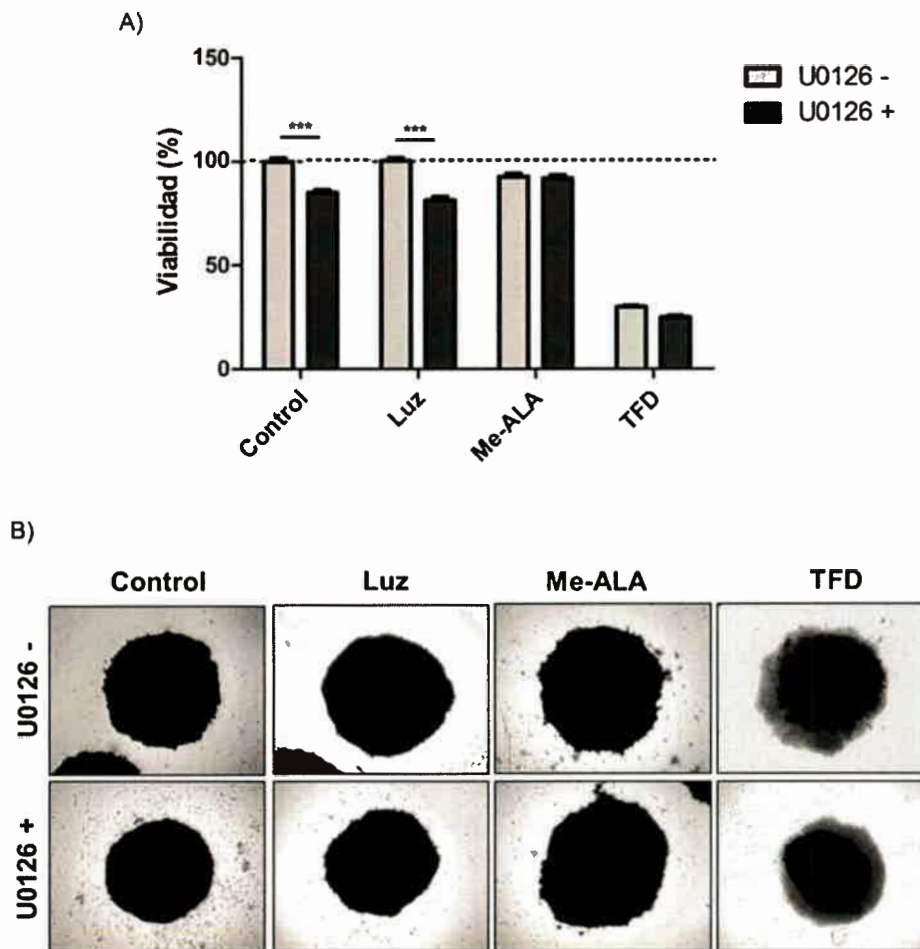
**Figura 45. Las vías MEK/ERK modulan positivamente a HIF en esferoides de carcinoma colorrectal fotosensibilizados.**

Los esferoides de SW480-HRE (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) en presencia o ausencia de inhibidores de MEK1/2 (U0126, 30  $\mu$ M) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. La expresión de GFP se evaluó 12 h post-TFD mediante citometría de flujo. (A) El porcentaje de células HIF+ se normalizó con el porcentaje correspondiente a esferoides sin tratamiento (línea de puntos = 100%). (B) La actividad transcripcional de HIF, representada por la intensidad de fluorescencia mediana de GFP (IFM), se normalizó con la actividad correspondiente a esferoides sin tratamiento (línea de puntos = 100%) \* =  $p < 0,05$ , \*\*\* =  $p < 0,001$  (Anova de dos vías, Bonferroni post-test). (C) Los histogramas correspondientes a la fluorescencia de GFP se analizaron con el software FlowJo. La línea de puntos vertical marca la división entre la población HIF+ (derecha) y HIF- (izquierda). Referencias: control, células sin tratar; luz, células irradiadas sin la droga; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

Actualmente, hay dos modelos propuestos que describen el efecto de la fosforilación de HIF-1 $\alpha$  por ERK1/2 y su consecuente activación transcripcional<sup>86</sup>. En primer lugar, se señaló como sitio de fosforilación a los residuos de serina 641 y serina 643, los cuales están involucrados en la interacción entre HIF-1 $\alpha$  y CRM1/Exportina1, proteína encargada de la exportación nuclear. De este

modo, la fosforilación del factor de transcripción en estos residuos bloquea su señal de exportación nuclear y así incrementa su acumulación en núcleo<sup>87</sup>. En segundo lugar, se demostró que ERK2 no fosforila a HIF-1 $\alpha$  directamente en el dominio C-TAD, sino que fosforila a p300/CBP, promoviendo de esta forma la interacción entre HIF-1 $\alpha$  y su co-activador, aumentando la actividad transcripcional<sup>88</sup>.

A pesar de la inhibición de la actividad transcripcional de HIF observada al suprimir la vía MEK1/2/ERK1/2, la respuesta de los esferoides tumorales al tratamiento fotodinámico no se vio afectada en presencia de U0126 (Figura 46).



**Figura 46. El inhibidor de MEK1/2 U0126 no afecta la respuesta al tratamiento fotodinámico de esferoides tumorales.**

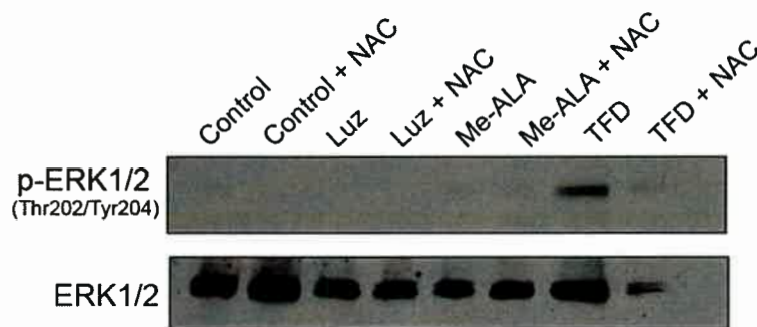
Los esferoides de SW480-HRE (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) en presencia o ausencia de inhibidores de estrés oxidativo (U0126, 30  $\mu$ M) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. (A) 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control sin irradiar (línea de puntos = 100%) \*\*\* =  $p < 0,001$  (Anova de dos vías, Bonferroni post-test). (B) Imágenes en campo claro de los esferoides en donde se evidencia en oscuro el área de células vivas (MTT positivas). Referencias: control, células sin tratar; luz, células irradiadas sin la droga; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

### 5.10. Implicancia del estrés oxidativo inducido por la TFD en la activación de ERK1/2

Los resultados del presente trabajo han demostrado la modulación positiva de HIF por las vías MEK1/2/ERK1/2 y las especies reactivas del oxígeno activadas en respuesta al estímulo fotodinámico.

Hay evidencia que indica que las especies reactivas del oxígeno actúan como moléculas de señalización que pueden inducir modificaciones que inhiben o estimulan la actividad de los componentes celulares<sup>89</sup>. Diversos reportes han mostrado un aumento en la fosforilación de ERK1/2 dependiente de especies reactivas del oxígeno<sup>90,91</sup>. Por ello, en función a los resultados expuestos, a continuación se propuso investigar si la respuesta de los esferoides de carcinoma colorrectal a TFD vincula las ROS generadas y la fosforilación de ERK1/2.

Por ello, los esferoides de carcinoma colorrectal pre-tratados con NAC con el fin de inhibir el estrés oxidativo fueron sometidos a la TFD. La fosforilación de ERK1/2 se evaluó 30 minutos luego del tratamiento. Se demostró que la inhibición del estrés oxidativo suprimió la activación de la vía MEK/ERK (Figura 47).

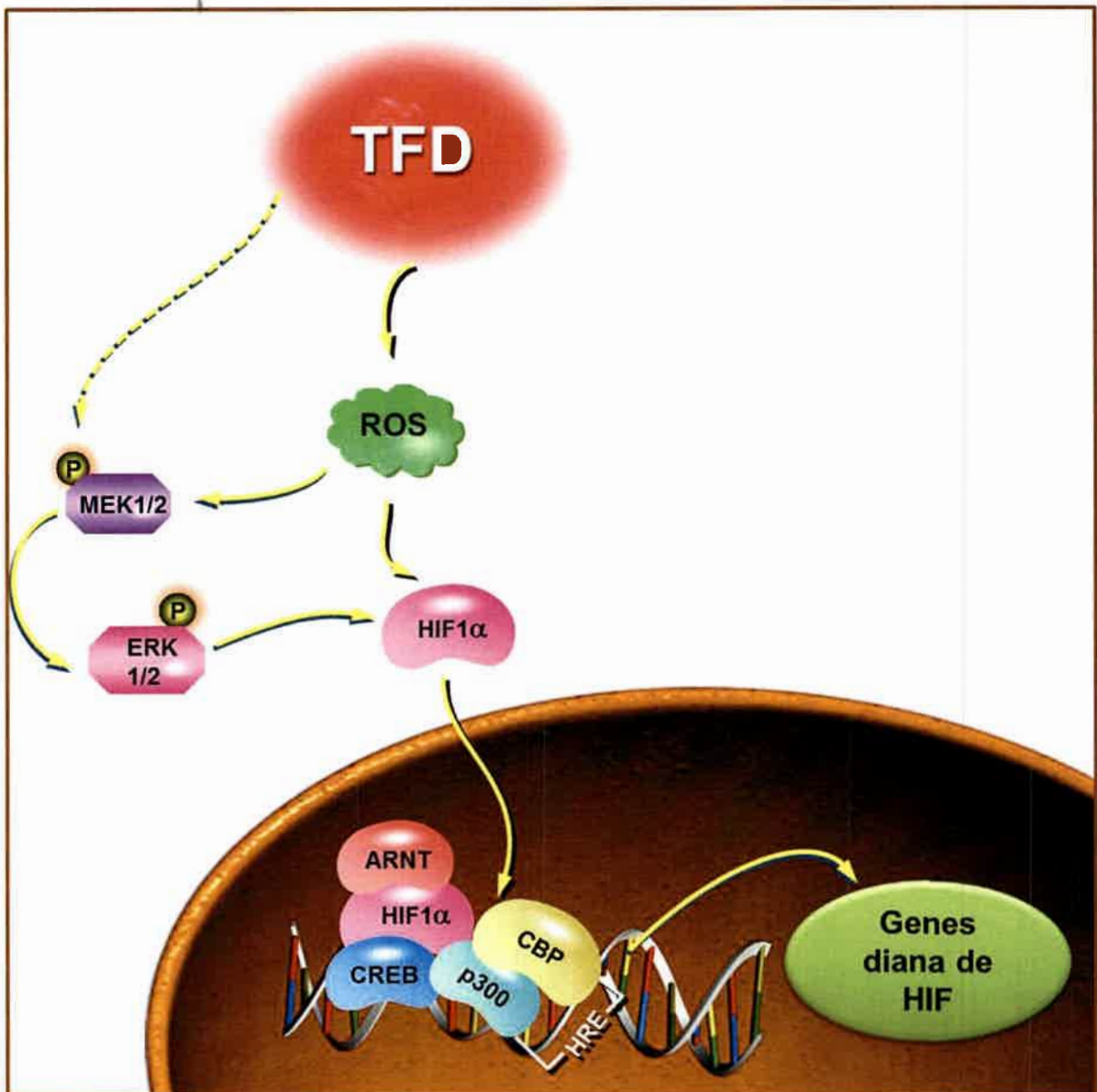


**Figura 47. El estrés oxidativo inducido por la TFD es el responsable de la activación de ERK1/2.**

Los esferoides de SW480 (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h en presencia o ausencia de inhibidores de estrés oxidativo (NAC, 30 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. Se recolectaron proteínas a 30 min luego del tratamiento utilizando el buffer RIPA. Alicuotas conteniendo cantidades equivalentes de proteínas (60 µg) fueron sembradas en SDS-PAGE 10% y luego transferidas a membranas PVDF. Para la detección de pERK1/2 se utilizó un anticuerpo monoclonal contra p-ERK1/2 (sc-7383); como control de carga se utilizó ERK1/2 total. Referencias: control, células sin tratar; luz, células irradiadas sin la droga; Me-ALA, células incubadas con la droga sin irradiar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

Estos resultados permitieron dilucidar la implicancia de la TFD en la regulación del factor de transcripción HIF-1. Se demostró que la fotosensibilización disminuyó el nivel de células viables que expresaban HIF 12 h post tratamiento. Sin embargo, en aquellas células en donde HIF se encontraba presente, su actividad transcripcional se vio incrementada. Se identificó por primera vez el rol del eje TFD → ROS sobre la modulación de HIF, mostrando que la vía ERK1/2 podría también contribuir a

la activación del factor de transcripción post-TFD en los microtumores hipóxicos de carcinoma colorrectal (Figura 48).



**Figura 48. Modelo propuesto de la regulación de HIF por la TFD.**

*La terapia fotodinámica fue capaz de activar la vía MEK1/2/ERK1/2 y aumentar el estrés oxidativo intratumoral, siendo las especies reactivas del oxígeno las promotoras al menos en parte de la fosforilación de ERK1/2. Estos eventos estuvieron involucrados en la inducción de la expresión de HIF y/o su actividad transcripcional.*

Teniendo en cuenta que los datos obtenidos mostraron una disminución en el porcentaje de células HIF +, aunque acompañado de un aumento en su actividad transcripcional, a continuación se propuso evaluar el efecto que estos eventos moleculares ejercen sobre procesos biológicos involucrados en la adaptación a la hipoxia y sobre los mediadores autócrinos y parácrinos involucrados en el diálogo dentro del microambiente tumoral.

### 5.11. Caracterización del secretoma de esferoides tumorales fotosensibilizados

Los procesos biológicos que gobiernan el comportamiento tumoral están mediados no sólo por vías de señalización intracelular autónomas, sino también por interacciones célula-célula, célula-matriz y por el diálogo autócrino y parácrino que se establece de forma intercelular. Este diálogo está regulado por los factores solubles que se liberan al medio extracelular, en respuesta a las condiciones medioambientales en donde se desarrollan las células tumorales<sup>92</sup>.

El secretoma tumoral contiene todas las proteínas liberadas por las células neoplásicas al medio extracelular, a través de vías clásicas y no clásicas de secreción. La caracterización del secretoma tumoral puede realizarse utilizando fluidos biológicos próximos al tumor o también sobrenadantes de líneas celulares tumorales, conocidos como medios condicionados (MCs). Teniendo en cuenta que los MCs representan un artificio *in vitro* de menor complejidad molecular en comparación con los fluidos proximales al tumor, éstos permiten la identificación de proteínas con abundancia relativamente baja. Sin embargo, las condiciones experimentales *in vitro* deben ser controladas de forma minuciosa para poder obtener resultados reproducibles y confiables<sup>92</sup>.

En la mayoría de los estudios de secretoma *in vitro*, las células crecen en medios de cultivo libres de suero, lo que elimina las interferencias causadas por el alto contenido proteico del SFB y la contaminación de las muestras con proteínas ortólogas que comparten secuencia de aminoácidos con las proteínas de interés<sup>92</sup>. Sin embargo, la ausencia de suero (hambreando) afecta la supervivencia y proliferación celular, la producción de proteínas y los perfiles de secreción<sup>93-95</sup>. La secreción pasiva de proteínas relacionadas a la muerte celular a causa del hambreando pueden enmascarar a las proteínas que efectivamente conforman el secretoma tumoral. Por esta razón, la mayoría de los estudios de secretoma *in vitro* se realizan sobre las proteínas secretadas en un período corto de tiempo, generalmente 24 h<sup>96,97</sup>.

Por ello, en el presente estudio, los esferoides de carcinoma colorrectal fueron sometidos a condiciones letales de fotosensibilización y luego se colectaron las proteínas secretadas durante las 24 h posteriores al tratamiento. Estas proteínas contenidas en los MCs colectados constituyen el secretoma del microtumor no tratado (CT, células tumoral) y del microtumor fotosensibilizado (CT TFD). Los componentes proteicos de los MCs fueron analizados mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Las proteínas secretadas por la vía clásica fueron identificadas a través del software libre SignaP 4.1, el cual analiza la presencia del péptido señal y regiones transmembrana en la secuencia proteica<sup>98</sup>. Por otro lado, las proteínas secretadas a través de vías no clásicas fueron identificadas a través del software SecretomeP 2.0. Este algoritmo se basa en el análisis de las secuencias proteicas en búsqueda de motivos comunes encontrados en proteínas cuya secreción alternativa ha sido demostrada experimentalmente<sup>99</sup> (Tabla V).



**Tabla V. Lista de proteínas identificadas en los secretomas de esferoides no tratados (CT) y tratados con dosis letales de terapia fotodinámica (CT TFD). Se detalla el ID según UniProt, el nombre de la proteína (en idioma inglés), el gen correspondiente, la ubicación del sitio de corte del péptido señal en aquellas proteínas secretadas por la vía clásica (SignalP), el NN-score de las proteínas secretadas por vías no clásicas (SecretomeP, el NN-score debe ser mayor a 0.5), la valor de LFQ ("label-free quantification") de las proteínas en ambos secretomas, y se señalan las moléculas cuya diferencia de expresión es significativa (↑ aumento en el secretoma fotosensibilizado, ↓ disminución en el secretoma fotosensibilizado, T-test).**

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT TFD	Diferencia significativa
A2A2D0	Stathmin	STMN1	-	0,795	0,00	22,34	↑
A6NJA2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP14	-	0,620	0,00	23,05	↑
B4DLR8	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	-	0,744	23,94	24,48	-
B4DXW1	Actin-related protein 3	ACTR3	-	0,621	0,00	22,98	↑
B8ZZQ6	Prothymosin alpha	PTMA	-	0,602	26,00	30,68	↑
E5RQG3	RWD domain-containing protein 1	RWDD1	-	0,798	0,00	22,37	↑
E7EWE1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	UBA5	-	0,515	0,00	21,98	↑
E9PBS1	Multifunctional protein ADE2	PAICS	-	0,531	0,00	24,57	↑
E9PES6	High mobility group protein B3	HMGB3	-	0,770	0,00	24,61	↑
E9PS34	Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	-	0,728	0,00	24,20	↑
F5GY90	Porphobilinogen deaminase	HMBS	-	0,907	21,07	0,00	↓
F8VNT9	CD63 antigen	CD63	Segmento transmembrana	-	23,51	0,00	↓
F8VS02	Alpha-aminoacidic semialdehyde dehydrogenase	ALDH7A1	-	0,514	0,00	23,05	↑
F8VZJ2	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	-	0,681	0,00	24,91	↑
G3V3M6	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	-	0,622	23,54	23,55	-
H0YMZ1	Proteasome subunit alpha type	PSMA4	-	0,613	23,47	24,66	-
H7C3P9	COP9 signalosome complex subunit 3	COPS3	-	0,617	0,00	23,90	↑
J3KTF8	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI1	-	0,876	27,51	27,43	-
J3QS39	Polyubiquitin-B	UBB	-	0,601	22,36	25,63	-
J3QT28	Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3	-	0,760	0,00	22,56	↑
K7EMV3	Histone H3	H3F3B	-	0,817	0,00	25,25	↑
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	-	0,666	21,47	23,02	-
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	29-30	-	23,50	0,00	↓
O15498	Synaptobrevin homolog YKT6	YKT6	-	0,574	24,18	23,37	-
O43399	Tumor protein D54	TPD52L2	-	0,680	0,00	24,19	↑
O60361	Putative nucleoside diphosphate kinase	NME2P1	-	0,578	0,00	22,86	↑
O60547	GDP-mannose 4,6 dehydratase	GMDS	-	0,545	0,00	22,67	↑
O60749	Sorting nexin-2	SNX2	-	0,508	0,00	22,18	↑
O75223	Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT	-	0,503	23,95	23,21	-
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	-	0,547	21,98	22,02	-
O95861	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1	-	0,682	22,70	21,82	-
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	-	0,549	27,86	29,16	↑
P00491	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)	PNP	-	0,509	24,29	23,58	-

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT TFD	Diferencia significativa
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT1	-	0,767	22,83	0,00	↓
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	-	0,505	24,09	24,17	-
P01034	Cystatin-C	CST3	20-21	-	21,67	0,00	↓
P02786	Transferrin receptor protein 1	TFRC	-	0,611	21,81	0,00	↓
P02794	Ferritin heavy chain	FTH1	-	0,621	24,26	24,71	-
P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15	-	0,702	22,37	0,00	↓
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	-	0,725	23,15	27,44	-
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	-	0,591	0,00	22,89	↑
P06733	Alpha-enolase	ENO1	-	0,536	27,60	28,09	-
P06748	Nucleophosmin	NPM1	-	0,811	0,00	23,79	↑
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	-	0,569	27,81	28,32	-
P07237	Protein disulfide-isomerase	P4HB	17-18	-	0,00	22,95	↑
P07355	Annexin A2	ANXA2	-	0,746	24,87	25,23	-
P07384	Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1	-	0,554	0,00	22,37	↑
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	FH	-	0,551	24,24	23,52	-
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	-	0,644	22,71	0,00	↓
P08670	Vimentin	VIM	-	0,512	0,00	25,46	↑
P08758	Annexin A5	ANXA5	-	0,550	0,00	23,45	↑
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A1	SNRPA1	-	0,733	0,00	22,47	↑
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	18-19	-	0,00	24,11	↑
P12004	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	-	0,566	25,78	26,08	-
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4	24-25	-	0,00	24,17	↑
P13796	Plastin-2	LCP1	-	0,502	0,00	22,39	↑
P14324	Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	-	0,639	23,08	23,54	-
P14625	Endoplasmic reticulum chaperone protein	HSP90B1	21-22	-	0,00	25,64	↑
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	-	0,518	0,00	26,14	↑
P18085	ADP-ribosylation factor 4	ARF4	-	0,618	22,54	24,11	-
P20340	Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	-	0,703	24,49	24,19	-
P20645	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6PR	26-27	-	0,00	23,09	↑
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	GART	-	0,526	0,00	21,85	↑
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	-	0,530	0,00	25,26	↑
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	Segmento transmembrana	-	26,82	24,73	↓
P23526	Adenosylhomocysteinase	AHCY	-	0,507	27,10	27,82	-
P23528	Cofilin-1	CFL1	-	0,628	25,09	25,13	-
P26038	Moesin	MSN	-	0,530	24,66	25,83	-
P26447	Protein S100-A4	S100A4	-	0,724	0,00	22,48	↑
P27797	Calreticulin	CALR	17-18	-	0,00	24,79	↑
P27824	Calnexin	CANX	20-21	-	0,00	23,13	↑
P28070	Proteasome subunit beta type-4	PSMB4	-	0,565	22,91	23,11	-
P28074	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5	-	0,726	24,05	24,73	↑

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT TFD	Diferencia significativa
P29218	Inositol monophosphatase 1	IMPA1	-	0,577	23,75	23,56	-
P29692	Elongation factor 1-delta	EEF1D	-	0,529	0,00	24,64	↑
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	-	0,865	0,00	23,44	↑
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	-	0,562	22,53	25,06	↑
P30566	Adenylosuccinate lyase	ADSL	-	0,558	0,00	23,00	↑
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	-	0,516	24,75	25,58	-
P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	MAT2A	-	0,552	0,00	23,67	↑
P31431	Syndecan-4	SDC4	18-19	-	24,34	0,00	↓
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	-	0,522	23,52	23,45	-
P35998	26S protease regulatory subunit 7	PSMC2	-	0,713	0,00	21,95	↑
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	19-20	-	25,07	0,00	↓
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III	EIF4A3	-	0,698	0,00	25,12	↑
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	-	0,644	22,73	0,00	↓
P41250	Glycine--tRNA ligase	GARS	26-27	-	0,00	24,29	↑
P45973	Chromobox protein homolog 5	CBX5	-	0,740	0,00	22,04	↑
P46976	Glycogenin-1	GYG1	-	0,540	25,35	26,17	-
P47756	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	-	0,543	25,00	24,77	-
P50453	Serpin B9	SERPINB9	-	0,559	21,73	0,00	↓
P50454	Serpin H1	SERPINH1	18-19	-	22,68	0,00	↓
P50502	Hsc70-interacting protein arcinoma antigen	ST13	-	0,765	0,00	26,21	↑
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	-	0,508	24,34	27,17	↑
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	-	0,535	22,04	25,22	↑
P51148	Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	-	0,865	0,00	21,94	↑
P55058	Phospholipid transfer protein	PLTP	17-18	-	23,80	0,00	↓
P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6	-	0,584	22,43	23,20	-
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4	-	0,646	24,05	24,75	-
P60174	Triosephosphate isomerase	TPI1	-	0,510	27,24	26,16	↓
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E	-	0,631	0,00	22,66	↑
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-1	EIF4A1	-	0,631	23,20	26,99	-
P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	UBE2N	-	0,676	23,31	23,44	-
P62158	Calmodulin	CALM1	-	0,730	22,70	22,97	-
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	-	0,582	26,40	26,23	-
P62906	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	-	0,637	0,00	24,22	↑
P63010	AP-2 complex subunit beta	AP2B1	-	0,677	21,36	0,00	↓
P63261	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	-	0,505	27,56	29,04	↑
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	-	0,733	0,00	23,12	↑
P68366	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	-	0,550	0,00	23,04	↑
P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	-	0,501	24,55	25,55	-
P81605	Dermcidin	DCD	19-20	-	25,42	22,51	-

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT TFD	Diferencia significativa
P84077	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	-	0,508	26,71	27,19	-
P84085	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	-	0,650	0,00	23,05	↑
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	SORD	-	0,511	24,36	24,75	-
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	-	0,560	0,00	23,30	↑
Q02413	Desmoglein-1	DSG1	23-24	-	24,46	0,00	↓
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1	-	0,528	24,34	24,54	-
Q07812	Apoptosis regulator BAX	BAX	-	0,701	0,00	25,03	↑
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	TGM3	-	0,500	22,04	0,00	↓
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	18-19	-	27,57	25,04	↓
Q08554	Desmocollin-1	DSC1	32-33	-	23,74	0,00	↓
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4	-	0,636	23,03	22,69	-
Q12792	Twinfilin-1	TWF1	-	0,663	0,00	21,89	↑
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	-	0,619	0,00	22,72	↑
Q13185	Chromobox protein homolog 3	CBX3	-	0,540	0,00	23,92	↑
Q13257	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	MAD2L1	-	0,836	0,00	23,35	↑
Q13308	Inactive tyrosine-protein kinase 7	PTK7	30-31	-	21,49	0,00	↓
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	-	0,509	24,36	26,40	-
Q13885	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	-	0,765	0,00	25,42	↑
Q14019	Coactosin-like protein	COTL1	-	0,765	23,41	22,27	-
Q14126	Desmoglein-2	DSG2	23-24	-	20,92	0,00	↓
Q14974	Importin subunit beta-1	KPNB1	-	0,588	0,00	23,20	↑
Q15185	Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	-	0,729	0,00	23,58	↑
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	-	0,549	0,00	22,52	↑
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	-	0,645	0,00	22,64	↑
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFB1	23-24	-	21,88	0,00	↓
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0)	SLC1A5	-	0,734	24,03	23,04	-
Q15836	Vesicle-associated membrane protein 3	VAMP3	-	0,570	0,00	23,34	↑
Q15907	Ras-related protein Rab-11B	RAB11B	-	0,527	25,44	25,12	-
Q16401	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	PSMD5	-	0,558	0,00	22,94	↑
Q16531	DNA damage-binding protein 1	DDB1	-	0,554	0,00	23,86	↑
Q5SYZ4	Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	-	0,613	21,86	0,00	↓
Q5TEE2	Histone deacetylase 1	HDAC1	-	0,594	0,00	22,29	↑
Q8NFW8	N-acylneuraminate cytidyltransferase	CMAS	-	0,612	0,00	22,34	↑
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	20-21	-	22,72	20,35	-
Q96CN7	Isochorismatase domain-containing protein 1	ISOC1	-	0,616	0,00	21,99	↑
Q99574	Neuroserpin	SERPINI1	18-19	-	24,31	0,00	↓
Q9GZP4	PITH domain-containing protein 1	PITHD1	-	0,680	21,69	0,00	↓
Q9HB71	Calcyclin-binding protein	CACYBP	-	0,690	0,00	22,56	↑
Q9NVD7	Alpha-parvin	PARVA	-	0,811	0,00	21,95	↑

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT TFD	Diferencia significativa
Q9UBE0	SUMO-activating enzyme subunit 1	SAE1	-	0,534	0,00	22,72	↑
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13	-	0,527	0,00	24,38	↑
Q9Y2Z0	Protein SGT1 homolog	SUGT1	-	0,509	21,87	0,00	↓
Q9Y312	Protein AAR2 homolog	AAR2	-	0,517	0,00	22,43	↑
Q9Y3A5	Ribosome maturation protein SBDS	SBDS	-	0,627	0,00	22,59	↑
R4GN98	Protein S100	S100A6	-	0,709	23,25	24,22	-

En los cultivos 3D del grupo control (CT) se encontraron 84 proteínas, de las cuales el 20,23% fueron secretadas por la vía clásica y el 79,77% por la vía no clásica. El número de proteínas secretadas aumentó significativamente en los cultivos 3D fotosensibilizados (132 proteínas), en donde el 15,84% fue liberado por la vía clásica y el 84,16% por la vía no clásica (Figura 49).



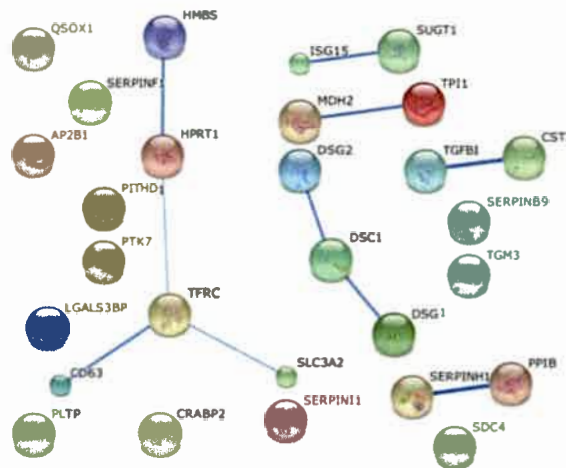
**Figura 49: Proteínas identificadas en los secretomas de esferoides de carcinoma colorrectal sometidos o no a fotosensibilización.** Las proteínas identificadas en los secretomas de los microtumores no tratados (CT) o tratados (CT TFD) con condiciones letales de tratamiento fotodinámico fueron clasificadas según su vía de secreción utilizando los software SignalP 4.1 y SecretomeP 2.0, para las vías clásicas y no clásicas, respectivamente.

En relación a estos resultados, recientemente se ha demostrado que los secretomas provenientes de células tumorales contienen gran cantidad de proteínas secretadas por vías no convencionales, en ausencia de péptido señal<sup>100</sup>. El rol de estas proteínas ha sido controversial y ha dado lugar a diversas especulaciones en los últimos años. Por un lado, se postuló que las vías de secreción no clásica podrían constituir una estrategia para incrementar la complejidad de los organismos durante la evolución y maximizar la diversidad funcional. La ausencia del péptido señal es señalada como una forma de economizar el diseño y síntesis proteica<sup>101</sup>. Otra hipótesis propone

que estas proteínas podrían ejercer múltiples roles en diversos compartimentos celulares con el objetivo de integrar funciones globales en los tejidos. Por lo tanto, las proteínas localizadas intracelularmente podrían ejercer funciones alternativas en el espacio extracelular<sup>102</sup>. En relación a los secretomas tumorales, la contribución fuerte y significativa de las vías no clásicas de secreción podría utilizarse tanto para el descubrimiento de nuevos biomarcadores como para dianas terapéuticas específicas<sup>100</sup>.

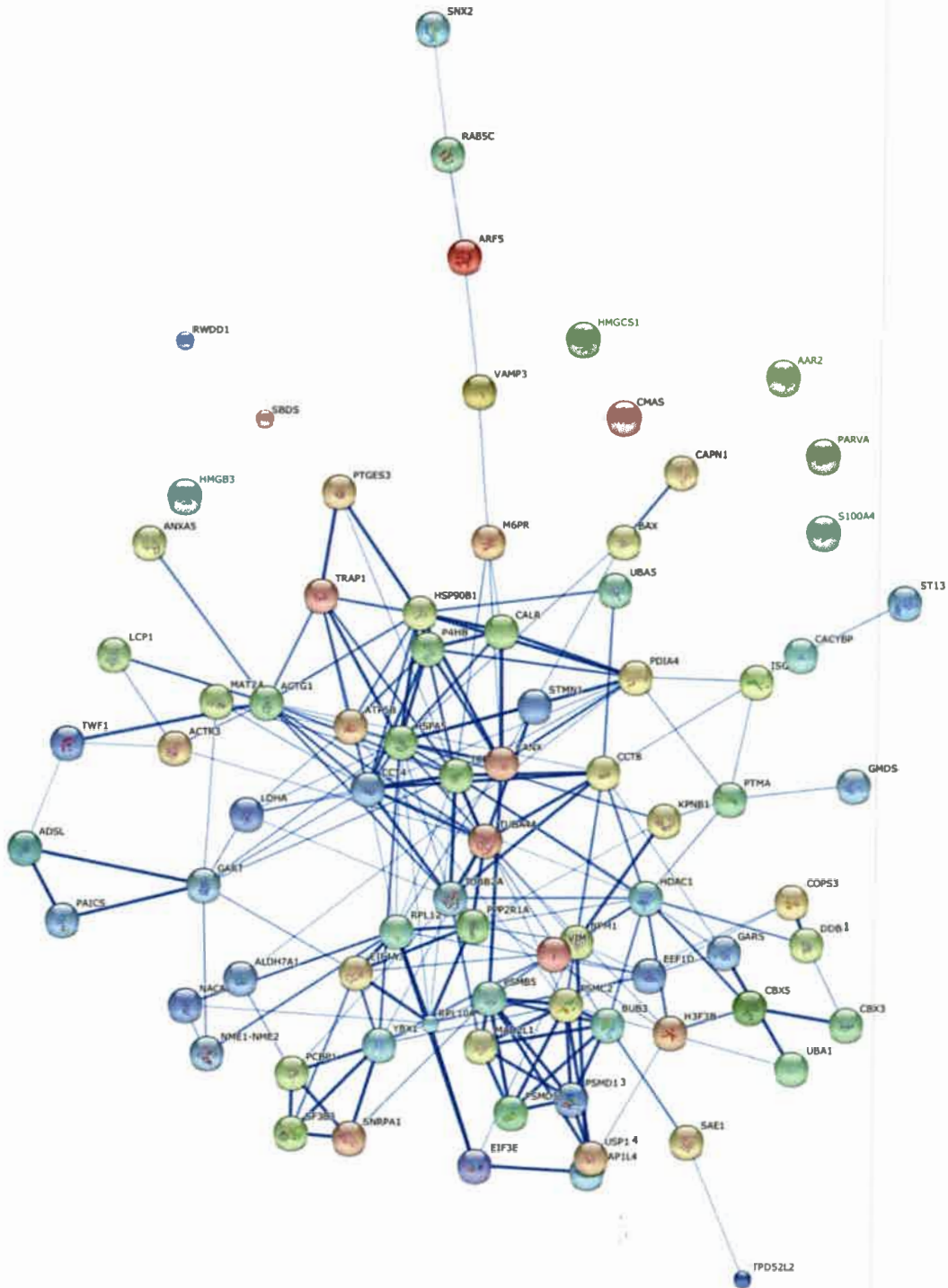
Las interacciones proteína-proteína desempeñan un papel fundamental en el control de los principales procesos celulares<sup>103</sup>. Por ello, a continuación se propuso investigar las interacciones entre los factores solubles regulados positiva y negativamente de forma significativa por la TFD (Tabla V), utilizando el software libre String 10.

String es una base de datos de interacciones entre proteínas conocidas y predichas. Las interacciones incluyen tanto asociaciones directas (físicas) como indirectas (funcionales). Se basan en cuatro fuentes: contexto genómico, experimentos HT (“high-throughput”, de alto rendimiento), co-expresión (conservada) y conocimiento previo (datos bibliográficos)<sup>104</sup>. El análisis realizado por String demostró que las proteínas cuya secreción disminuyó significativamente por el estímulo fotodinámico interactúan de forma significativa ( $n = 28$ ;  $p\text{-value} = 6,51 \times 10^{-4}$ ; interacciones observadas = 10; interacciones esperadas = 3) (Figura 50). En el caso de aquellas proteínas cuya liberación al medio extracelular aumentó en respuesta a la TFD, la interacción también resultó significativa ( $n = 80$ ;  $p\text{-value} = 0$ ; interacciones observadas = 203; interacciones esperadas = 8.9) (Figura 51).



**Figura 50. Las proteínas cuya secreción disminuye por la TFD interactúan de forma significativa.**

La red de interacciones fue realizada a través del software String 10. La intensidad de la línea de unión entre proteína-proteína es proporcional a la significancia biológica de la interacción entre ambas.



**Figura 51.** Las proteínas cuya secreción se incrementa por la TFD interactúan de forma significativa.

La red de interacciones fue realizada a través del software String 10. La intensidad de la línea de unión entre proteína-proteína es proporcional a la significancia biológica de la interacción entre ambas.

Dentro de una red de interacción de proteínas, la alta conectividad entre los componentes significa que están involucrados en un mismo proceso biológico. En este sentido, el análisis de enriquecimiento ontológico-funcional permite evaluar el impacto a nivel sistémico de un grupo de

moléculas, en este caso proteínas, que en su conjunto alteran, modifican o enriquecen un proceso biológico, función molecular, vías metabólicas, en respuesta a un estímulo. Para poder realizar este análisis, es necesario recurrir a diferentes bases de datos, que contienen la información ontológica-funcional relacionada a dichas moléculas-candidatas<sup>105</sup>.

En el presente estudio utilizó la base de datos “Pathway Interaction Database” (PID)<sup>106</sup>. Esta herramienta permitió identificar las vías de señalización molecular y eventos regulatorios claves en procesos celulares que se encuentran enriquecidos en el conjunto de proteínas cuya secreción aumentó o disminuyó significativamente en respuesta a la TFD.

Como era previsto, la TFD incrementó la secreción de proteínas involucradas en muerte celular, específicamente en la activación de caspasas (Tabla VI), probablemente en respuesta a la citotoxicidad ejercida por la terapia<sup>107</sup>. Asimismo, ciertas vías asociadas a la tumorigénesis se vieron enriquecidas bajo este estímulo, como es el caso de la señalización mediada por la quinasa Aurora B<sup>108</sup>, regulación de la telomerasa<sup>109</sup> y activación transcripcional de C-MYC<sup>110</sup> (Tabla VI). El eje Aurora B → C-MYC → Telomerasa ha sido descrito en carcinoma colorrectal, y se encuentra regulado por la interacción entre la proteína anti-apoptótica Survivina y Aurora B<sup>111</sup>. Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que la fotosensibilización de células tumorales es capaz de inducir la expresión y actividad de Survivina<sup>112</sup>, lo que podría explicar, al menos en parte, la implicancia de estas vías pro-tumorales en la respuesta a la TFD. Además, diversas vías de señalización intracelular serán activadas por los factores solubles inducidos por el estímulo fotodinámico, tales como aquellas que involucran al receptor de glucocorticoides, PTP1B, la vía Hedgehog, activación de NFAT en linfocitos, entre otros (Tabla VI).

**Tabla VI. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por proteínas cuya secreción aumentó luego de la fotosensibilización.** 10 vías involucradas están ordenadas según la probabilidad de que incluyan las proteínas del conjunto analizado. Cuanto menor sea el valor *p*, mayor será la probabilidad de que el conjunto de proteínas esté sesgado hacia un camino determinado. Los parámetros para generar el valor de *p* son el tamaño del conjunto de proteínas, el número de biomoléculas en una vía dada y el número de moléculas de dicha vía en la base de datos PID.

Nombre de la vía	Biomoléculas involucradas	P-value
Señalización por Aurora B	CBX5, NPM1, STMN1, VIM	4,14e-05
Dianas de la activación transcripcional de C-MYC	BAX, LDHA, NPM1, PTMA	9,41e-04
Regulación de la telomerasa	HDAC1, HDAC2, PTGES3	4,89e-03
Vía regulatoria del receptor de glucocorticoides	BAX, HDAC1, HDAC2	8,03e-03
Eventos de señalización mediados por HDAC de clase III	BAX, TUBB2A	1,63e-02
Señalización de quinasas asociadas a integrinas	NACA, PARVA	2,20e-02
Eventos de señalización de la vía Hedgehog mediados por Gli	HDAC1, HDAC2	2,37e-02



Eventos de señalización mediados por PTP1B	CAPN1, YBX1	2,73e-02
Apoptosis mediada por caspasas	BAX, VIM	3,21e-02
Rol de la vía NFAT dependiente de calcineurina en linfocitos	BAX, KPNB1	3,31e-02

Por otro lado, la fotosensibilización de los microtumores disminuyó la secreción de proteínas involucradas en la adhesión célula-células y célula-sustrato (Tabla VII), específicamente aquéllas relacionadas con integrinas y los proteoglicanos syndecan<sup>113</sup>. Además, se redujo la liberación de diversos mediadores de vías de regulación de factores de transcripción (FOXA2, FOXA3) y factores de crecimiento (FGF).

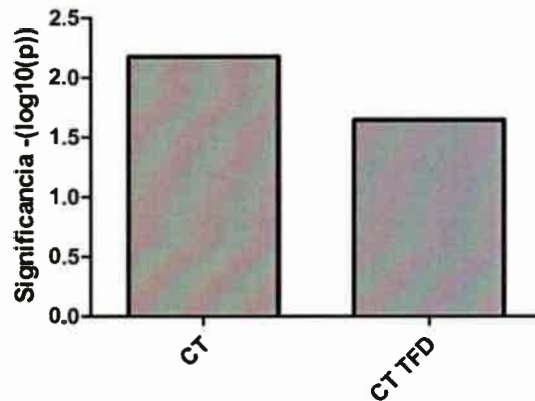
En relación a la vía de HIF-1, enriquecida en el conjunto de proteínas cuya secreción disminuyó luego de la fotosensibilización, ésta se encuentra representada por el receptor de transferrina (TFRC, del inglés “Transferrin receptor protein 1”). El hierro es un elemento clave para el crecimiento y metabolismo celular, debido a que forma parte del sitio activo de diversas enzimas, compone el grupo hemo, cataliza reacciones redox que implican proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, entre otras funciones<sup>114</sup>. Por ello, la homeostasis del hierro está estrechamente regulada. El hierro en suero se transporta principalmente por la transferrina (TF), la que suministra el metal a las células que lo requieran. La TF cargada con hierro interactúa con el receptor de transferrina (TFRC), y luego el complejo es internalizado por endocitosis mediada por receptor. Es así como el TFRC juega un papel crucial en el control de entrada de hierro en las células<sup>115</sup>. Se ha reportado de la expresión de TFRC se vio incrementada en condiciones de hipoxia, evento mediado por el factor HIF-1<sup>116,117</sup>. Por otro lado, diversos estudios demostraron que el TFRC puede formar parte del secretoma de células normales<sup>118</sup> y tumorales<sup>119</sup> a través de su secreción mediada por exosomas, aunque su función en el diálogo autócrino y parácrino aun no ha sido caracterizada.

**Tabla VII. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por proteínas cuya secreción disminuyó luego de la fotosensibilización.** 9 vías involucradas están ordenadas según la probabilidad de que incluyan las proteínas del conjunto analizado. Cuanto menor sea el valor *p*, mayor será la probabilidad de que el conjunto de proteínas esté sesgado hacia un camino determinado. Los parámetros para generar el valor de *p* son el tamaño del conjunto de proteínas, el número de biomoléculas en una vía dada y el número de moléculas de dicha vía en la base de datos PID.

Nombre de la vía	Biomoléculas involucradas	P-value
Interacción de Beta3 integrina en la superficie celular	SDC4, TGFBI	1,11e-03
Dianas de la activación transcripcional de C-MYC	SERPINI1, TFRC	4,33e-03
Eventos de señalización mediados por syndecan-4	SDC4	4,81e-03
Interacción de Beta2 integrina en la superficie celular	TGFBI	3,40e-02
Vía de los factores de transcripción FOXA2 y FOXA3	TFRC	5,41e-02

Eventos de señalización mediados por syndecan-1	PPIB	5,63e-02
Rol de la vía NFAT dependiente de calcineurina en linfocitos	SLC3A2	5,63e-02
Vía de señalización de FGF	SDC4	7,14e-02
Vía del factor de transcripción HIF-1	TFRC	7,56e-02

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en este trabajo de investigación en relación al factor HIF-1, a continuación se analizó la significancia biológica de la vía de HIF-1 en ambos secretomas analizados: CT y CT TFD. Los datos obtenidos a través del análisis ontológico-funcional utilizando la base de datos PDI mostraron que la significancia biológica de la vía de HIF-1 disminuyó luego de la fotosensibilización (Figura 52), lo que se correlaciona con la disminución de células HIF + post-TFD (Figura 40).



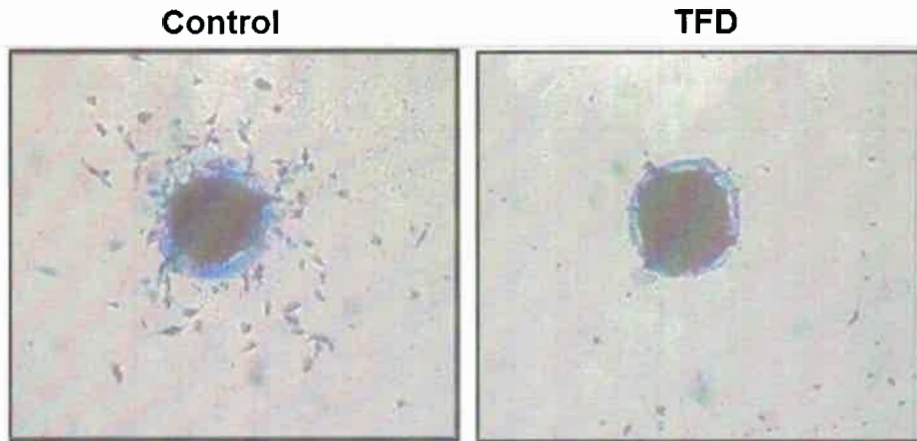
**Figura 52. La TFD disminuye la significancia biológica de la vía de HIF en el secretoma tumoral.**

La significancia fue calculada como  $-\log_{10}$  del valor  $p$ , obtenido a través del análisis ontológico-funcional de las proteínas que constituyen el secretoma utilizando la base de datos PDI.

### 5.12. Evaluación de la angiogénesis *in vitro* en respuesta a la fotosensibilización tumoral

La angiogénesis, definida como el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos a partir de vasculatura preexistente, es un complejo proceso que involucra la activación, migración y proliferación de células endoteliales (CEs) en respuesta a señales pro-angiogénicas. Estas señales incluyen factores solubles que se liberan al medio extracelular y que en su mayoría son regulados por HIF-1 como respuesta a condiciones hipóxicas: el incremento de la vasculatura provee de oxígeno y nutrientes necesarios para revertir esta condición<sup>120</sup>. La relación entre TFD y angiogénesis fue establecida por primera vez por Ferrario y colaboradores<sup>71</sup>, los cuales demostraron que la combinación del tratamiento fotodinámico con inhibidores de angiogénesis incrementa la eficiencia terapéutica.

Con el propósito de examinar el efecto de la fotosensibilización sobre el reclutamiento de CEs, se realizaron ensayos de estimulación parácrina mediante el uso de MCs. Para ello, se generaron esferoides de células de microvasculatura HMEC, los cuales fueron incubados en presencia de factores solubles secretados por microtumores con o sin tratamiento fotodinámico. Las células migrantes se cuantificaron a las 24 h. La estimulación parácrina proveniente de los esferoides fotosensibilizados disminuyó significativamente el número de células endoteliales migrantes (Figura 53).



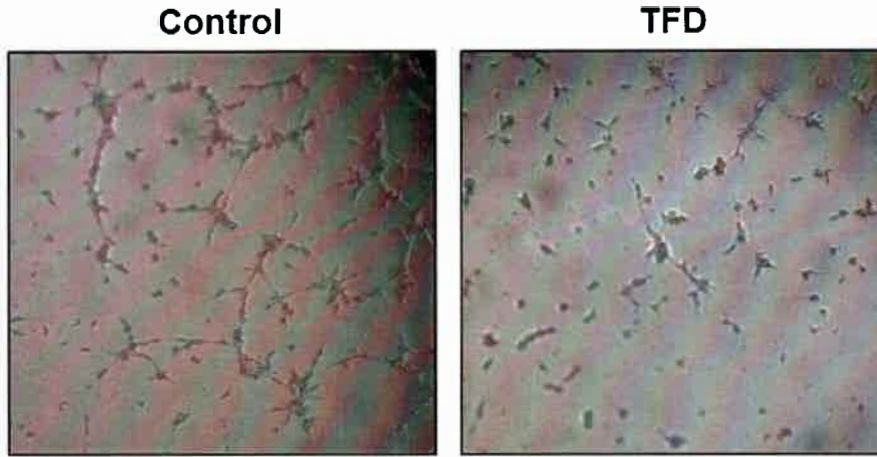
**Figura 53. La fotosensibilización tumoral disminuye la migración de células endoteliales.**

*Esferoides de células HMEC (20000 cel/esferoide) fueron estimulados durante 24 h con medios condicionados (MCs) provenientes de esferoides sometidos o no a TFD. Se tomaron imágenes representativas de los esferoides endoteliales teñidos con azul de toluidina.*

*Referencias: control, células sin tratar; TFD, células incubadas con la droga (Me-ALA 0,3 mM) y posteriormente irradiadas (0,7 J/cm<sup>2</sup>).*

El proceso angiogénico es un evento morfogénico complejo y altamente regulado que involucra la migración y proliferación de las CE hacia el estímulo angiogénico desencadenado en el microambiente tumoral. Para dar lugar a la nueva vasculatura en formación, las células proliferan y se asocian en estructuras tubulares, proceso conocido como tubulogénesis. El cultivo de células endoteliales en una matriz extracelular que le brinde el contexto fisiológico presente en un contexto *in vivo* permite imitar este fenómeno y por lo tanto proporcionar modelos experimentales para el estudio de los factores biológicos involucrados y como éstos pueden modificarse con la terapia<sup>121</sup>.

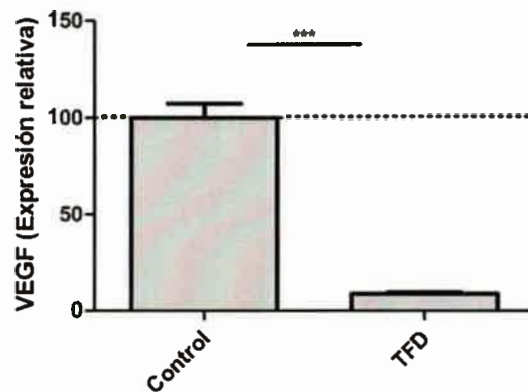
Para evaluar el efecto de la TFD sobre el proceso de tubulogénesis, las células endoteliales plaqueadas sobre Matrigel fueron incubadas en presencia de los MCs. Estos MCs provenían de cultivos 3D de la línea celular SW480 control y sometidos a dosis de tratamiento fotodinámico letal. Se demostró que la fotosensibilización indujo una menor expresión de factores solubles inductores de la morfogénesis de las CE (Figura 52).



**Figura 52. La fotosensibilización tumoral disminuye la tubulogénesis endotelial.**

Las células HMEC fueron crecidas sobre pocillos recubiertos de Matrigel® en presencia de MCs provenientes de esferoides de células SW480 sometidos o no a TFD. Las células fueron fotografiadas a las 3 h y se muestran imágenes correspondientes a un ensayo representativo. Referencias: control, células sin tratar; TFD, células incubadas con la droga (Me-ALA 0,3 mM) y posteriormente irradiadas (0,7 J/cm<sup>2</sup>).

Los VEGFs (VEGFa, VEGFb, VEGFc, VEGFd) son las citoquinas pro-angiogénicas más importantes y median sus funciones a través de su unión a los tres receptores tirosina quinasa expresados en la membrana de las CEs: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR), y VEGFR-3 (Flt-4)<sup>122</sup>. Por esta razón, para confirmar el rol de los microtumores fotosensibilizados sobre el proceso de angiogénesis, se evaluó la expresión de VEGFa luego de la TFD. Como era esperado, se observó una marcada y significativa disminución de la transcripción del ARNm de esta citoquina (Figura 55).



**Figura 55. La TFD suprime la expresión de VEGFa.**

Los esferoides de células SW480 (20000 células iniciales) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. A las 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la expresión de VEGFa por RT-qPCR. Los niveles relativos de ARNm se calcularon según:  $2^{-\Delta\Delta CT} = [(CT \text{ gen en la muestra} - CT \text{ 18S en la muestra}) - (CT \text{ gen en el control} - CT \text{ } \beta\text{-18S en el control})]$  y los valores de expresión se normalizaron a los valores obtenidos en el control. Análisis estadístico: Anova en una vía, Bonferroni post-test, \*\*\*  $p < 0,001$ . Referencias: control, células sin tratar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

Los estudios abocados a dilucidar el efecto de la TFD sobre el proceso angiogénico han mostrado resultados controversiales. Teniendo en cuenta que la hipoxia intratumoral puede ser agravada por la intervención fotodinámica<sup>123-125</sup>, muchos reportes lograron identificar factores pro-angiogénicos inducidos por la TFD<sup>123,126-128</sup>. Sin embargo, otros han señalado al tratamiento fotodinámico como candidato con potencial anti-angiogénico<sup>129,130</sup>. Estas observaciones sugieren que las condiciones terapéuticas en las que se aplica la fotosensibilización, tales como la droga fotosensibilizante, dosis y potencia de irradiación, y principalmente la intensidad del efecto tumoricida, condicionan el desencadenamiento de eventos relacionados con la resistencia a la terapia y consecuentemente la recidiva de la enfermedad.

En el presente trabajo, se demostró que la disminución de la estimulación endotelial en presencia de los factores solubles secretados por los tumores fotosensibilizados concuerda con lo observado en la caracterización del secretoma, en donde se demostró que la significancia biológica de la vía de HIF se vio suprimida luego de la TFD (Figura 52). Asimismo, estos datos son reafirmados con la inhibición en la expresión de VEGF por parte de los esferoides sometidos al tratamiento fotodinámico. En base a los resultados obtenidos hasta el momento, el protocolo de tratamiento aplicado resulta prometedor, ya que genera una notable mortalidad tumoral (aproximadamente un 70%) y no desencadena una inducción de angiogénesis post-tratamiento. Estas características resultarían alentadoras sólo si consideramos al tumor como un conjunto de células aisladas de su entorno. Sin embargo, actualmente se considera que las interacciones de las células tumorales con los diferentes componentes del estroma tumoral, tales como fibroblastos, células inflamatorias, matriz extracelular, juegan un papel importante en el desarrollo neoplásico<sup>131,132</sup> y consecuentemente deben considerarse al momento de evaluar una terapia anti-cancerígena<sup>128</sup>.

### **5.13. Diseño de co-cultivos que imiten la interacción entre células tumorales y estromales**

Tres décadas atrás, Dvorak introdujo la idea de considerar a los tumores como “heridas que no sanan”<sup>133</sup>. En ese momento, la investigación del cáncer se centraba únicamente en las células transformadas malignas con respecto a sus anomalías genéticas, cambios epigenéticos, y expresión de genes alterados. Sin embargo, el conocimiento sobre el microambiente tumoral, constituido por el estroma y el tumor al que acompaña, fue aumentando desde ese entonces<sup>131,134</sup>. En la actualidad, el estroma asociado al cáncer se considera un medio complejo donde tienen lugar una variedad de interacciones que involucran a las células del tumor y las células del estroma huésped no transformadas. Mientras las células tumorales proliferan e invaden el habitat del estroma, el sistema inmune del huésped se congrega alrededor de los nidos tumorales con la concomitante inducción de

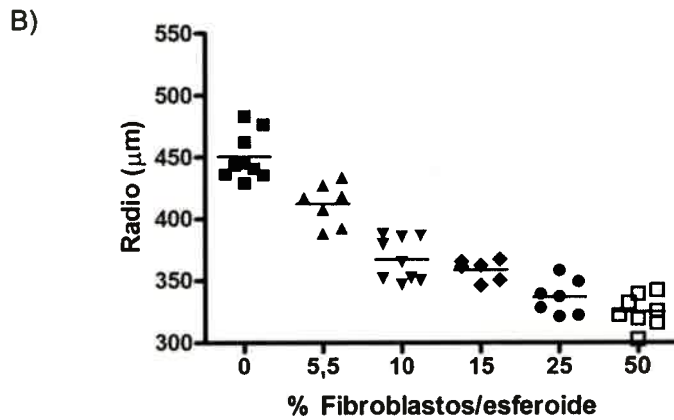
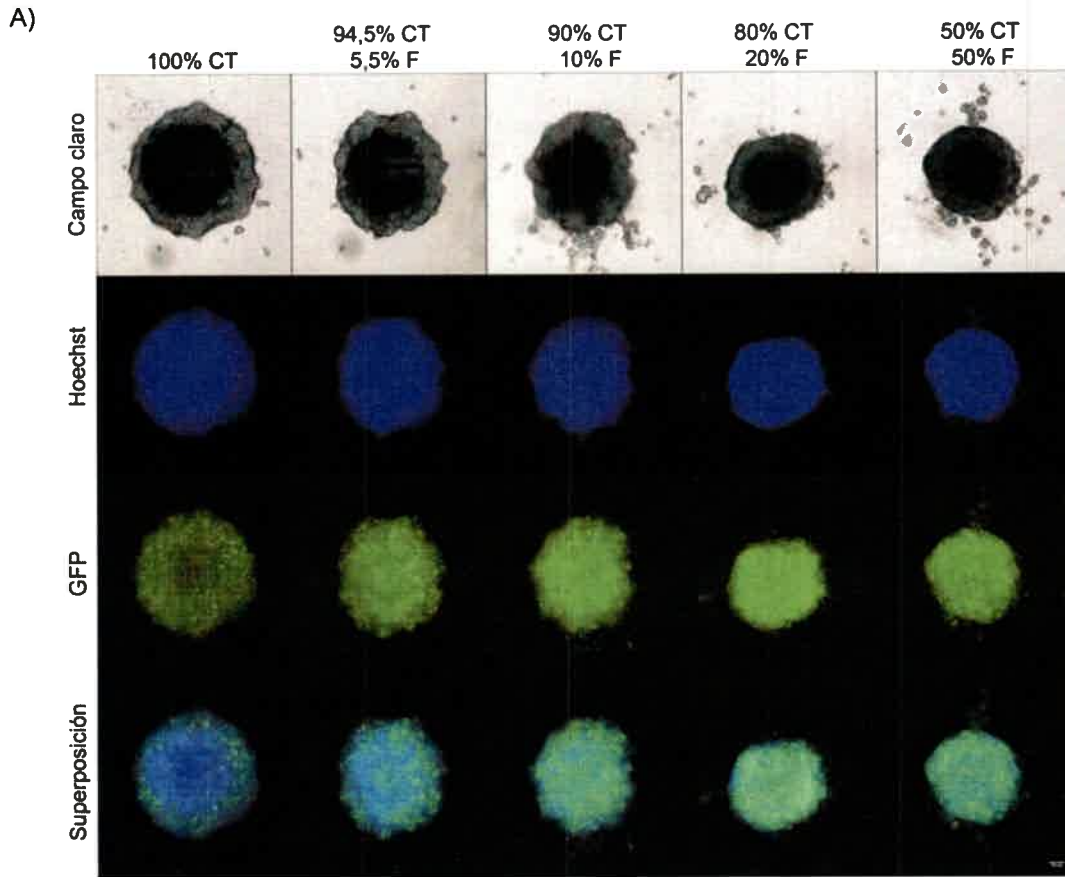
la angiogénesis<sup>135</sup>. Estos cambios dinámicos que tienen como protagonistas claves a las células estromales en respuesta al desarrollo de la lesión tumoral se asemejan a una reacción de curación de heridas<sup>133</sup>, y se denomina reacción desmoplásica.

La reacción desmoplásica fisiológica es llevada a cabo principalmente por la activación de los fibroblastos, que se diferencian en “miofibroblastos”<sup>136</sup>. Los fibroblastos asociados a los tumores (CAFs, del inglés “Cancer Associated Fibroblasts”) se asemejan fenotípica y funcionalmente a los miofibroblastos presentes en tejidos en proceso de cicatrización. Las características distintivas de los CAFs incluyen la expresión de actina  $\alpha$  de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, del inglés “alpha-smooth muscle actine”) en los microfilamentos citoplásmicos, mientras que los fibroblastos quiescentes expresan vimentina<sup>137</sup>. Los CAFs producen una matriz extracelular enriquecida en colágeno tipo III y V, característica y responsable de la consistencia dura de muchos carcinomas<sup>138</sup>, y además son los principales generadores de colágeno I, molécula asociada a la resistencia tumoral a la quimioterapia<sup>139,140</sup>.

Los CAFs son una importante fuente de factores de crecimiento que estimulan la promoción tumoral. Recientemente, se ha demostrado que los CAFs tienen la capacidad de modular todas las capacidades propias del fenotipo neoplásico, inclusive aquellas vinculadas a la hipoxia intratumoral<sup>141</sup>. Por ello, se propuso investigar la implicancia de los fibroblastos en la respuesta a la TFD, utilizando el modelo hipóxico tridimensional de carcinoma colorrectal.

Con el fin de caracterizar el efecto de la presencia de las células estromales fibroblásticas en la morfología del microambiente tumoral colorrectal, se generaron cultivos 3D heterotípicos utilizando diferentes proporciones de células tumorales y fibroblastos que recrearon la interacción parénquima-estroma presente en una neoplasia *in vivo*. Teniendo en cuenta que la fluorescencia es la herramienta más conveniente para identificar las distintas poblaciones en modelos de co-cultivo<sup>142</sup>, se utilizó la línea SW480-G, descrita en el apartado 5.5.2. Esta línea expresa constitutivamente GFP, por lo que las células tumorales se diferenciaron fenotípicamente de los fibroblastos humanos MRC-5 por su fluorescencia verde.

Al comparar el patrón de fluorescencia de las células tumorales GFP + y la tinción nuclear de ambas poblaciones, se observó que la distribución de SW480-G y MRC-5 dentro del esferoide fue homogénea (Figura 56A). El aumento de la relación fibroblastos:células tumorales se asoció a una disminución en el diámetro del microtumor (Figura 56).



**Figura 56. Los esferoides heterotípicos compuesto por fibroblasto-tumor representan la interacción tumor-estroma del microambiente tumoral.**

Las células tumorales SW480-G y fibroblastos MRC-5 fueron sembradas en diferentes proporciones (20000 células por esferoide) en placas de 96 pocillos con fondo redondo previamente recubiertas de agarosa 1% (técnica LO) y se incubaron durante 3 días. (A) Imágenes en campo claro (panel superior) y de fluorescencia (paneles inferiores) con el aumento 4X. Las células tumorales GFP+ fluorescen en verde y los núcleos de ambas poblaciones fueron teñidos con Hoechst. (B) Radio de los esferoides generados, cuantificado utilizando el software ImageJ 1.42q.

Para dilucidar la relevancia biológica y clínica de la presencia de CAFs en el microambiente tumoral de carcinoma colorrectal, Tsujino y colaboradores cuantificaron esta población en tumores de 192 pacientes utilizando  $\alpha$ -SMA como marcador. Esta investigación demostró que el estroma tumoral de CCR contiene una proporción de CAFs de 0,35-19%, con una media de  $5,55 \pm 3,85\%$ . La presencia de CAFs se asoció con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad para tumores en estadio II y III. La metástasis hepática conservó la reacción desmoplásica típica de la región neoplásica. Estos resultados sugieren que la abundancia de CAFs en el estroma tumoral puede ser utilizada como factor pronóstico de recurrencia de la enfermedad luego de la resección quirúrgica<sup>143</sup>.

En los siguientes experimentos, se utilizará una proporción de 5,55% de fibroblasto en los cocultivos. De esta manera, se reproducirá lo observado en biopsias de carcinoma colorrectal<sup>143</sup>, imitando así no sólo la arquitectura tumoral sino también su composición.

#### 5.14. Caracterización del secretoma de esferoides tumorales homo y heterotípicos

El diálogo tumor-estroma no sólo depende de las interacciones célula-célula, sino también del diálogo autócrino y parácrino regulado por los factores solubles liberados al medio extracelular por las diferentes poblaciones que componen el microambiente tumoral<sup>92</sup>.

Por esta razón, a continuación, se caracterizaron los secretomas provenientes de esferoides compuestos por células tumorales (homotípicos, CT) y de esferoides compuestos por células tumorales y fibroblastos (heterotípico, CT + F) (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Lista de proteínas identificadas en los secretomas de esferoides homotípicos (CT) y heterotípicos (CT + F). Se detalla el ID según UniProt, el nombre de la proteína (en idioma inglés), el gen correspondiente, la ubicación del péptido señal en aquellas proteínas secretadas por la vía clásica (SignalP), el NN-score de las proteínas secretadas por vías no clásicas (SecretomeP, el NN-score debe ser mayor a 0.5), la valor de LFQ ("label-free quantification") de las proteínas en ambos secretomas, y se señalan las moléculas cuya diferencia de expresión es significativa ( $\uparrow$  aumento en el secretoma heterotípico,  $\downarrow$  disminución en el secretoma heterotípico, T-test).

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT + F	Diferencia significativa
B4DLR8	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] I	NQO1	-	0,744	23,94	24,93	-
B8ZZQ6	Prothymosin alpha	PTMA	-	0,602	26,00	29,50	-
E9PBS1	Multifunctional protein ADE2	PAICS	-	0,531	0,00	22,80	$\uparrow$
E9PES6	High mobility group protein B3	HMGB3	-	0,770	0,00	22,93	$\uparrow$
E9PHH3	Syndecan-1	SDC1	22-23	-	0,00	26,18	$\uparrow$
F2Z2Y4	Pyridoxal kinase	PDXK	-	0,586	0,00	22,09	$\uparrow$
F5GY90	Porphobilinogen deaminase	HMBS	-	0,907	21,07	0,00	$\downarrow$
F8VNT9	CD63 antigen	CD63	Segmento transmembrana	-	23,51	25,78	-



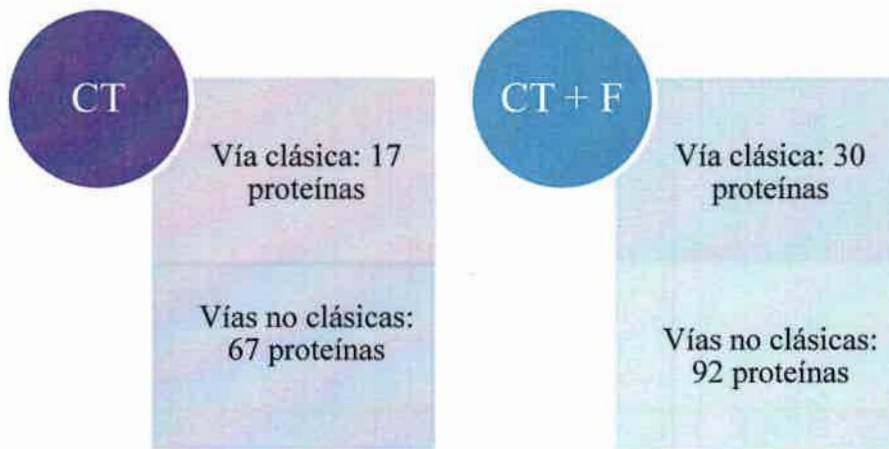
ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT + F	Diferencia significativa
F8VZJ2	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	-	0,681	0,00	23,78	↑
G3V3M6	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	-	0,622	23,54	22,91	-
H0YMZ1	Proteasome subunit alpha type	PSMA4	-	0,613	23,47	24,48	-
H7C3P9	COP9 signalosome complex subunit 3	COPS3	-	0,617	0,00	22,84	↑
J3KTF8	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI1	-	0,876	27,51	27,52	-
J3QS39	Polyubiquitin-B	UBB	-	0,601	22,36	25,71	-
J3QT28	Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3	-	0,760	0,00	22,74	↑
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	-	0,666	21,47	23,21	-
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	29-30	-	23,50	25,53	-
O15498	Synaptobrevin homolog YKT6	YKT6	-	0,574	24,18	24,59	-
O60361	Putative nucleoside diphosphate kinase	NME2P1	-	0,578	0,00	22,97	↑
O60547	GDP-mannose 4,6 dehydratase	GMDS	-	0,545	0,00	22,56	↑
O60664	Perilipin-3	PLIN3	-	0,559	0,00	22,65	↑
O75083	WD repeat-containing protein 1	WDR1	-	0,518	0,00	21,00	↑
O75223	Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT	-	0,503	23,95	24,00	-
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	-	0,547	21,98	0,00	↓
O95861	3'(2'),5'-biphosphate nucleotidase 1	BPNT1	-	0,682	22,70	22,85	-
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	-	0,549	27,86	28,32	-
P00491	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)	PNP	-	0,509	24,29	24,64	-
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT1	-	0,767	22,83	23,01	-
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	-	0,505	24,09	25,40	-
P01034	Cystatin-C	CST3	20-21	-	21,67	21,60	-
P02786	Transferrin receptor protein 1	TFRC	-	0,611	21,81	23,54	-
P02794	Ferritin heavy chain	FTH1	-	0,621	24,26	28,24	↑
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	23-24	-	0,00	25,16	↑
P05161	Ubiquitin-like protein ISG15	ISG15	-	0,702	22,37	0,00	↓
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	-	0,725	23,15	24,58	-
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	-	0,591	0,00	23,65	↑
P06733	Alpha-enolase	ENO1	-	0,536	27,60	27,41	-
P06748	Nucleophosmin	NPM1	-	0,811	0,00	23,03	↑
P07093	Glia-derived nexin	SERPINE2	19-20	-	0,00	24,16	↑
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	-	0,569	27,81	27,46	-
P07355	Annexin A2	ANXA2	-	0,746	24,87	24,22	-
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	FH	-	0,551	24,24	24,23	-
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	-	0,644	22,71	24,47	-
P08581	Hepatocyte growth factor receptor	MET	24-25	-	0,00	22,38	↑
P08670	Vimentin	VIM	-	0,512	0,00	23,56	↑
P09211	Glutathione S-transferase P	GSTP1	-	0,545	0,00	24,16	↑
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	18-19	-	0,00	22,09	↑

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT + F	Diferencia significativa
P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	SLC2A1	Segmento transmembrana	-	0,00	23,88	↑
P12004	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	-	0,566	25,78	25,31	-
P14324	Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	-	0,639	23,08	22,73	-
P14625	Endoplasmín	HSP90B1	21-22	-	0,00	22,17	↑
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	-	0,518	0,00	21,64	↑
P18085	ADP-ribosylation factor 4	ARF4	-	0,618	22,54	23,91	-
P20340	Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	-	0,703	24,49	24,98	-
P20645	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6PR	26-27	-	0,00	22,28	↑
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	GART	-	0,526	0,00	22,01	↑
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	-	0,530	0,00	22,95	↑
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PPIB	Segmento transmembrana	-	26,82	26,84	-
P23526	Adenylosuccinate lyase	AHCY	-	0,507	27,10	27,12	-
P23528	Cofilin-1	CFL1	-	0,628	25,09	25,58	-
P26038	Moesin	MSN	-	0,530	24,66	24,59	-
P27797	Calreticulin	CALR	17-18	-	0,00	21,10	↑
P28070	Proteasome subunit beta type-4	PSMB4	-	0,565	22,91	0,00	↓
P28074	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5	-	0,726	24,05	24,48	-
P29218	Inositol monophosphatase 1	IMPA1	-	0,577	23,75	24,03	-
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	-	0,562	22,53	22,06	-
P30566	Adenylosuccinate lyase	ADSL	-	0,558	0,00	22,33	↑
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	-	0,516	24,75	25,44	-
P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	MAT2A	-	0,552	0,00	23,20	↑
P31431	Syndecan-4	SDC4	18-19	-	24,34	26,43	-
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	-	0,522	23,52	23,35	-
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	19-20	-	25,07	23,84	-
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	-	0,644	22,73	22,69	-
P41250	Glycine--tRNA ligase	GARS	26-27	-	0,00	23,62	↑
P46976	Glycogenin-1	GYG1	-	0,540	25,35	25,55	-
P47756	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	-	0,543	25,00	25,30	-
P50453	Serpin B9	SERPINB9	-	0,559	21,73	21,31	-
P50454	Serpin H1	SERPINH1	18-19	-	22,68	23,25	-
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	-	0,508	24,34	24,89	-
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	-	0,535	22,04	22,27	-
P51148	Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	-	0,865	0,00	22,85	↑
P52292	Importin subunit alpha-1	KPNA2	-	0,561	0,00	21,15	↑
P55058	Phospholipid transfer protein	PLTP	17-18	-	23,80	23,23	-
P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6	-	0,584	22,43	22,58	-
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4	-	0,646	24,05	24,70	-
P60174	Triosephosphate isomerase	TPI1	-	0,510	27,24	26,75	-

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT + F	Diferencia significativa
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	-	0,631	23,20	23,20	-
P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	UBE2N	-	0,676	23,31	23,19	-
P62158	Calmodulin	CALM1	-	0,730	22,70	23,13	-
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	-	0,582	26,40	26,61	-
P63010	AP-2 complex subunit beta	AP2B1	-	0,677	21,36	21,65	-
P63261	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	-	0,505	27,56	27,87	-
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	-	0,733	0,00	24,10	↑
P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	-	0,501	24,55	24,43	-
P81605	Dermcidin	DCD	19-20	-	25,42	24,43	-
P84077	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	-	0,508	26,71	28,27	-
P84085	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	-	0,650	0,00	24,14	↑
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	SORD	-	0,511	24,36	25,03	-
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	-	0,560	0,00	23,48	↑
Q02413	Desmoglein-1	DSG1	23-24	-	24,46	23,46	-
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1	-	0,528	24,34	24,75	-
Q08188	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	TGM3	-	0,500	22,04	0,00	↓
Q08257	Quinone oxidoreductase	CRYZ	-	0,738	0,00	21,59	↑
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	18-19	-	27,57	27,35	-
Q08554	Desmocollin-1	DSC1	32-33	-	23,740	23,64	-
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4	-	0,636	23,03	23,26	-
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	-	0,619	0,00	22,48	↑
Q13257	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	MAD2L1	-	0,836	0,00	23,52	↑
Q13308	Inactive tyrosine-protein kinase 7	PTK7	30-31	-	21,49	21,55	-
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	-	0,509	24,36	24,78	-
Q14019	Coactosin-like protein	COTL1	-	0,765	23,41	23,04	-
Q14126	Desmoglein-2	DSG2	23-24	-	20,92	21,54	-
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	23-24	-	21,88	23,07	-
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0)	SLC1A5	-	0,734	24,03	25,35	-
Q15907	Ras-related protein Rab-11B	RAB11B	-	0,527	25,44	25,94	-
Q5SYZ4	Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	-	0,613	21,86	21,92	-
Q6P988	Palmitoleoyl-protein carboxylesterase NOTUM	NOTUM	22-23	0,848	0,00	21,33	↑
Q6YHK3	CD109 antigen	CD109	21-22	0,600	0,00	23,05	↑
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	20-21	0,628	22,72	22,95	-
Q96CN7	Isochorismatase domain-containing protein 1	ISOC1	-	0,616	0,00	22,69	↑
Q99574	Neuroserpin	SERPINI1	18-19	-	24,31	24,43	-
Q9BTY2	Plasma alpha-L-fucosidase	FUCA2	28-29	0,779	0,00	22,93	↑
Q9GZP4	PITH domain-containing protein 1	PITHD1	-	0,680	21,69	0,00	↓
Q9HB71	Calcyclin-binding protein	CACYBP	-	0,690	0,00	22,09	↑
Q9NVD7	Alpha-parvin	PARVA	-	0,811	0,00	22,94	↑

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT	LFQ CT + F	Diferencia significativa
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13	-	0,527	0,00	21,71	↑
Q9Y2Z0	Protein SGT1 homolog	SUGT1	-	0,509	21,87	21,93	-
R4GN98	Protein S100	S100A6	-	0,709	23,25	23,89	-

El secretoma de los cultivos 3D heterotípicos contuvo un número significativamente mayor de proteínas en comparación al secretoma de los cultivos 3D homotípicos (ver sección 5.11). De las 122 proteínas identificadas, el 24,60% fue liberado por la vía clásica y el 75,40% por la vía no clásica (Figura 57).

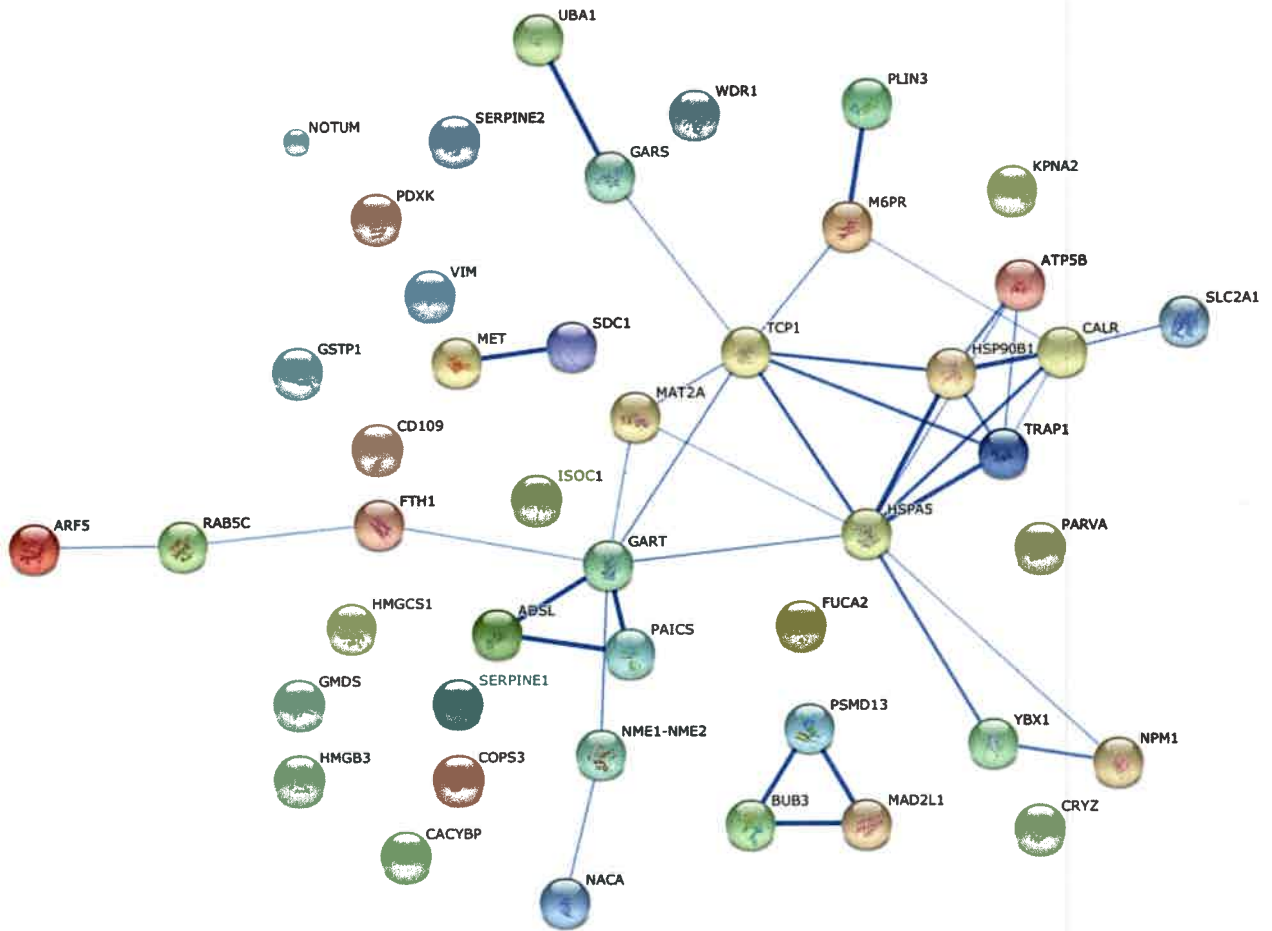


**Figura 57. Proteínas identificadas en los secretomas de esferoides de carcinoma colorrectal homo y heterotípicos.**

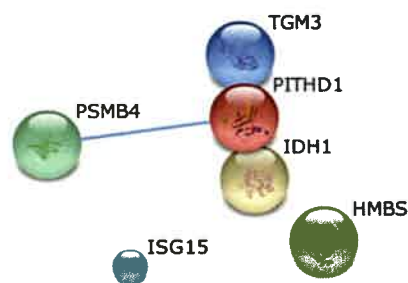
Las proteínas identificadas en los secretomas de los microtumores homotípicos (CT) o heterotípicos (CT + F) fueron clasificadas según su vía de secreción utilizando los software SignalP 4.1 y SecretomeP 2.0, para las vías clásicas y no clásicas, respectivamente.

A continuación se investigaron las interacciones entre las proteínas cuya secreción aumentó o disminuyó de forma significativa debido a la presencia de la población de fibroblastos en el microambiente tumoral (Tabla VIII), utilizando el software libre String 10.

El análisis realizado por String demostró que las proteínas cuya secreción se incrementó significativamente en los esferoides heterotípicos interactúan de forma significativa ( $n = 45$ ;  $p\text{-value} = 2,45 \times 10^{-3}$ ; interacciones observadas = 38; interacciones esperadas = 2,3) (Figura 58). Aquellas proteínas cuya liberación al medio extracelular se vio inhibida por la presencia de células estromales no mostraron una interacción significativa, por lo que no se incluyeron en posteriores estudios (Figura 59).



**Figura 58.** Las proteínas cuya secreción incrementa en los secretomas heterotípicos interactúan de forma significativa. La red de interacciones fue realizada a través del software String 10. La intensidad de la línea de unión entre proteína-proteína es proporcional a la significancia biológica de la interacción entre ambas.



**Figura 59.** Las proteínas cuya secreción disminuye en los esferoides heterotípicos no interactúan de forma significativa. La red de interacciones fue realizada a través del software String 10. La intensidad de la línea de unión entre proteína-proteína es proporcional a la significancia biológica de la interacción entre ambas.

Posteriormente, se realizó el análisis ontológico-funcional de las proteínas cuya secreción fue inducida en los cultivos 3D heterotípicos. Utilizando la base de datos PID se identificaron las principales vías de señalización enriquecidas en este conjunto de proteínas (Tabla IX).

Los fibroblastos representan la población estromal con mayor relevancia en la activación de la transcripción de genes regulados por hipoxia en el microambiente tumoral<sup>144</sup>. Esto se correlaciona con los datos obtenidos, debido a que la presencia de la población estromal confirió la principal significancia biológica a las vías reguladas por los factores de transcripción HIF-1 y HIF-2 (Tabla IX). Asimismo, otros mecanismos asociados a la tumorigénesis también se vieron enriquecidos en el secretoma de los esferoides heterotípicos, como es el caso de la señalización mediada por la quinasa Aurora B<sup>108</sup>, el factor de transcripción p73<sup>145</sup> y activación transcripcional de de C-MYC<sup>110</sup> (Tabla IX). Además, en los microtumores heterotípicos aumentó la secreción de proteínas involucradas en la adhesión célula-célula y célula-sustrato (Tabla IX), específicamente aquellas relacionadas con integrinas y los proteoglicanos syndecan<sup>113</sup>.

**Tabla IX. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por proteínas cuya secreción aumentó en los esferoides heterotípicos.** 10 vías involucradas están ordenadas según la probabilidad de que incluyan las proteínas del conjunto analizado. Cuanto menor sea el valor *p*, mayor será la probabilidad de que el conjunto de proteínas esté sesgado hacia un camino determinado. Los parámetros para generar el valor de *p* son el tamaño del conjunto de proteínas, el número de biomoléculas en una vía dada y el número de moléculas de dicha vía en la base de datos PID.

Nombre de la vía	Biomoléculas involucradas	P-value
Vía del factor de transcripción HIF-1	NPM1, SERPINE1, SLC2A1	1,11e-03
Vía del factor de transcripción HIF-2	SERPINE1, SLC2A1	5,56e-03
Señalización por Aurora B	NPM1, VIM	6,48e-03
Vía de señalización mediada por TCPTP	KPNA2, MET	7,81e-03
Señalización de quinasas asociadas a integrinas	NACA, PARVA	8,87e-03
Eventos de señalización mediados por syndecan-1	MET, SDC1	1,00e-02
Eventos de señalización mediados por proteoglicanos syndecan	SDC1	1,28e-02
Vía del factor de transcripción p73	BUB3, SERPINE1	2,40e-02
Dianas de la activación transcripcional de C-MYC	NPM1, SLC2A1	2,91e-02
Interacción de Beta5, beta6, beta7 y beta8 integrina en la superficie celular	SDC1	5,21e-02

Dentro del grupo de proteínas cuya liberación al medio aumentó en presencia de los fibroblastos en el microambiente tumoral, la vía de HIF-1 se encuentra enriquecida por la secreción de NPM1, SERPINE1 y SLC2A1.

Nucleofosmina 1 (NPM1, del inglés “nucleophosmine 1”) es una proteína multifuncional que inicialmente fue caracterizada como una proteína nucleolar involucrada en el procesamiento y transporte del ARN ribosomal<sup>146</sup>. NPM1 se encuentra asociada a traslocaciones cromosomales en enfermedades hematopoyéticas<sup>147-149</sup>. Además, su expresión se vio suprimida en células en proceso de diferenciación<sup>150</sup> y apoptosis<sup>151</sup>. La inducción de NPM1 mediada por HIF-1 otorgó ventajas

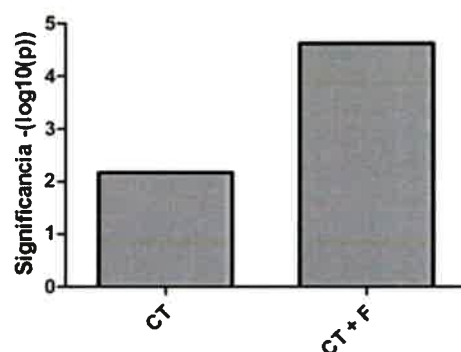
proliferativas a células tumorales hipóxicas, protegiéndolas de la muerte celular<sup>152</sup>. La secreción de NPM1 al medio extracelular se reportó a través de exosomas, involucrada a la exposición de antígenos tumorales<sup>153</sup>.

El gen *SERPINE1* codifica para el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1, del inglés “plasminogen activator inhibitor-1”), principal inhibidor del activador tisular del plasminógeno (t-PA) y la uroquinasa (uPA), los activadores del plasminógeno y por lo tanto de la fibrinólisis. PAI-1 ejerce su efecto pro-angiogénico a través de la estabilización de la matriz extracelular por la inhibición de la proteólisis<sup>154</sup>, y por la estimulación de la migración endotelial dependiente de fibronectina<sup>155</sup>. El factor de transcripción HIF-1 ha sido señalado como regulador transcripcional de esta proteína, en respuesta a la hipoxia<sup>156,157</sup>. Su secreción al medio extracelular ocurre por la vía clásica de secreción, mediada por su péptido señal (Tabla VIII).

La proteína transportadora de glucosa 1 (GLUT1, del inglés “Glucose transporter 1”, también conocida como “solute carrier family 2”) se encuentra codificada por el gen *SLC2A1*. GLUT1 es una proteína transmembrana que se encarga de la difusión de glucosa hacia el interior de las células a través de la membrana plasmática. La expresión del gen *SLC2A1* se encuentra regulada por HIF-1<sup>158</sup>.

Por lo tanto, las proteínas involucradas en la vía de HIF cuya secreción aumentó en los esferoides heterotípicos se encuentran involucradas en los mecanismos de adaptación a hipoxia: incremento en el transporte de oxígeno a través de la inducción de angiogénesis (AP-1), reducción del consumo de oxígeno mediada por la exacerbación del metabolismo anaeróbico (GLUT1) y regulación de la proliferación al inhibir la apoptosis (NPM1).

Los datos obtenidos a través del análisis ontológico-funcional utilizando la base de datos PDI mostraron que la significancia biológica de la vía de HIF-1 aumentó debido a la presencia de fibroblastos en el microambiente tumoral (Figura 60).



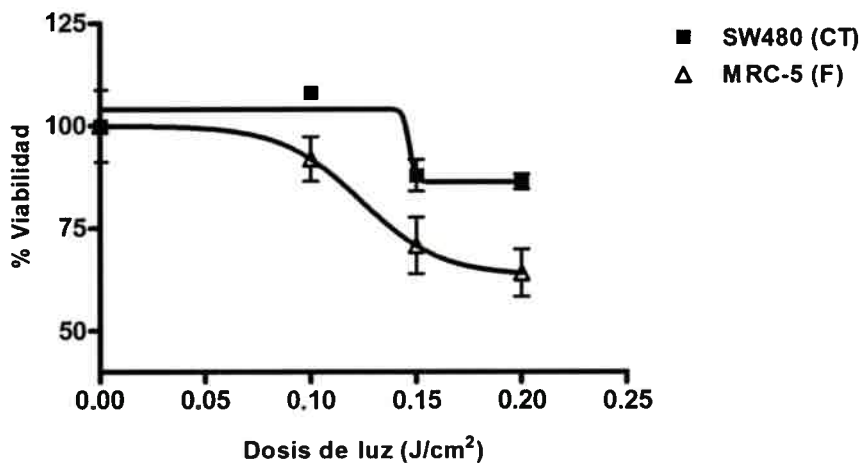
**Figura 60.** La presencia de fibroblastos aumenta la significancia biológica de la vía de HIF en el secretoma tumoral.

La significancia fue calculada como  $-\log_{10}$  del valor  $p$ , obtenido a través del análisis ontológico-funcional de las proteínas que constituyen el secretoma utilizando la base de datos PID.

### 5.15. Impacto del diálogo tumor-fibroblasto sobre la supervivencia tumoral luego del tratamiento fotodinámico

Las interacciones que se establecen entre las células tumorales y el estroma que las rodean ejercen una marcada influencia sobre la resistencia a terapias antitumorales. Este hecho implica que los estudios pre-clínicos de las terapéuticas experimentales pierden eficiencia y capacidad predictiva si no se considera al microambiente tumoral (MAT) en su conjunto<sup>159,160</sup>. Por ello, resultó fundamental determinar si los fibroblastos tienen la capacidad de modular el efecto de la intervención fotodinámica sobre cultivos tridimensionales de carcinoma colorrectal.

En primer lugar, se comparó la respuesta a la TFD de los fibroblastos MRC-5 y las células tumorales SW480. Ambas poblaciones fueron sometidas al protocolo convencional de fotosensibilización (Figura 21), y se evaluó la viabilidad celular 24 h luego de finalizado el tratamiento. De esta forma, se demostró que los fibroblastos resultaron ser más sensibles a la intervención fotodinámica en comparación con la línea tumoral (Figura 61).



**Figura 61. Los fibroblastos son más sensibles a la intervención fotodinámica en comparación con las células de carcinoma colorrectal.**

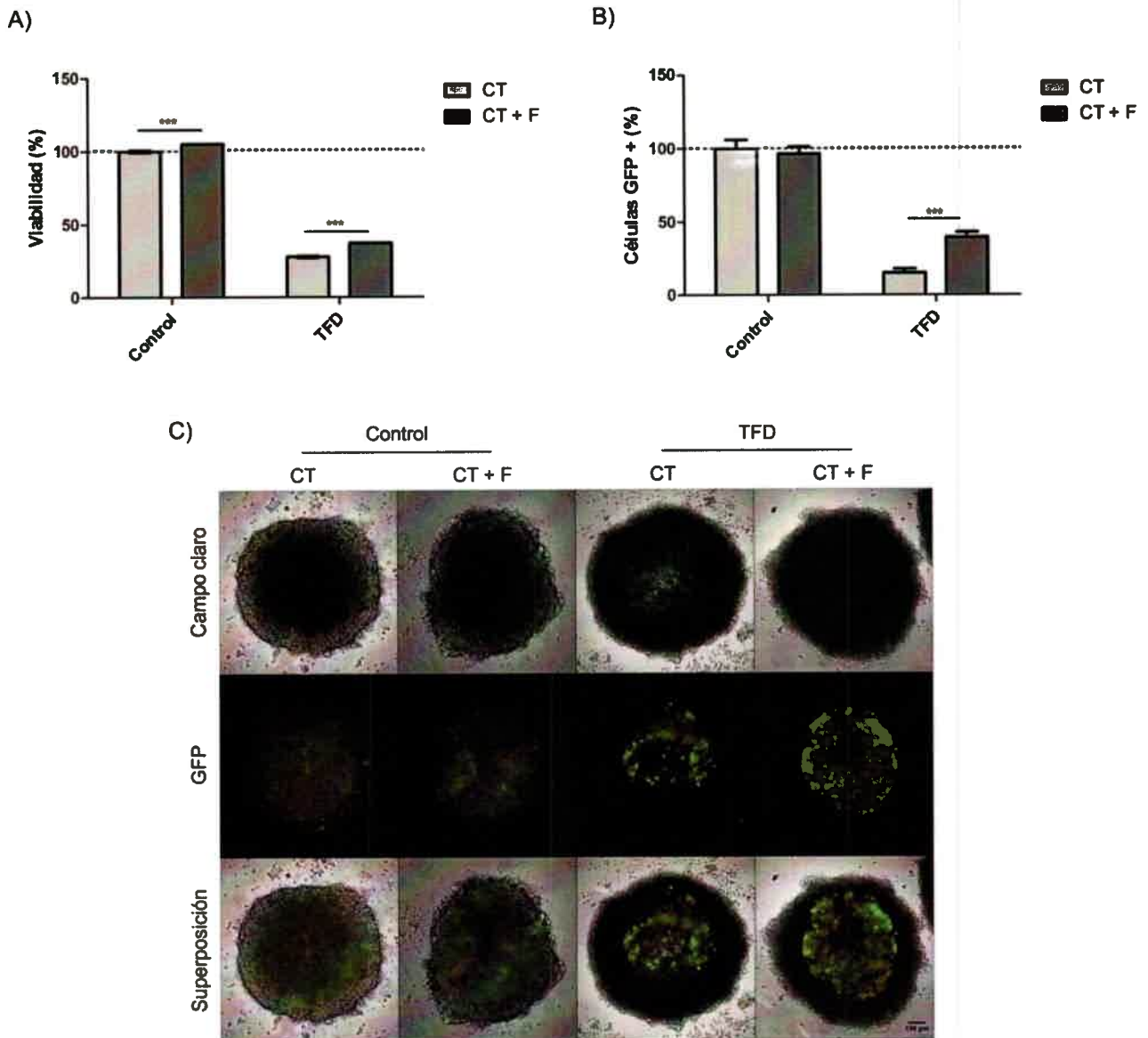
Las células SW480 ( $2 \times 10^5$  cél/ml) y MRC-5 ( $1 \times 10^5$  cél/ml) crecidas en monocapa fueron incubadas durante 4 h en presencia de Me-ALA (0,3 mM) y luego irradiadas con dosis de luz creciente (0-0,4 J/cm<sup>2</sup>). A las 24 h post-tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control sin irradiar. Los valores de DL50 para cada línea celular fueron determinados a través de la confección de curvas dosis-respuesta aplicando una regresión no-lineal a los datos (GraphPad Prism).

A continuación, se generaron esferoides homotípicos, formados sólo por células tumorales SW480-G, y heterotípicos, compuestos por células tumorales SW480-G y fibroblastos MRC-5. Posteriormente, los microtumores fueron sometidos a condiciones letales del tratamiento fotodinámico. La viabilidad de los esferoides fue evaluada 24 h luego de finalizada la irradiación a



través del ensayo de MTT. Se demostró que la presencia de la población estromal indujo una resistencia significativa a la TFD (Figura 62A).

Para determinar si los fibroblastos confieren una ventaja proliferativa a las células tumorales, los esferoides homotípicos y heterotípicos fueron disgregados 24 h luego de la fotosensibilización. Las células fueron incubadas con el colorante vital azul tripán y se procedió al recuento de células viables en cámara de Neubauer a través de fotografías tomadas con el microscopio de fluorescencia. De esta forma, se cuantificaron la cantidad de células tumorales viables GFP + y fibroblastos viables GFP -. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células GFP + viables en relación al recuento realizado en esferoides homotípicos sin tratar (100% GFP +). Según lo esperado, a través de este análisis se confirmó que en los esferoides formados sólo por células SW480-G que no fueron intervenidos con la terapéutica, la proporción de células tumorales viables fue menor respecto a los esferoides mixtos. Sorprendentemente, el porcentaje de células tumorales viables post-TFD se vio significativamente incrementado en los esferoides heterotípicos en comparación con los homotípicos (Figura 62B). Estos resultados fueron corroborados a través de las imágenes de microscopía de fluorescencia de las estructuras tridimensionales íntegras, en donde se observó que el área GFP + correspondiente a células tumorales fue mayor en los tumores heterotípicos que en los homotípicos luego de la fotosensibilización (Figura 62C).



**Figura 62. La presencia de fibroblastos en el microambiente tumoral promueve resistencia tumoral al tratamiento fotodinámico.**

Los esferoides homotípicos (CT, Célula Tumoral) y heterotípicos (CT + F, Célula Tumoral + Fibroblasto) (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. (A) A las 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT y se expresó como porcentaje con respecto al control de esferoides homotípicos (línea de puntos = 100%) \*\*\* =  $p < 0,001$  (Anova de dos vías, Bonferroni post-test) (B) La cantidad de células tumorales viables GFP + y fibroblastos viables GFP - se cuantificaron en cámara de Neubauer utilizando el colorante vital azul tripán. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células GFP + viables en relación al recuento realizado en esferoides homotípicos sin tratar (100% GFP +) (línea de puntos = 100%) \*\*\* =  $p < 0,001$  (Anova de dos vías, Bonferroni post-test). (C) La fluorescencia de GFP se observó mediante microscopia de fluorescencia invertida. Referencias: control, células sin tratar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

En concordancia con nuestros resultados, un estudio previo sobre la interacción tumor-fibroblasto demostró que cuando ambas poblaciones son co-cultivadas, imitando lo que ocurre en el microambiente tumoral, la eficiencia del tratamiento fotodinámico disminuye en comparación con el

tratamiento de las células tumorales solas<sup>161</sup>. Por lo tanto, es posible concluir que los fibroblastos en el microambiente tumoral podrían estar actuando como inductores de resistencia a la terapéutica o bien como promotores de proliferación tumoral, aún cuando ellos presentan en forma aislada una sensibilidad mayor a la intervención fotodinámica.

### 5.16. Caracterización del secretoma de esferoides heterotípicos fotosensibilizados

Los resultados obtenidos en la sección anterior indican que el diálogo fibroblasto-tumor promueve el establecimiento de mecanismos de defensa de las células tumorales frente a la intervención fotodinámica. Por esta razón, resultó sumamente interesante determinar cómo la interacción tumor-estroma afectó la secreción de factores solubles luego de la fotosensibilización (Tabla X).

**Tabla X. Lista de proteínas identificadas en los secretomas de esferoides heterotípicos no tratados (CT + F) y tratados con dosis letales de terapia fotodinámica (CT + F TFD).** Se detalla el ID según UniProt, el nombre de la proteína (en idioma inglés), el gen correspondiente, la ubicación del péptido señal en aquellas proteínas secretadas por la vía clásica (SignalP), el NN-score de las proteínas secretadas por vías no clásicas (SecretomeP, el NN-score debe ser mayor a 0.5), la valor de LFQ ("label-free quantification") de las proteínas en ambos secretomas, y se señalan las moléculas cuya diferencia de expresión es significativa (↑ aumento en el secretoma heterotípico, ↓ disminución en el secretoma heterotípico, T-test).

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT + F	LFQ CT + F TFD	Diferencia significativa
A2A2D0	Stathmin	STMN1	-	0,795	0,00	22,02	↑
A6NJA2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	USP14	-	0,620	0,00	22,95	↑
B4DLR8	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	NQO1	-	0,744	24,93	24,33	-
B4DXW1	Actin-related protein 3	ACTR3	-	0,621	0,00	22,42	↑
B8ZZQ6	Prothymosin alpha	PTMA	-	0,602	29,50	29,35	-
E5RQG3	RWD domain-containing protein 1	RWDD1	-	0,798	0,00	21,28	↑
E7EWE1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 5	UBA5	-	0,515	0,00	21,51	↑
E9PBS1	Multifunctional protein ADE2	PAICS	-	0,531	22,80	24,58	-
E9PES6	High mobility group protein B3	HMGB3	-	0,770	22,93	24,08	-
E9PHH3	Syndecan-1	SDC1	22-23	-	26,18	0,00	↓
E9PS34	Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAP1L4	-	0,728	0,00	22,19	↑
F2Z2Y4	Pyridoxal kinase	PDXK	-	0,586	22,09	22,21	-
F8VNT9	CD63 antigen	CD63	Segmento transmembrana	-	25,78	21,84	-
F8VS02	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	ALDH7A1	-	0,514	0,00	22,47	↑
F8VZJ2	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	NACA	-	0,681	23,78	25,60	-
G3V3M6	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	APEX1	-	0,622	22,91	23,66	-
H0YMZ1	Proteasome subunit alpha type	PSMA4	-	0,613	24,48	24,70	-
H7C3P9	COP9 signalosome complex subunit 3	COPS3	-	0,617	22,84	23,58	-
J3KTF8	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI1	-	0,876	27,52	27,34	-

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT + F	LFQ CT + F TFD	Diferencia significativa
J3QS39	Polyubiquitin-B	UBB	-	0,601	25,71	25,28	↓
J3QT28	Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3	-	0,760	22,74	22,93	-
K7EMV3	Histone H3	H3F3B	-	0,817	0,00	22,94	↑
O00154	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	ACOT7	-	0,666	23,21	21,73	-
O00391	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	29-30	-	25,53	21,43	-
O15498	Synaptobrevin homolog YKT6	YKT6	-	0,574	24,59	23,45	-
O43399	Tumor protein D54	TPD52L2	-	0,680	0,00	22,74	↑
O60361	Putative nucleoside diphosphate kinase	NME2P1	-	0,578	22,97	22,63	-
O60547	GDP-mannose 4,6 dehydratase	GMDS	-	0,545	22,56	21,98	-
O60664	Perilipin-3	PLIN3	-	0,559	22,65	21,94	-
O60749	Sorting nexin-2	SNX2	-	0,508	0,00	22,35	↑
O75083	WD repeat-containing protein 1	WDR1	-	0,518	21,00	20,37	-
O75223	Gamma-glutamylcyclotransferase	GGCT	-	0,503	24,00	23,54	-
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	IDH1	-	0,547	0,00	21,79	↑
O95861	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	BPNT1	-	0,682	22,85	22,20	-
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	-	0,549	28,32	29,07	-
P00491	Purine nucleoside phosphorylase (PNP)	PNP	-	0,509	24,64	23,31	-
P00492	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	HPRT1	-	0,767	23,01	21,02	-
P00505	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	GOT2	-	0,505	25,40	24,04	-
P01034	Cystatin-C	CST3	20-21	-	21,60	0,00	↓
P02786	Transferrin receptor protein 1	TFRC	-	0,611	23,54	21,77	-
P02794	Ferritin heavy chain	FTH1	-	0,621	28,24	28,47	-
P05121	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	23-24	-	25,16	21,77	-
P05783	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	-	0,725	24,58	27,79	-
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	-	0,591	23,65	22,42	-
P06733	Alpha-enolase	ENO1	-	0,536	27,41	28,07	-
P06748	Nucleophosmin	NPM1	-	0,811	23,03	23,77	-
P07093	Glia-derived nexin	SERPINE2	19-20	-	24,16	0,00	↓
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain	LDHB	-	0,569	27,46	28,04	-
P07237	Protein disulfide-isomerase	P4HB	17-18	-	0,00	22,22	↑
P07355	Annexin A2	ANXA2	-	0,746	24,22	25,65	-
P07384	Calpain-1 catalytic subunit	CAPN1	-	0,554	0,00	22,65	↑
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	FH	-	0,551	24,23	23,40	-
P08195	4F2 cell-surface antigen heavy chain	SLC3A2	-	0,644	24,47	21,65	-
P08581	Hepatocyte growth factor receptor	MET	24-25	-	22,38	0,00	↓
P08670	Vimentin	VIM	-	0,512	23,56	26,74	↑
P08758	Annexin A5	ANXA5	-	0,550	0,00	22,99	↑
P09211	Glutathione S-transferase P	GSTP1	-	0,545	24,16	23,00	-
P09661	U2 small nuclear ribonucleoprotein A'	SNRPA1	-	0,733	0,00	22,09	↑
P11021	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	18-19	-	22,09	24,20	-

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT + F	LFQ CT + F TFD	Diferencia significativa
P11166	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	SLC2A1	Segmento transmembrana	-	23,88	21,89	-
P12004	Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	-	0,566	25,31	25,86	-
P13667	Protein disulfide-isomerase A4	PDIA4	24-25	-	0,00	22,48	↑
P13796	Plastin-2	LCP1	-	0,502	0,00	22,58	↑
P14324	Farnesyl pyrophosphate synthase	FDPS	-	0,639	22,73	23,63	-
P14625	Endoplasmin	HSP90B1	21-22	-	22,17	26,33	-
P15311	Ezrin	EZR	-	0,563	0,00	22,00	↑
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha	TCP1	-	0,518	21,64	25,54	-
P18085	ADP-ribosylation factor 4	ARF4	-	0,618	23,91	24,25	-
P20340	Ras-related protein Rab-6A	RAB6A	-	0,703	24,98	24,05	-
P20645	Cation-dependent mannose-6-phosphate receptor	M6PR	26-27	-	22,28	23,08	-
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	GART	-	0,526	22,01	22,10	-
P22314	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	-	0,530	22,95	25,49	-
P23284	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	PIIB	Segmento transmembrana	-	26,84	24,91	-
P23526	Adenosylhomocysteinase	AHCY	-	0,507	27,12	26,89	-
P23528	Cofilin-1	CFL1	-	0,628	25,58	25,47	-
P26038	Moesin	MSN	-	0,530	24,59	26,26	-
P26447	Protein S100-A4	S100A4	-	0,724	0,00	22,18	↑
P27797	Calreticulin	CALR	17-18	-	21,10	24,24	-
P27824	Calnexin	CANX	20-21	-	0,00	21,95	↑
P28070	Proteasome subunit beta type-4	PSMB4	-	0,565	0,00	22,72	↑
P28074	Proteasome subunit beta type-5	PSMB5	-	0,726	24,48	24,68	-
P29218	Inositol monophosphatase 1	IMPA1	-	0,577	24,03	23,60	-
P29692	Elongation factor 1-delta	EEF1D	-	0,529	0,00	23,60	↑
P30050	60S ribosomal protein L12	RPL12	-	0,865	0,00	23,47	↑
P30153	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform	PPP2R1A	-	0,562	22,06	24,96	-
P30566	Adenylosuccinate lyase	ADSL	-	0,558	22,33	21,94	-
P30740	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	-	0,516	25,44	25,41	-
P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	MAT2A	-	0,552	23,20	23,04	-
P31431	Syndecan-4	SDC4	18-19	-	26,43	21,81	-
P32119	Peroxiredoxin-2	PRDX2	-	0,522	23,35	24,06	-
P35998	26S protease regulatory subunit 7	PSMC2	-	0,713	0,00	22,19	↑
P36955	Pigment epithelium-derived factor	SERPINF1	19-20	-	23,84	0,00	↓
P38919	Eukaryotic initiation factor 4A-III	EIF4A3	-	0,698	0,00	24,90	↑
P40926	Malate dehydrogenase, mitochondrial	MDH2	-	0,644	22,69	21,97	-
P41250	Glycine--tRNA ligase	GARS	26-27	-	23,62	24,26	-
P43487	Ran-specific GTPase-activating protein	RANBP1	-	0,602	0,00	21,96	↑
P45973	Chromobox protein homolog 5	CBX5	-	0,740	0,00	22,87	↑
P46976	Glycogenin-1	GYG1	-	0,540	25,55	26,16	-

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT + F	LFQ CT + F TFD	Diferencia significativa
P47756	F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	-	0,543	25,30	25,01	-
P50453	Serpin B9	SERPINB9	-	0,559	21,31	21,11	-
P50454	Serpin H1	SERPINH1	18-19	-	23,25	21,87	-
P50502	Hsc70-interacting protein arcinoma antigen	ST13	-	0,765	0,00	25,77	↑
P50990	T-complex protein 1 subunit theta	CCT8	-	0,508	24,89	27,18	-
P50991	T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	-	0,535	22,27	25,37	-
P51148	Ras-related protein Rab-5C	RAB5C	-	0,865	22,85	21,85	-
P52292	Importin subunit alpha-1	KPNA2	-	0,561	21,15	21,19	-
P55058	Phospholipid transfer protein	PLTP	17-18	-	23,23	0,00	↓
P56537	Eukaryotic translation initiation factor 6	EIF6	-	0,584	22,58	23,50	-
P59998	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	ARPC4	-	0,646	24,70	24,58	-
P60174	Triosephosphate isomerase	TPI1	-	0,510	26,75	26,54	-
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E	-	0,631	0,00	22,80	↑
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	-	0,631	23,20	26,80	-
P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2	UBE2N	-	0,676	23,19	23,80	-
P62158	Calmodulin	CALM1	-	0,730	23,13	23,05	-
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	-	0,582	26,61	26,81	-
P62906	60S ribosomal protein L10a	RPL10A	-	0,637	0,00	23,38	↑
P63010	AP-2 complex subunit beta	AP2B1	-	0,677	21,65	0,00	↓
P63261	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	-	0,505	27,87	29,38	-
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	-	0,733	24,10	22,86	-
P68133	Actin, alpha skeletal muscle	ACTA1	-	0,504	0,00	23,43	↑
P68366	Tubulin alpha-4A chain	TUBA4A	-	0,550	0,00	22,45	↑
P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	-	0,501	24,43	25,48	-
P81605	Dermcidin	DCD	19-20	-	24,43	22,45	-
P84077	ADP-ribosylation factor 1	ARF1	-	0,508	28,27	26,57	-
P84085	ADP-ribosylation factor 5	ARF5	-	0,650	24,14	23,04	-
Q00796	Sorbitol dehydrogenase	SORD	-	0,511	25,03	23,67	-
Q01581	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	HMGCS1	-	0,560	23,48	23,02	-
Q02413	Desmoglein-1	DSG1	23-24	-	23,46	20,96	-
Q06830	Peroxiredoxin-1	PRDX1	-	0,528	24,75	24,94	-
Q07812	Apoptosis regulator BAX	BAX	-	0,701	0,00	23,91	↑
Q08257	Quinone oxidoreductase	CRYZ	-	0,738	21,59	21,51	-
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	18-19	-	27,35	24,95	-
Q08554	Desmocollin-1	DSC1	32-33	-	23,64	21,67	-
Q09028	Histone-binding protein RBBP4	RBBP4	-	0,636	23,26	22,89	-
Q12792	Twinfilin-1	TWF1	-	0,663	0,00	22,11	↑
Q12931	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	TRAP1	-	0,619	22,48	22,56	-
Q13185	Chromobox protein homolog 3	CBX3	-	0,540	0,00	23,19	↑
Q13257	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	MAD2L1	-	0,836	23,52	23,37	-

ID	Proteína	Gen	Ubicación del sitio de corte del péptido señal	NN-score	LFQ CT + F	LFQ CT + F TFD	Diferencia significativa
Q13308	Inactive tyrosine-protein kinase 7	PTK7	30-31	-	21,55	0,00	↓
Q13838	Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	-	0,509	24,78	26,01	-
Q13885	Tubulin beta-2A chain	TUBB2A	-	0,765	0,00	24,96	↑
Q14019	Coactosin-like protein	COTL1	-	0,765	23,04	22,72	-
Q14126	Desmoglein-2	DSG2	23-24	-	21,54	0,00	↓
Q14974	Importin subunit beta-1	KPNB1	-	0,588	0,00	22,77	↑
Q15185	Prostaglandin E synthase 3	PTGES3	-	0,729	0,00	24,87	↑
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	-	0,549	0,00	22,15	↑
Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	23-24	-	23,07	21,77	-
Q15758	Neutral amino acid transporter B(0)	SLC1A5	-	0,734	25,35	23,44	-
Q15836	Vesicle-associated membrane protein 3	VAMP3	-	0,570	0,00	22,10	↑
Q15907	Ras-related protein Rab-11B	RAB11B	-	0,527	25,94	24,82	-
Q16401	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5	PSMD5	-	0,558	0,00	23,69	↑
Q16531	DNA damage-binding protein 1	DDB1	-	0,554	0,00	23,30	↑
Q5SYZ4	Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	-	0,613	21,92	21,55	-
Q5TEE2	Histone deacetylase 1	HDAC1	-	0,594	0,00	22,79	↑
Q6P988	Palmitoleoyl-protein carboxylesterase NOTUM	NOTUM	22-23	0,848	21,33	0,00	↓
Q6YHK3	CD109 antigen	CD109	21-22	0,600	23,05	0,00	↓
Q8NFW8	N-acylneuraminatase cytidyltransferase	CMAS	-	0,612	0,00	22,38	↑
Q92820	Gamma-glutamyl hydrolase	GGH	20-21	-	22,95	20,38	-
Q96CN7	Isochorismatase domain-containing protein 1	ISOC1	-	0,616	22,69	0,00	↓
Q99574	Neuroserpin	SERPINI1	18-19	-	24,43	0,00	↓
Q9BTY2	Plasma alpha-L-fucosidase	FUCA2	28-29	0,779	22,93	0,00	↓
Q9H8S9	MOB kinase activator 1A	MOB1A	-	0,729	0,00	21,33	↑
Q9HB71	Calcyclin-binding protein	CACYBP	-	0,690	22,09	22,56	-
Q9NVD7	Alpha-parvin	PARVA	-	0,811	22,94	22,20	-
Q9UBE0	SUMO-activating enzyme subunit 1	SAE1	-	0,534	0,00	22,48	↑
Q9UHY7	Enolase-phosphatase E1	ENOPH1	-	0,699	0,00	21,24	↑
Q9UNM6	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSMD13	-	0,527	21,71	24,66	-
Q9Y2Z0	Protein SGT1 homolog	SUGT1	-	0,509	21,93	21,45	-
Q9Y312	Protein AAR2 homolog	AAR2	-	0,517	0,00	22,51	↑
Q9Y3A5	Ribosome maturation protein SBDS	SBDS	-	0,627	0,00	22,24	↑
R4GN98	Protein S100	S100A6	-	0,709	23,89	25,04	-

Los cultivos 3D heterotípicos fotosensibilizados (CT + F TFD) secretaron un número significativamente mayor de proteínas en comparación a aquellos no tratados (CT + F). De las 157 proteínas identificadas en el secretoma CT + F TFD, el 13,30% fue liberado por la vía clásica y el 86,70% por la vía no clásica. Por otro lado, de las 84 proteínas identificadas en el secretoma CT + F,

el 20,20% fue liberado por la vía clásica, mientras que el 79,80% fue excretado por vías no clásicas (Figura 63).

**Figura 63. Proteínas identificadas en los secretomas de esferoides de carcinoma colorrectal heterotípicos sometidos o no a fotosensibilización.**

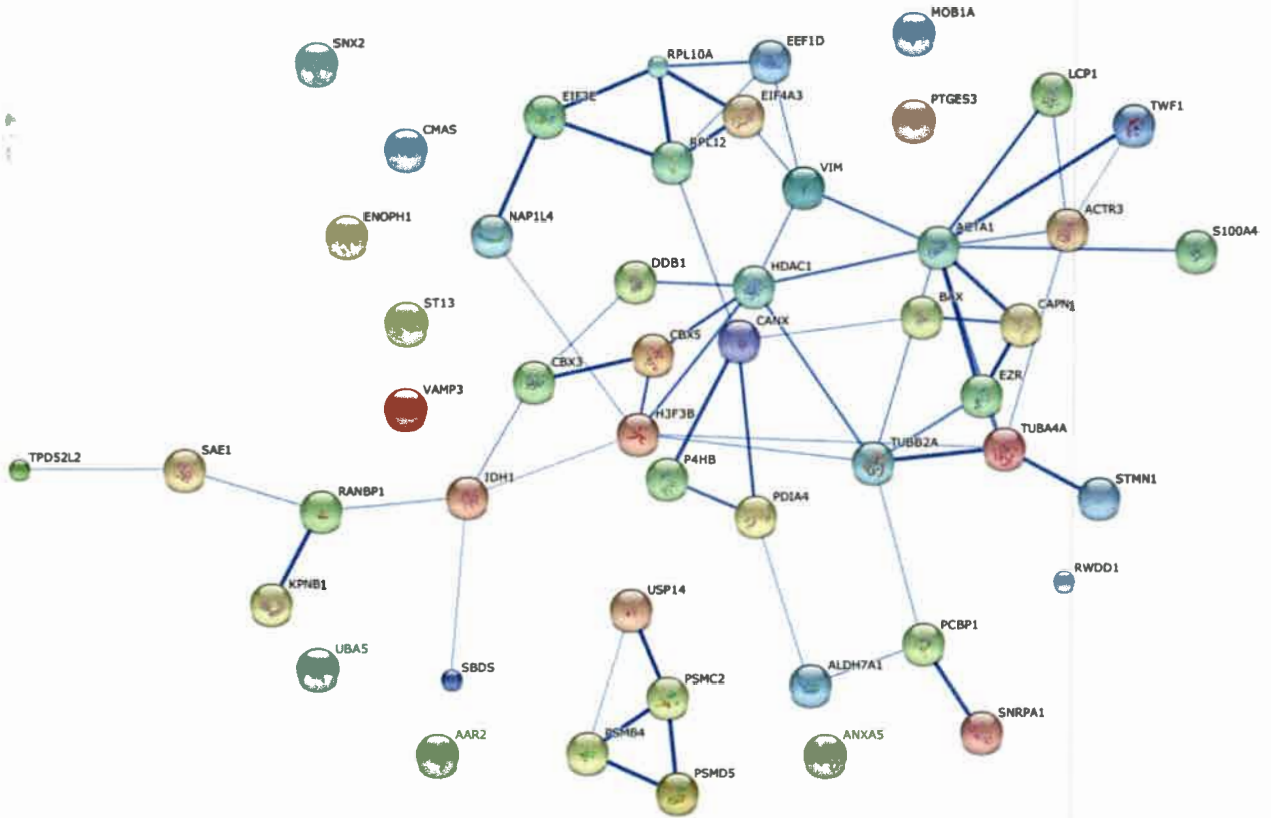
Las proteínas identificadas en los secretomas de los microtumores heterotípicos no tratados (CT + F) o tratados (CT + F TFD) con condiciones letales de tratamiento fotodinámico fueron clasificadas según su vía de secreción utilizando los software SignalP 4.1 y SecretomeP 2.0, para las vías clásicas y no clásicas, respectivamente.



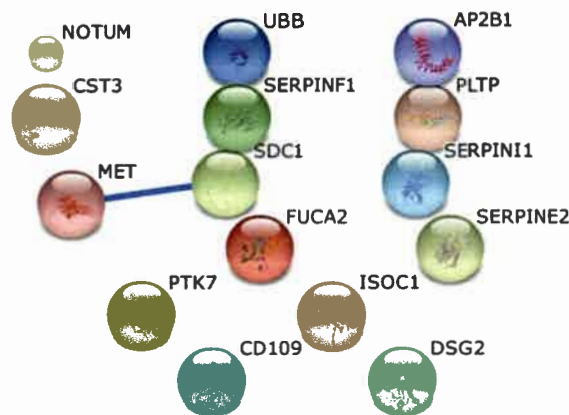
A continuación se investigaron las interacciones entre las proteínas cuya secreción aumentó o disminuyó de forma significativa debido a la presencia debido a la fotosensibilización de los tumores heterotípicos (Tabla X), utilizando el software libre String 10.

Las proteínas cuya secreción aumentó luego del tratamiento fotodinámico de los cultivos heterotípicos interactúan de forma significativa ( $n = 50$ ;  $p\text{-value} = 5,29 \times 10^{-7}$ ; interacciones observadas = 61; interacciones esperadas = 3) (Figura 64). Aquellas proteínas cuya liberación al medio extracelular se vio inhibida luego de la TFD no mostraron una interacción significativa, por lo que no se incluyeron en posteriores estudios (Figura 65).





**Figura 64.** Las proteínas cuya secreción incrementa por la TFD en esferoides heterotípicos interactúan de forma significativa. La red de interacciones fue realizada a través del software String 10. La intensidad de la línea de unión entre proteína-proteína es proporcional a la significancia biológica de la interacción entre ambas.



**Figura 65.** Las proteínas cuya secreción disminuye por la TFD en esferoides heterotípicos no interactúan de forma significativa. La red de interacciones fue realizada a través del software String 10. La intensidad de la línea de unión entre proteína-proteína es proporcional a la significancia biológica de la interacción entre ambas.

A continuación, se realizó el análisis ontológico-funcional de las proteínas cuya secreción fue inducida por la fotosensibilización de los cultivos 3D heterotípicos. Utilizando la base de datos PID

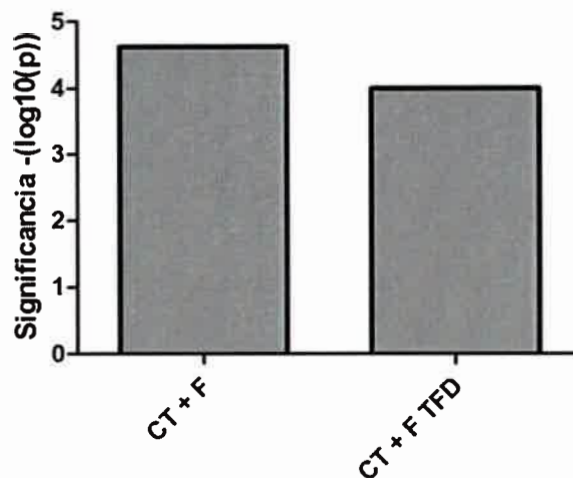
se identificaron las principales vías de señalización enriquecidas en este conjunto de proteínas (Tabla IX).

Los resultados obtenidos fueron similares a lo observado al comparar los cultivos homotípicos tratados y sin tratar con TFD (Tabla VI). La fotosensibilización aumentó la liberación de proteínas relacionadas al proceso de muerte celular, como aquellas involucradas en la cascada de activación de caspasas, probablemente en respuesta a la citotoxicidad ejercida por la terapia<sup>107</sup> (Tabla XI). Otro patrón de secreción compartido entre esferoides homo y heterotípicos post-TFD incluye las vías de señalización intracelular que serán activadas por los factores solubles liberados, tales como aquellas que involucran al receptor de glucocorticoides, la vía Hedgehog, activación de NFAT en linfocitos, entre otros (Tabla VI).

*Tabla XI. Principales vías de señalización celulares enriquecidas por el conjunto de proteínas cuya secreción aumentó en los esferoides heterotípicos fotosensibilizados. 10 vías involucradas están ordenadas según la probabilidad de que incluyan las proteínas del conjunto analizado. Cuanto menor sea el valor p, mayor será la probabilidad de que el conjunto de proteínas esté sesgado hacia un camino determinado. Los parámetros para generar el valor de p son el tamaño del conjunto de proteínas, el número de biomoléculas en una vía dada y el número de moléculas de dicha vía en la base de datos PID.*

Nombre de la vía	Biomoléculas involucradas	P-value
Señalización por Aurora B	CBX5, STMN1, VIM	2,74e-04
Apoptosis mediada por caspasas	ACTA1, BAX, VIM	8,34e-04
Regulación de la telomerasa	HDAC1, HDAC2, PTGES3	1,44e-03
Vía del factor de transcripción E2F	CBX5, HDAC1, RANBP1	1,90e-03
Vía regulatoria del receptor de glucocorticoides	BAX, HDAC1, HDAC2	2,43e-03
Eventos de señalización mediados por syndecan-2	BAX, EZR	5,29e-03
Eventos de señalización mediados por HDAC de clase III	BAX, TUBB2A	7,29e-03
Vía de señalización de RhoA	ACTA1, EZR	9,97e-03
Eventos de señalización de la vía Hedgehog mediados por Gli	HDAC1, HDAC2	1,08e-02
Rol de la vía NFAT dependiente de calcineurina en linfocitos	BAX, KPNB1	1,53e-02

Aplicando también la base de datos PID, se observó que la significancia biológica de la vía de HIF-1 disminuyó luego de la fotosensibilización (Figura 66).



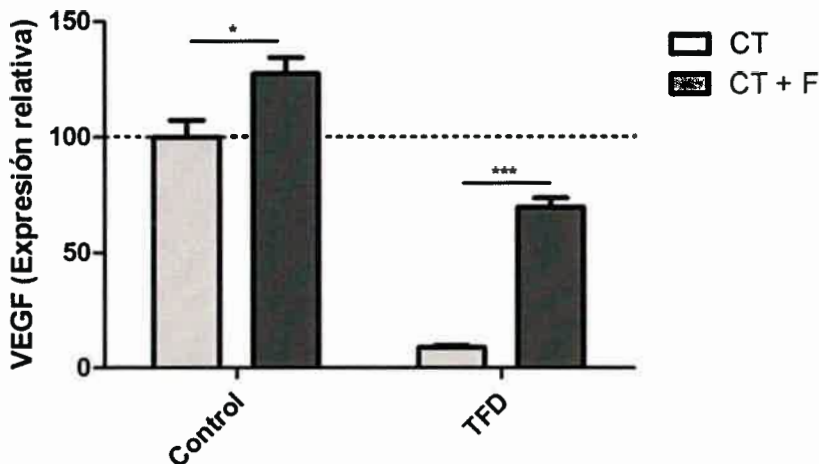
*Figura 66. La fotosensibilización disminuye la significancia biológica de la vía de HIF en el secretoma tumoral heterotípico. La significancia fue calculada como  $-\log_{10}$  del valor  $p$ , obtenido a través del análisis ontológico-funcional de las proteínas que constituyen el secretoma utilizando la base de datos PID.*

El análisis secretómico realizado sobre los factores solubles liberados por los tumores heterotípicos fotosensibilizados sugiere que, si bien la presencia de fibroblastos modifica sustancialmente el perfil de secreción proteica, la TFD modularía de forma equivalente el microambiente tumoral de CCR en presencia o ausencia de fibroblastos.

### 5.17. Implicancia de la TFD en microtumores homo y heterotípicos sobre la expresión de VEGF

El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) se ha situado como el principal protagonista del proceso de angiogénesis. Además, al ser uno de los transcritos de HIF-1 mejor caracterizados, su análisis es un marcador específico de la actividad del factor de transcripción<sup>61</sup>.

Por ello, a continuación, se estudió la regulación de la expresión de VEGF luego de la fotosensibilización en esferoides homo y heterotípicos, utilizando la técnica RT-qPCR. La transcripción del ARNm de VEGF disminuyó al fotosensibilizar tanto los monocultivos, como los cultivos mixtos. Sin embargo, la presencia de los fibroblastos bloqueó en gran medida este efecto. Por lo tanto, al comparar la expresión de VEGF entre los grupos tratados con TFD, se observó un aumento significativo de su expresión en los microtumores heterotípicos (Figura 57).



**Figura 67. La TFD modula la expresión de VEGF en microtumores homo y heterotípicos.**

Los esferoides homotípicos (CT, Célula Tumoral) y heterotípicos (CT + F, Célula Tumoral + Fibroblasto) (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. A las 24 h posteriores al tratamiento, se evaluó la expresión de VEGFa por RT-qPCR. Los niveles relativos de ARNm se calcularon según:  $2^{-\Delta\Delta CT} = [(CT \text{ gen en la muestra} - CT \text{ 18S en la muestra}) - (CT \text{ gen en el control} - CT \text{ } \beta\text{-18S en el control})]$  y los valores de expresión se normalizaron a los valores obtenidos en el control homotípico. Análisis estadístico: Anova en dos vías, Bonferroni post-test, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Referencias: control, células sin tratar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.

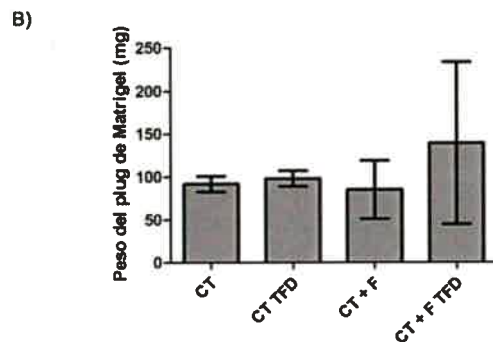
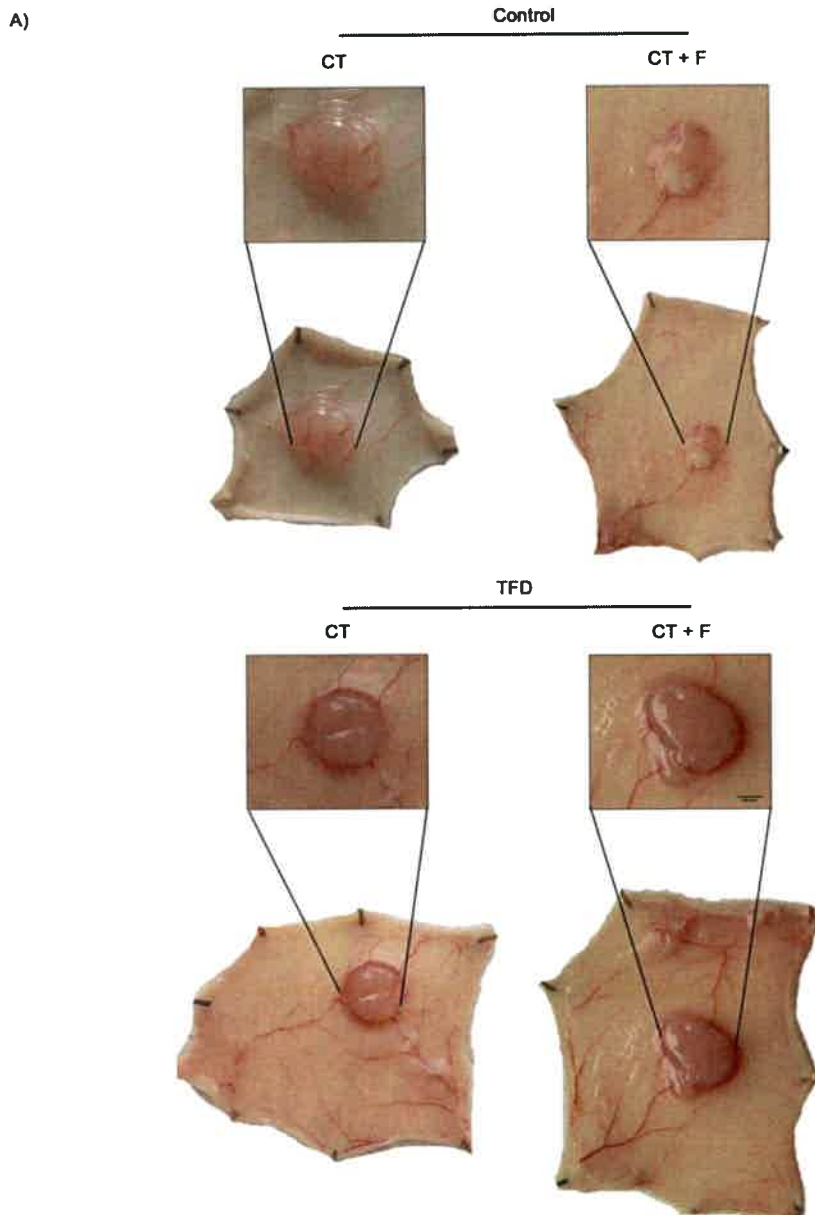
El estudio realizado por Fukumura y colaboradores<sup>144</sup> resulta sumamente interesante para ilustrar el rol de los fibroblastos en la expresión de VEGF, en concordancia con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Estos investigadores utilizaron en sus ensayos una línea de ratones transgénicos que expresaban la proteína GFP bajo el control del promotor de VEGF. Tanto al implantar tumores sólidos como al generar una herida, se observó la presencia de células fluorescentes verdes en la periferia de ambas lesiones. Sorprendentemente, los tumores formados espontáneamente también mostraron alta fluorescencia de GFP, pero no provenía de las células tumorales. Al estudiar el origen de las células GFP + en las heridas y en los dos modelos tumorales, determinaron que correspondía a la población estromal de fibroblastos. Estos datos coinciden con lo demostrado aquí, otorgándole a los fibroblastos un rol fundamental en el mantenimiento del proceso de angiogénesis en el MAT, así como de otros eventos asociados a la promoción del tumor.

### 5.18. Modulación fotodinámica del proceso de angiogénesis *in vivo*

Para determinar la implicancia de la TFD sobre la angiogénesis *in vivo*, se utilizó un método que permite determinar el potencial pro- o anti-angiogénico de una determinada señal o tratamiento. El ensayo consiste en implantar Matrigel® en el flanco de ratones de forma subcutánea, para permitir su solidificación lo que lleva a la formación de una masa o “plug”. Si previamente se introducen

junto al Matrigel® componentes relacionados a un estímulo angiogénico, entonces las células endoteliales del propio ratón migrarán en menor o mayor medida hacia el “plug” formando vasos funcionales<sup>162</sup>.

En estos experimentos, se implantó un “plug” de Matrigel® conteniendo esferoides homo o heterotípicos, tratados o sin tratar con TFD, por ratón nude (BALB/c nu/nu). Al cabo de 21 días, los “plugs” se removieron y fueron fotografiados y pesados. No se observó diferencia significativa al comparar el peso entre las 4 condiciones estudiadas (Figura 68B). Sin embargo, la información más relevante se obtuvo al visualizar la angiogénesis periférica al sitio de implantación de los esferoides. De esta forma se determinó que el reclutamiento de la vasculatura hacia el sitio de inoculación fue mayor en respuesta al estímulo proveniente de monocultivos y cultivos mixtos sometidos a TFD, en comparación con su contraparte no tratada (Figura 68).



**Figura 68. La TFD induce el reclutamiento de la vasculatura hacia el sitio tumoral**

Los esferoides homotípicos (CT, Célula Tumoral) y heterotípicos (CT + F, Célula Tumoral + Fibroblasto) (20000 células por esferoide) fueron incubados con Me-ALA (0,3 mM) durante 24 h. Posteriormente, fueron irradiados con una dosis de luz de 0,7 J/cm<sup>2</sup>. Para el estudio de la angiogénesis in vivo se implantaron subcutáneamente “plugs” en el flanco de ratones nude (BALB/c nu/nu), los cuales contenían Matrigel® junto con esferoides homo y heterotípicos tratados o no previamente con TFD. Tras 21 días de la

*implantación, los animales fueron sometidos a eutanasia mediante dislocación cervical. (A) Fotografías de la angiogénesis periférica, evidenciándose los vasos sanguíneos que irrigaban al "plug" implantado. (B) Peso de los "plugs" extraídos luego del sacrificio de los animales. Análisis estadístico: Anova en una vía, Bonferroni post-test,. Referencias: control, células sin tratar; TFD, células incubadas con la droga y posteriormente irradiadas.*

Los ensayos iniciales realizados *in vitro* abocados al estudio de la respuesta temprana del microambiente tumoral de CCR a la fotosensibilización mostraron un regulación negativa tanto de la expresión de HIF-1 como de las vías reguladas por este factor, principalmente el proceso de angiogénesis. Sin embargo, en estudios *in vivo* evaluados a largo plazo, se observó un efecto opuesto de la TFD sobre la modulación de la vasculatura. Estos datos sugieren que si bien el porcentaje de células HIF + disminuyó a las 12 h post-TFD, el aumento de la actividad transcripcional de HIF en esta población celular podría haberle conferido ventajas proliferativas y un fenotipo maligno asociado a hipoxia. Estas células sobrevivientes podrían ser las responsables de la posterior estimulación endotelial como estrategia adaptativa al daño celular causado por el estrés oxidativo y la resistencia terapéutica observada.

De forma similar a lo que acontece en los ecosistemas naturales, las especies dentro del microambiente tumoral están conectadas entre sí a través de interacciones célula-célula y con el ambiente que las rodea. Esto conlleva a una fuerte interdependencia entre las diferentes poblaciones para asegurar la adaptación y supervivencia, eventos modulados por cascadas de señalización que finalmente regularán el diálogo parácrino y autócrino de la ecología tumoral.

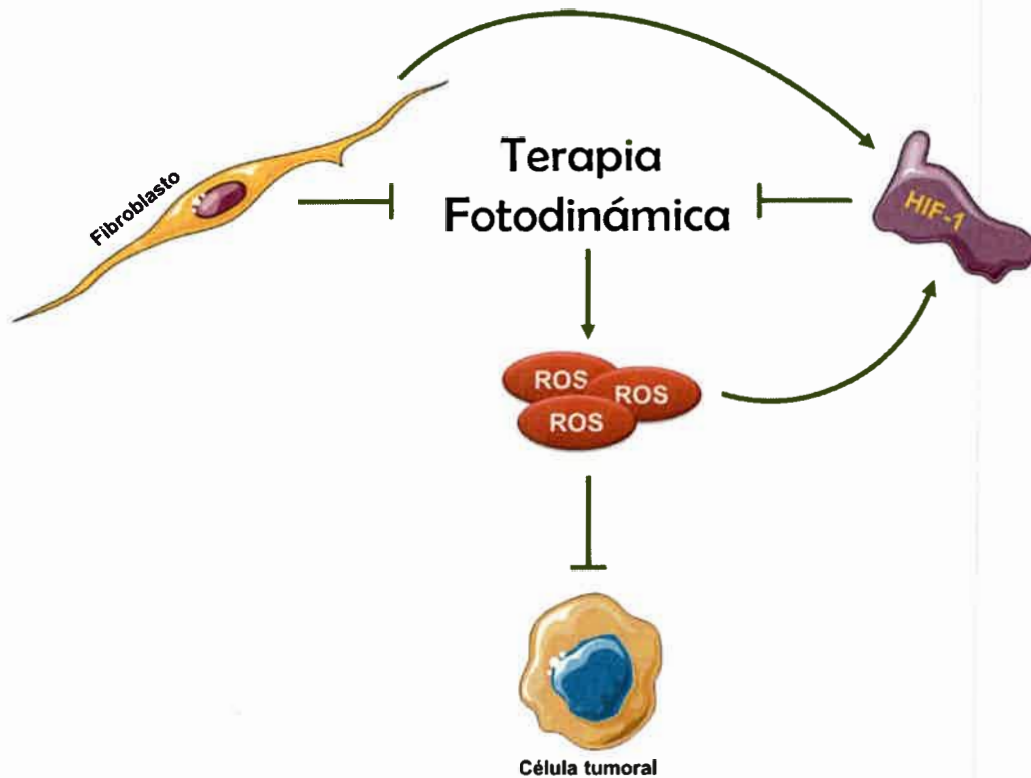
En este trabajo de investigación doctoral, hemos identificado y caracterizado la función que ejercen diferentes factores bióticos y abióticos en la respuesta del MAT colorrectal a la terapia fotodinámica. En este sentido, se demostró que la población fibroblástica otorga ventajas proliferativas y de resistencia terapéutica al tumor bajo condiciones de fotosensibilización. Por otro lado, se definió el rol del oxígeno y sus especies reactivas en la modulación del tratamiento fotodinámico a través del estudio del principal factor de transcripción regulado por hipoxia: HIF-1. La presencia de HIF-1 disminuyó significativamente la sensibilidad al tratamiento y se manifestó como un marcador presente en las células sobrevivientes (Figura 69).

Una manera de alterar un ecosistema es afectar las especies y otros factores dentro del entorno que sustenten el crecimiento y desarrollo de la especie de interés, aquí las células tumorales. Los datos presentados señalan al factor HIF-1 y la población de fibroblastos como candidatos terapéuticos cuya intervención podría beneficiar los resultados del tratamiento fotodinámico.

Por lo expuesto anteriormente, la eficiencia de la TFD podría incrementarse al modular las condiciones de tratamiento con el fin de dañar al tumor sin activar vías de supervivencia mediadas por HIF-1. Las variantes a modificar dentro del protocolo fotodinámico incluyen tipo y concentración de fotosensibilizador, tiempo de incubación previo a la irradiación, dosis e intensidad de la luz, entre otros. En los últimos años, se ha comenzado a evaluar un diseño experimental denominado terapia fotodinámica metronómica (TFDm). La TFDm consiste en una aplicación extendida y continuada en el tiempo de dosis bajas de tratamiento; esto permite la reoxigenación del tumor en los intervalos para aumentar la sensibilidad en la siguiente ronda terapéutica<sup>163</sup>.

Otra alternativa es la aplicación de terapias combinadas que interfieran con aquellos factores que contrarrestan el efecto citotóxico de la TFD. Los tratamientos combinados otorgan beneficios terapéuticos debido a que: a) incrementan la eficiencia de las terapias, b) disminuyen la dosis necesaria para mantener la misma eficiencia comparado con la aplicación independiente, inhibiendo de esta forma el nivel de toxicidad no selectiva, c) minimizan el riesgo de desarrollo de resistencia, y d) proveen un sinergismo selectivo sobre una diana, disminuyendo la toxicidad sistémica<sup>164</sup>. Si bien la combinación de TFD con el antioxidante NAC resultó antagónica en términos de viabilidad celular, también demostró una inhibición tanto del nivel de expresión como de la actividad de HIF. Por ello, surge la propuesta de diseñar regímenes terapéuticos en donde se apliquen de forma conjunta antioxidantes con la terapia fotodinámica. Éstos estarían abocados a obtener un sinergismo significativo al combinar la capacidad de los primeros en suprimir a HIF y los eventos pro-tumorigénicos regulados por este factor, y la citotoxicidad selectiva de la TFD, bajo condiciones en donde se minimice el efecto de la presencia del antioxidante sobre su actividad anticancerígena. De esta manera, se pretende eliminar al menos en parte la secreción de mediadores moleculares inducidos por el estímulo fotodinámico implicados en la vía de señalización de HIF-1. Por otro lado, el protocolo de TFD puede aplicarse junto con agentes específicamente diseñados para eliminar a la población de fibroblastos del estroma circundante, cuyo aporte a la ecología tumoral se asoció a las vías de señalización reguladas por HIF-1. En este sentido, se ha diseñado una vacuna terapéutica a ADN contra la proteína de activación de fibroblastos (“FAP”, del inglés “fibroblast activation protein”), la cual se encuentra sobreexpresada en los fibroblastos asociados al tumor<sup>165</sup>. La combinación de estas estrategias terapéuticas interreferirá en el diálogo establecido entre el estroma y el parénquima dentro del microambiente tumoral para promover resistencia, adaptación y supervivencia.





**Figura 69.** La respuesta tumoral a la TFD está influenciada por la interacción de factores bióticos y abióticos que coexisten en el microambiente tumoral colorrectal.

La TFD ejerce su efecto citotóxico a través de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que dañan de forma selectiva a las células tumorales. La eficiencia terapéutica del tratamiento fotodinámico es regulada negativamente por la presencia de fibroblastos (factor biótico) y por el factor de transcripción inducible por hipoxia, HIF-1, modulador clave de la respuesta celular a los cambios de presión de oxígeno (factor abiótico). La población fibroblástica es una de las principales responsables de la secreción de los mediadores del diálogo autócrino y parácrino asociados a la vía de señalización de HIF-1. Asimismo, el estrés oxidativo generado por la TFD incrementa la actividad de HIF en las células sobrevivientes, lo que sugiere el desarrollo de un fenotipo pro-angiogénico, metastásico e invasivo, con la consecuente recidiva tumoral.

## Referencias

1. Leibovitz, A. *et al.* Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res* **36**, 4562–4569 (1976).
2. Fogh, J., Wright, W. & Loveless, J. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* **58**, 209–214 (1977).
3. Krieg, R. C., Messmann, H., Rauch, J., Seeger, S. & Knuechel, R. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. *Photochem Photobiol.* **76**, 518–525 (2002).
4. Agostinis, P. *et al.* Photodynamic Therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* **61**, 250–281 (2011).
5. Yamamoto, M. *et al.* Improvement of the Efficacy of 5-aminolevulinic Acid-mediated Photodynamic Treatment in Human Oral Squamous Cell Carcinoma HSC-4. *Acta Med. Okayama* **67**, 153–164 (2013).
6. Bradshaw-Pierce, E. L. *et al.* Tumor P-Glycoprotein Correlates with Efficacy of PF-3758309 in in vitro and in vivo Models of Colorectal Cancer. *Front Pharmacol.* **4**, 22 (2013).
7. Lee, C., Perng, J., Chen, H., Hong, Y. & Wang, J. Undifferentiated Neuroblastoma Cells Are More Sensitive to Photogenerated Oxidative Stress Than Differentiated Cells. *J Cell Biochem.* **116**, 2074–2085 (2015).
8. Rohwer, N. & Cramer, T. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resist Updat* **14**, 191–201 (2011).
9. Freitas, I. Role of hypoxia in photodynamic therapy of tumors. *Tumori* **71**, 251–259 (1985).
10. Ji, Z. *et al.* Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett* **244**, 182–189 (2006).
11. Epstein, A. *et al.* C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* **107**, 43–54 (2001).
12. Wyld, L., Reed, M. & Brown, N. The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro. *Br J Cancer* **77**, 1621–1627 (1998).
13. Henderson, B. & Fingar, V. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res* **47**, 3110–3114 (1987).
14. Lindsay, E., Berenbaum, M., Bonnett, R. & Thomas, D. Photodynamic therapy of a mouse glioma: intracranial tumours are resistant while subcutaneous tumours are sensitive. *Br J Cancer* **63**, 242–246 (1991).

15. Thomas, C. & Pardini, R. Oxygen dependence of hypericin-induced phototoxicity to EMT6 mouse mammary carcinoma cells. *Photochem Photobiol.* **55**, 831–837 (1992).
16. Fingar, V., Wieman, T., Park, Y. & Henderson, B. Implications of a pre-existing tumor hypoxic fraction on photodynamic therapy. *J Surg Res.* **53**, 524–528 (1992).
17. Chen, Q. *et al.* Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **76**, 197–203 (2002).
18. Huang, Z. *et al.* Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **78**, 496–502 (2003).
19. Evans, C. L. *et al.* Killing hypoxic cell populations in a 3D tumor model with EtNBS-PDT. *PLoS One* **6**, e23434 (2011).
20. Klein, O., Bhayana, B., Park, Y. & Evans, C. In vitro optimization of EtNBS-PDT against hypoxic tumor environments with a tiered, high-content, 3D model optical screening platform. *Mol Pharm.* **9**, 3171–3182 (2012).
21. Koukourakis, M. I. *et al.* Hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ ) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* **61**, 1830–1832 (2001).
22. Kosharsky, B. *et al.* A mechanism-based combination therapy reduces local tumor growth and metastasis in an orthotopic model of prostate cancer. *Cancer Res.* **66**, 10953–10958. (2006).
23. De Ridder, L., Cornelissen, M. & De Ridder, D. Autologous spheroid culture: A screening tool for human brain tumour invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **36**, 107–122 (2000).
24. Kelm, J. *et al.* Design of artificial myocardial microtissues. *Tissue Eng.* **10**, 201–214. (2004).
25. Timmins, N., Dietmair, S. & Nielsen, L. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis.* **7**, 97–103 (2004).
26. Debnath, J. & Brugge, J. S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 675–88 (2005).
27. Ivanov, A. I. *et al.* Myosin II regulates the shape of three-dimensional intestinal epithelial cysts. *J. Cell Sci.* **121**, 1803–14 (2008).
28. Aranda, V., Nolan, M. & Muthuswamy, S. Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene* **27**, 6878–6887 (2008).
29. Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y. & Fabre, G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol.* **11**, 187–194 (1995).

30. Grasset, E., Pinto, M., Dussaulx, E., Zweibaum, A. & Desjeux, J. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am J Physiol.* **247**, C260–267 (1984).
31. Grasset, E., Bernabeu, J. & Pinto, M. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues. *Am J Physiol.* **248**, C410–418 (1985).
32. Inui, K., Yamamoto, M. & Saito, H. Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J Pharmacol Exp Ther.* **261**, 195–201 (1992).
33. Hidalgo, I., Raub, T. & Borchardt, R. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**, 736–749 (1989).
34. Wilson, G. *et al.* Transport and permeability properties of human Caco-2 cells: An in vitro model of the intestinal epithelial cell barrier. *J Control Release* **11**, 25–40 (1990).
35. Borchardt, R., Hidalgo, I., Hillgren, K. & Hu, M. Pharmaceutical applications of cell culture: an overview. Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport. *Life Sci* **218**, 1–14 (1991).
36. West, C. Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. *Br J Cancer.* **59**, 510–514 (1989).
37. West, C. & Moore, J. Flow cytometric analysis of intracellular hematoporphyrin derivative in human tumor cells and multicellular spheroids. *Photochem Photobiol.* **505**, 665–669 (1989).
38. Kamuhabwa, A., Huygens, A. & De Witte, P. Photodynamic therapy of transitional cell carcinoma multicellular tumor spheroids with hypericin. *Int J Oncol.* **23**, 1445–1450 (2003).
39. Marchal, S. *et al.* Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol.* **69**, 1167–1176 (2005).
40. Zelenkov, P. *et al.* Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model. *J Neurooncol.* **82**, 49–60 (2007).
41. Foster, T., Hartley, D., Nichols, M. & Hilf, R. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer Res.* **53**, 1249–1254 (1993).
42. Nichols, M. & Foster, T. Oxygen diffusion and reaction kinetics in the photodynamic therapy of multicell tumour spheroids. *Phys Med Biol.* **39**, 2161–2181 (1994).
43. Barr, H., Krasner, N., Boulos, P., Chatlani, P. & Bown, S. Photodynamic therapy for colorectal cancer: a quantitative pilot study. *Br J Surg* **77**, 93–96 (1990).
44. Alonso-de Castro, S., Ruggiero, E. & Salassa, L. Nuevos Materiales de Conversión Ascendente para Fotoquimioterapia con Complejos de Metales de Transición. (2015). at <<http://www.cicnetwork.es/entornocic/nuevos-materiales-de-conversion/>>

45. Popovic, E., Kaye, A. & Hill, J. Photodynamic therapy of brain tumors. *J Clin Laser Med Surg* **14**, 251–261 (1996).
46. Streckyte, G., Berg, K. & Moan, J. Photomodification of ALA-induced proporphyrin IX in cells in vitro. *SPIE* **2325**, 58–65 (1994).
47. Webber, J., Kessel, D. & Fromm, D. Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *J Surg Res.* **68**, 31–37 (1997).
48. Mitra, S. *et al.* Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cancer Ther* **5**, 3268–3274 (2006).
49. Vordermark, D., Shibata, T. & Brown, J. Green Fluorescent Protein is a suitable reporter of tumor hypoxia despite an oxygen requirement for chromophore formation. *Neoplasia* **3**, 527–534 (2001).
50. Loboda, A., Jozkowicz, A. & Dulak, J. HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Mol Cells.* **29**, 435–442 (2010).
51. Mole, D. *et al.* Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem.* **284**, 16767–16775 (2009).
52. Wenger, R. H., Stiehl, D. P. & Camenisch, G. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE* **306**, re12 (2005).
53. Kim, J. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin Cancer Biol* **15**, 365–377 (2005).
54. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. a. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* **4**, 309–324 (2009).
55. Skiles, M., Sahai, S., Rucker, L. & Blanchette, J. Use of culture geometry to control hypoxia-induced vascular endothelial growth factor secretion from adipose-derived stem cells: optimizing a cell-based approach to drive vascular growth. *Tissue Eng Part A.* **19**, 2330–2338 (2013).
56. Marushima, H. *et al.* Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF $\beta$  stimulation. *Int J Oncol.* **39**, 1327–1336 (2011).
57. Le Roux, L. *et al.* Optimizing imaging of three-dimensional multicellular tumor spheroids with fluorescent reporter proteins using confocal microscopy. *Mol Imaging.* **7**, 214–221 (2008).
58. Berchner-Pfannschmidt, U., Frede, S., Wotzlaw, C. & Fandrey, J. Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *Eur Respir J* **32**, 210–217 (2008).
59. Indovina, P., Collini, M., Chirico, G. & Santini, M. Three-dimensional cell organization leads to almost immediate HRE activity as demonstrated by molecular imaging of MG-63 spheroids using two-photon excitation microscopy. *FEBS Lett.* **581**, 719–726 (2007).

60. Harada, H. in *Targets Gene Ther.* 185–200 (2011).
61. Cross, M. & Claesson-Welsh, L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci.* **22**, 201–207. (2001).
62. Kelty, C., Brown, N., Reed, M. & Ackroyd, R. The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitizer in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci.* **1**, 158–168 (2002).
63. Liu, Y., Ang, S., Weigent, D., Prchal, J. & Bloomer, J. Regulation of ferrochelatase gene expression by hypoxi. *Life Sci.* **75**, 2035–2043 (2004).
64. Xiang, L. *et al.* Hypoxia-inducible factor-2a is associated with ABCG2 expression, histology-grade and Ki67 expression in breast invasive ductal carcinoma. *Diagn Pathol* **7**, 32 (2012).
65. Martin, C. *et al.* Hypoxia-inducible factor-2alpha transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circ Res.* **102**, 1075–1081 (2008).
66. Jin, F., Brockmeier, U., Otterbach, F. & Metzen, E. New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol Cancer Res.* **10**, 1021–1031 (2012).
67. Chen, W., Lecaros, R., Tseng, Y., Huang, L. & Hsu, Y. Nanoparticle delivery of HIF1 $\alpha$  siRNA combined with photodynamic therapy as a potential treatment strategy for head-and-neck cancer. *Cancer Lett.* **359**, 65–74 (2015).
68. Alemany-Ribes, M. *et al.* Why Not Introducing the Third Dimension in Photodynamic Therapy Research? *J Anal Bioanal Tech* En prensa (2013).
69. Soboleski, M., Oaks, J. & Halford, W. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J* **19**, 440–442 (2005).
70. Moeller, B., Cao, Y., CY, L. & Dewhirst, M. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell.* **5**, 429–441 (2004).
71. Ferrario, A. *et al.* Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res* 4066–4069 (2000).
72. Yang, Z. *et al.* Knock down of the dual functional protein apurinic /apyrimidinic endonuclease 1 enhances the killing effect of hematoporphyrin derivative-mediated photodynamic therapy on non-small cell lung cancer cells in vitro and in a xenograft model. *Cancer Sci.* **101**, 180–187 (2010).
73. Agostinis, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin.* **61**, 250–281 (2011).
74. Bárdos, J. & Ashcroft, M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochim Biophys Acta.* **1755**, 107–120 (2005).

75. Price, M. & Kessel, D. On the use of fluorescence probes for detecting reactive oxygen and nitrogen species associated with photodynamic therapy. *J Biomed Opt.* **15**, 051605 (2010).
76. Eruslanov, E. & Kusmartsev, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* **594**, 57–72 (2010).
77. Donnelly, R., McCarron, P. & Woolfson, A. Derivatives of 5-aminolevulinic Acid for photodynamic therapy. *Perspect Med. Chem* **1**, 49–63 (2008).
78. Feng, X., Zhang, Y., Wang, P., Liu, Q. & Wang, X. Energy metabolism targeted drugs synergize with photodynamic therapy to potentiate breast cancer cell death. *Photochem Photobiol Sci.* **13**, 1793–1803 (2014).
79. Matroule, J. *et al.* Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene.* **20**, 4070–4084 (2001).
80. Galanis, A. *et al.* Reactive oxygen species and HIF-1 signalling in cancer. *Cancer Lett* **266**, 12–20 (2008).
81. Richard, D. E., Berra, E. & Pouyssegur, J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 26765–71 (2000).
82. Jung, S. *et al.* Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* **29**, 713–721 (2008).
83. Chandel, N. *et al.* Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem.* **275**, 25130–25138 (2000).
84. Bell, E. *et al.* The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J Cell Biol.* **177**, 1029–1036 (2007).
85. Almeida, R., Manadas, B., Carvalho, A. & Duarte, C. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta.* **1704**, 59–86 (2004).
86. Richard, D., Berra, E., Gothié, E., Roux, D. & Pouyssegur, J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem.* **274**, 32631–32637 (1999).
87. Mylonis, I. *et al.* Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* **281**, 33095–33106 (2006).
88. Sang, N. *et al.* MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300. *J Biol Chem.* **278**, 14013–14019 (2003).
89. Torres, M. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Front Biosci.* **8**, d369–391 (2003).

90. Abe, J., Kusuhara, M., Ulevitch, R., Berk, B. & Lee, J. Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem.* **271**, 16586–16590 (1996).
91. Baas, A. & Berk, B. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **77**, 29–36 (1995).
92. Karagiannis, G., Pavlou, M. & Diamandis, E. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol.* **4**, 496–510 (2010).
93. Levin, V. *et al.* Different changes in protein and phosphoprotein levels result from serum starvation of high-grade glioma and adenocarcinoma cell lines. *J Proteome Res.* **9**, 179–191 (2010).
94. Zander, L. & Bemark, M. Identification of genes deregulated during serum-free medium adaptation of a Burkitt's lymphoma cell line. *Cell Prolif.* **41**, 136–155 (2008).
95. Cooper, S. Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G<sub>0</sub>, and G<sub>1</sub> phase arrest points. *FASEB J.* **17**, 333–340 (2003).
96. Srisomsap, C. *et al.* Proteomic analysis of cholangiocarcinoma cell line. *Proteomics.* **4**, 1135–1144 (2004).
97. Xue, H. *et al.* Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach. *J Proteome Res.* **9**, 545–555 (2010).
98. Petersen, T., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods.* **8**, 785–786 (2011).
99. Bendtsen, J., Jensen, L., Blom, N., Von Heijne, G. & Brunak, S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng Des Sel.* **17**, 349–356 (2004).
100. Villarreal, L. *et al.* Unconventional secretion is a major contributor of cancer cell line secretomes. *Mol Cell Proteomics.* **12**, 1046–1060 (2013).
101. Butler, G. & Overall, C. Proteomic identification of multitasking proteins in unexpected locations complicates drug targeting. *Nat Rev Drug Discov.* **8**, 935–948 (2009).
102. Radisky, D., Stallings-Mann, M., Hirai, Y. & Bissell, M. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 228–234 (2009).
103. Paltridge, J., Belle, L. & Khew-Goodall, Y. The secretome in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* **1834**, 2233–2241 (2013).
104. Von Mering, C. *et al.* STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Res.* **31**, 258–261 (2003).
105. Ashburner, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000 May;25(1)25-9 **25**, 25–29 (2000).



106. Schaefer, C. *et al.* PID: the Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Res.* **37**, D674–D679 (2009).
107. Agostinis, P., Buytaert, E., Breysens, H. & Hendrickx, N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci.* **3**, 721–729 (2004).
108. Katayama, H., Brinkley, W. & Sen, S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 451–464 (2003).
109. Stewart, S. *et al.* Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 12606–12611 (2002).
110. Dang, C. *et al.* The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol.* **16**, 253–264 (2006).
111. Furuya, M., Tsuji, N., Kobayashi, D. & Watanabe, N. Interaction between survivin and aurora-B kinase plays an important role in survivin-mediated up-regulation of human telomerase reverse transcriptase expression. *Int J Oncol.* **34**, 1061–1068 (2009).
112. Cogno, I., Vittar, N., Lamberti, M. & Rivarola, V. Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells. *J Photochem Photobiol B.* **104**, 434–443 (2011).
113. Morgan, M., Humphries, M. & Bass, M. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 957–969 (2007).
114. Toth, I., Yuan, L., Rogers, J., Boyce, H. & Bridges, K. Hypoxia alters iron-regulatory protein-1 binding capacity and modulates cellular iron homeostasis in human hepatoma and erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* **274**, 4467–4473 (1999).
115. Gozzelino, R. & Arosio, P. Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* **17**, pii: E130 (2016).
116. Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A. & Cairo, G. Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem.* **274**, 24142–24146 (1999).
117. Tacchini, L., Gammella, E., De Ponti, C., Recalcati, S. & Cairo, G. Role of HIF-1 and NF-kappaB transcription factors in the modulation of transferrin receptor by inflammatory and anti-inflammatory signals. *J Biol Chem.* **283**, 20674–20686 (2008).
118. De Gassart, A., Geminard, C., Fevrier, B., Raposo, G. & Vidal, M. Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood.* **102**, 4336–4344 (2003).
119. Calzolari, A. *et al.* TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Sci.* **Pt 21**, 4486–4498 (119AD).
120. Liekens, S., De Clercq, E. & Neyts, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* **61**, 253–270 (2001).

121. Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K. & Benton, G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* **12**, 267–74 (2009).
122. Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932–936 (2005).
123. Bhuvaneswari, R. *et al.* Molecular profiling of angiogenesis in hypericin mediated photodynamic therapy. *Mol Cancer* **7**, 56 (2008).
124. Mitra, S. & Foster, T. Photochemical oxygen consumption sensitized by a porphyrin phosphorescent probe in two model systems. *Biophys J* **78**, 2597–2605 (2000).
125. Allison, R. & Moghissi, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* **46**, 24–29 (2013).
126. Weiss, A., den Bergh, H. Van, Griffioen, A. W. & Nowak-Sliwinska, P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. *Biochim Biophys Acta*. **1826**, 53–70 (2012).
127. Bhuvaneswari, R., Gan, Y. Y., Soo, K. C. & Olivo, M. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2275–2283 (2009).
128. Rumie Vittar, N. *et al.* Ecological photodynamic therapy: new trend to disrupt the intricate networks within tumor ecosystem. *Biochim Biophys Acta*. **1835**, 86–89 (2013).
129. Gamaleia, N. *et al.* Chronobiological approaches to antiangiogenic photodynamic therapy of tumors: the first experimental evaluation. *Exp Oncol*. **34**, 364–366 (2012).
130. Tong, Z., Miao, P., Liu, T., Jia, Y. & Liu, X. Enhanced antitumor effects of BPD-MA-mediated photodynamic therapy combined with adriamycin on breast cancer in mice. *Acta Pharmacol Sin*. **33**, 1319–1324 (2012).
131. Peddareddigari, V. G., Wang, D. & Dubois, R. N. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron*. **3**, 149–66 (2010).
132. Ungefroren, H., Sebens, S., Seidl, D., Lehnert, H. & Hass, R. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal* **9**, 18 (2011).
133. Dvorak, H. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. **315**, 1650–1659 (1986).
134. Witz, I. P. The tumor microenvironment: the making of a paradigm. *Cancer Microenviron* **2**, 9–17 (2009).
135. Bissell, M. & Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. **1**, 46–54 (2001).
136. Yen, T. *et al.* Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinomas. *Surgery* **131**, 129–134 (2002).

137. Adegboyega, P., Mifflin, R., DiMari, J., Saada, J. & Powell, D. Immunohistochemical study of myofibroblasts in normal colonic mucosa, hyperplastic polyps, and adenomatous colorectal polyps. *Arch Pathol Lab Med.* **126**, 829–836 (2002).
138. Liotta, L., Rao, C. & Barsky, S. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest.* **49**, 636–649 (1983).
139. Heldin, C. H. & Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev.* **79**, 1283–1316 (1999).
140. Netti, P., Berk, D., Swartz, M., Grodzinsky, A. & Jain, R. Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res.* **60**, 2497–2503 (2000).
141. Tommelein, J. *et al.* Cancer-associated fibroblasts connect metastasis-promoting communication in colorectal cancer. *Front Oncol.* **63** (2015).
142. Fang, C. *et al.* Novel Phenotypic Fluorescent Three-Dimensional Co-Culture Platforms for Recapitulating Tumor in vivo Progression and for Personalized Therapy. *J. Cancer* **4**, 755–63 (2013).
143. Tsujino, T. *et al.* Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* **13**, 2082–2090 (2007).
144. Fukumura, D. *et al.* Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell.* **94**, 715–725 (1998).
145. Melino, G., De Laurenzi, V. & Vousden, K. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* **2**, 605–6015 (2002).
146. Borer, R., Lehner, C., Eppenberger, H. & Nigg, E. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* **56**, 379–390 (1989).
147. Redner, R. Variations on a theme: the alternate translocations in APL. *Leukemia.* **16**, 1927–1932 (2002).
148. Yoneda-Kato, N. *et al.* The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene.* **12**, 265–275 (1996).
149. Chiarle, R. *et al.* NPM-ALK transgenic mice spontaneously develop T-cell lymphomas and plasma cell tumors. *Blood.* **101**, 1919–1927 (2003).
150. Van Belzen, N. *et al.* Identification of mRNAs that show modulated expression during colon carcinoma cell differentiation. *Eur J Biochem.* **234**, 843–848 (1995).
151. Feuerstein, N. & Mond, J. Identification of a prominent nuclear protein associated with proliferation of normal and malignant B cells. *J Immunol.* **139**, 1818–1822 (1987).
152. Li, J., Zhang, X., Sejas, D., Bagby, G. & Pang, Q. Hypoxia-induced Nucleophosmin Protects Cell Death through Inhibition of p53. *J Biol Chem.* **279**, 41275–41279 (2004).

153. Taylor, D. & Gerçel-Taylor, C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects. *Br J Cancer*. **92**, 305–311 (2005).
154. McMahon, G. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem*. **276**, 33964–33968 (2001).
155. Isogai, C. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Res*. **61**, 5587–5594 (2001).
156. Jung, S., Song, H., Park, S., Chung, S. & Kim, Y. Pyruvate promotes tumor angiogenesis through HIF-1-dependent PAI-1 expression. *Int J Oncol* **38**, 571–576 (2011).
157. Ahn, Y. *et al.* Rodent-specific hypoxia response elements enhance PAI-1 expression through HIF-1 or HIF-2 in mouse hepatoma cells. *Int J Oncol*. **37**, 1627–1638 (2010).
158. Denko, N. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. **8**, 705–713 (2008).
159. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. **6**, 392–401 (2006).
160. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. & Johnston, P. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* **13**, 714–726 (2013).
161. Glidden, M. D., Massodi, I., Rizvi, I., Celli, J. P. & Hasan, T. Probing tumor-stroma interactions and response to photodynamic therapy in a 3D pancreatic cancer-fibroblast co-culture model. *Proc. SPIE* **8210**, 821006 (2012).
162. Szade, K. *et al.* Spheroid-plug model as a tool to study tumor development, angiogenesis, and heterogeneity in vivo. *Tumour Biol*. In press (2015).
163. Bisland, S., Lilge, L., Lin, A., Rusnov, R. & Wilson, B. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem Photobiol*. **80**, 22–30 (2004).
164. Miles, D., von Minckwitz, G. & Seidman, A. Combination versus sequential single-agent therapy in metastatic breast cancer. *Oncologist*. **7**, 13–19 (2002).
165. Loeffler, M., Krüger, J., Niethammer, A. & Reisfeld, R. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J Clin Invest*. **116**, 1955–1962 (2006).

**Conclusiones**



## 6. Conclusiones

La caracterización de los eventos biológicos y moleculares establecidos dentro del microambiente tumoral hipóxico sometido a condiciones letales de TFD demostró que:

- El factor de transcripción HIF-1a confiere resistencia a la intervención fotodinámica.
- La TFD modula positivamente la actividad de HIF a través de la estimulación del eje TFD→ROS→ERK1/2, aunque disminuye el porcentaje de células tumorales con HIF activo.
- La fotosensibilización de las células tumorales suprime su estimulación parácrina proangiogénica sobre el endotelio a corto plazo, aunque la incrementa a largo plazo.
- La presencia de fibroblastos incrementa la supervivencia tumoral luego del tratamiento fotodinámico y exacerba el impacto de la vía de HIF-1 en el microambiente tumoral.

**Los fibroblastos y los mediadores de la señalización intracelular, autócrina y parácrina establecidos dentro y fuera del tumor constituyen una excelente diana terapéutica para incrementar la eficiencia de la Terapia Fotodinámica**