

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física
Facultad de Medicina y Odontología
Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea**

**Efecto de la resección hepática sobre el
comportamiento de las células tumorales residuales
y
utilidad del ATRA para controlar dicho efecto en un
modelo experimental**

Iñaki Díaz Sanz

Directores de Tesis

Prof. Ignacio García-Alonso Montoya

Prof. Teodoro Palomares Casado

Leioa, mayo de 2.011

Son muchas las personas que debieran encontrarse entre estas líneas de agradecimiento por lo que, por la imposibilidad de citar a todas, sepan que las tengo en mis recuerdos.

En primer lugar a Jesús Mari Almazán, por haberme metido el “gusanillo de la ciencia” desde pequeño en sus clases.

A cuantas personas -como Pablo Areso y Alfredo Allende - me han contagiado su propia experiencia con el mundo científico a lo largo del camino.

A Susperregui, Larrea, Teo, Iván y demás amigos que se interesaban por mis avances a lo largo de los años universitarios.

A mi director Nacho García-Alonso y codirectores de Tesis Teodoro Palomares y Ana Alonso, por su paciencia y dedicación durante estos años.

A todos vosotros, MUCHAS GRACIAS. ¡Llegamos a la meta!

A mis padres, mi hermano y mi novia por estar siempre en los buenos y en los malos momentos, por disfrutar de mis alegrías y por “sobrellevar” mis agobios y frustraciones.

INDICE

Introducción	1
1.- EL CÁNCER DE COLON Y RECTO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.1. Etiología y factores de riesgo	¡Error! Marcador no definido.
1.2. Epidemiología	¡Error! Marcador no definido.
2.- CIRUGÍA Y FACTORES DE CRECIMIENTO . ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	
2.1. Cicatrización de las heridas.	¡Error! Marcador no definido.
2.1.1. Fase inicial.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.2. Citocinas y cicatrización.....	¡Error! Marcador no definido.
2.1.3. Fase proliferativa	¡Error! Marcador no definido.
2.1.4. Fase de remodelado	¡Error! Marcador no definido.
2.2. Regeneración hepática.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1. Regeneración hepatocitaria.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2. Otras estirpes celulares del hígado.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3. Regulación del proceso.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3. Factores de Crecimiento y desarrollo tumoral.....	¡Error! Marcador no definido.
3.- RETINOIDES EN TERAPÉUTICA ONCOLÓGICA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.- MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4.1. Anatofo-fisiología del hígado de la rata.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1.1. Estructura anatómica.....	¡Error! Marcador no definido.
4.1.2. Vascularización hepática	¡Error! Marcador no definido.
4.1.3. Inervación del hígado	¡Error! Marcador no definido.
4.1.4. El sistema biliar	¡Error! Marcador no definido.
4.1.5. Fisiología hepática	¡Error! Marcador no definido.
4.2. Modelos experimentales de metástasis hepáticas	¡Error! Marcador no definido.
Hipótesis	38
Material y Métodos	43
1. EXPERIMENTOS IN VITRO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.1. Células	¡Error! Marcador no definido.

1.1.1. Origen	¡Error! Marcador no definido.
1.1.2. Amplificación y almacenamiento.....	¡Error! Marcador no definido.
1.1.3. Cultivo en placas de 24 pocillos	¡Error! Marcador no definido.
1.1.4. Cultivo en placas de 96 pocillos	¡Error! Marcador no definido.
1.2. Técnicas de recuento celular	¡Error! Marcador no definido.
1.2.1. Recuento mediante hemocitómetro	¡Error! Marcador no definido.
1.2.2. Valoración de la proliferación mediante MTT	¡Error! Marcador no definido.
1.2.3. NucleoCounter	¡Error! Marcador no definido.
1.2.4. xCELLigence	¡Error! Marcador no definido.
1.3. Cálculo de la viabilidad celular	¡Error! Marcador no definido.
1.3.1. Mediante el uso del hemocitómetro	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2. Mediante el uso del lector NucleoCounter.....	¡Error! Marcador no definido.
1.4. Estudios de proliferación.....	¡Error! Marcador no definido.
1.5. Biomoléculas utilizadas	¡Error! Marcador no definido.
1.5.1. Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF)	¡Error! Marcador no definido.
1.5.2. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)	¡Error! Marcador no definido.
1.5.3. Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)	¡Error! Marcador no definido.
1.5.4. Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb)	¡Error! Marcador no definido.
1.5.5. Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF).....	¡Error! Marcador no definido.
1.5.6. Ácido All Trans Retinoico (ATRA)	¡Error! Marcador no definido.
1.5.7. 5-Fluorouracilo (5-FU).....	¡Error! Marcador no definido.
2. EXPERIMENTOS IN VIVO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1. Animales utilizados	¡Error! Marcador no definido.
2.2. Técnicas quirúrgicas	¡Error! Marcador no definido.
2.2.1. Inoculación de células tumorales	¡Error! Marcador no definido.
2.2.2. Hepatectomía parcial.....	¡Error! Marcador no definido.
2.2.3. Obtención de suero de rata	¡Error! Marcador no definido.
2.2.4. Eutanasia de los animales.....	¡Error! Marcador no definido.
2.3. Recuento de focos metastáticos y supervivencia	¡Error! Marcador no definido.
2.4. Fármacos utilizados.....	¡Error! Marcador no definido.
2.4.1. Ácido All Trans Retinoico (ATRA)	¡Error! Marcador no definido.
2.4.2. 5-Fluorouracilo (5-FU).....	¡Error! Marcador no definido.
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.1. Comparaciones entre dos grupos	¡Error! Marcador no definido.
3.2. Comparación entre tres o más grupos.....	¡Error! Marcador no definido.
3.3. Estudios de Supervivencia	¡Error! Marcador no definido.
Resultados	63
1. ESTUDIOS “IN VITRO”	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

- 1.1. Efecto del suero de rata sobre cultivos de ACC-531**..... ¡Error! Marcador no definido.
- 1.1.1. Proliferación “in vitro” con suero de rata normal **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.1.2. Proliferación “in vitro” con suero de rata hepatectomizada (SRH) **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.1.3. Comparación entre el suero de rata hepatectomizada (SRH) y de rata normal (SRN) **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.2. Efecto de los factores de crecimiento sobre las células tumorales** ¡Error! Marcador no definido.
- 1.2.1. Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF) **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.2.2. Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.2.3. Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.2.4. Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb) **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.2.5. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.3. Efecto del ATRA sobre el desarrollo tumoral**..... ¡Error! Marcador no definido.
- 1.3.1. Efecto sobre cultivos de ACC-531 **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.3.2. Comportamiento del cultivo tras exposiciones repetidas al fármaco **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4. Efecto del 5-FU sobre cultivos de ACC-531** ¡Error! Marcador no definido.
- 1.4.1. Efecto del 5-FU sobre cultivos suplementados con SFB **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4.2. Efecto del 5-FU sobre cultivos suplementados con SRN **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4.3. Efecto del 5-FU sobre cultivos complementados con SRH **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4.4 Efecto del 5-FU sobre el HGF **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4.5. Efecto del 5-FU sobre el EGF..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4.6. Efecto del 5-FU sobre el PDGF **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4.7. Efecto del 5-FU sobre el FGFb..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.4.7. Efecto del 5-FU sobre el VEGF **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.5. Efecto del ATRA sobre cultivos tratados con 5-FU** ¡Error! Marcador no definido.
- 1.5.1. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con SR y tratados con 5-FU..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.5.2. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con HGF e inhibidos con 5-FU .. **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.5.3. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con EGF e inhibidos con 5-FU ... **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.5.4. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con PDGF e inhibidos con 5-FU **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.5.5. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con FGFb e inhibidos con 5-FU . **¡Error! Marcador no definido.**
- 1.5.6. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con VEGF e inhibidos con 5-FU . **¡Error! Marcador no definido.**
- 2. ESTUDIOS “IN VIVO”** **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
- 2.1. Efecto de la hepatectomía sobre el desarrollo metastásico**..... ¡Error! Marcador no definido.
- 2.2. Tratamiento con ATRA** ¡Error! Marcador no definido.
- 2.2.1. Efecto sobre el desarrollo metastásico..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 2.2.2. Efecto sobre la supervivencia **¡Error! Marcador no definido.**
- 2.3. Tratamiento con 5-Fluor Uracilo** ¡Error! Marcador no definido.
- 2.3.1. Elección de la dosis terapéutica..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 2.3.2. Efecto sobre el desarrollo metastásico..... **¡Error! Marcador no definido.**
- 2.3.3. Efecto sobre la supervivencia **¡Error! Marcador no definido.**
- 2.4. Tratamiento con ATRA y 5-Fluor Uracilo** ¡Error! Marcador no definido.

2.4.1. Efecto sobre la evolución metastásica..... ¡Error! Marcador no definido.
2.4.2. Efecto sobre la supervivencia ¡Error! Marcador no definido.

Discusión197

Bibliografía212

INTRODUCCIÓN

1.- El cáncer de colon y recto

Las estructuras anatómicas que forman el tracto gastrointestinal inferior son el colon, el recto y el ano. Aunque existen importantes diferencias fisiológicas entre estos segmentos y posiblemente diferentes factores de riesgo para el cáncer de estas localizaciones, los estadios y la supervivencia para los de colon y recto son similares, por lo que de forma habitual se habla del cáncer colorrectal como un conjunto.

El cáncer colorrectal (CCR) es un problema mundial, con una incidencia anual de aproximadamente 1 millón de casos, y una mortalidad anual de más de 500.000. Así, el CCR es la segunda causa de mortalidad por cáncer entre hombres y mujeres. Además, se prevé que el número absoluto de casos aumentará en las próximas dos décadas como resultado del envejecimiento y la expansión de las poblaciones, tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo (1, 2).

Se postula que la iniciación del carcinoma colorrectal está en íntima relación con el desarrollo de alteraciones en el genoma, y se desarrolla a partir de una fase previa de adenoma que, tras sucesivos acontecimientos, da lugar al cáncer. Así, el pólipo adenomatoso está considerado la lesión premaligna del carcinoma colorrectal, por lo que su diagnóstico precoz es fundamental, cuando todavía es posible la curación endoscópica o quirúrgica.

La inmensa mayor parte de los carcinomas colorrectales son adenocarcinomas glandulares, y se caracterizan por la invasión de los tejidos o estructuras circundantes y por su potencial para metastatizar, bien por vía linfática o vascular.

Cerca del 50% de los pacientes con cáncer del colon desarrollarán metástasis hepáticas, ya sea en el momento de la presentación inicial o como resultado de la recidiva de la enfermedad. Aunque solo una pequeña parte de los pacientes con metástasis hepáticas son aptos para someterse a resección quirúrgica, los avances en las técnicas de ablación del tumor y en la administración de quimioterapia regional y sistémica ofrecen varias opciones de tratamiento (3).

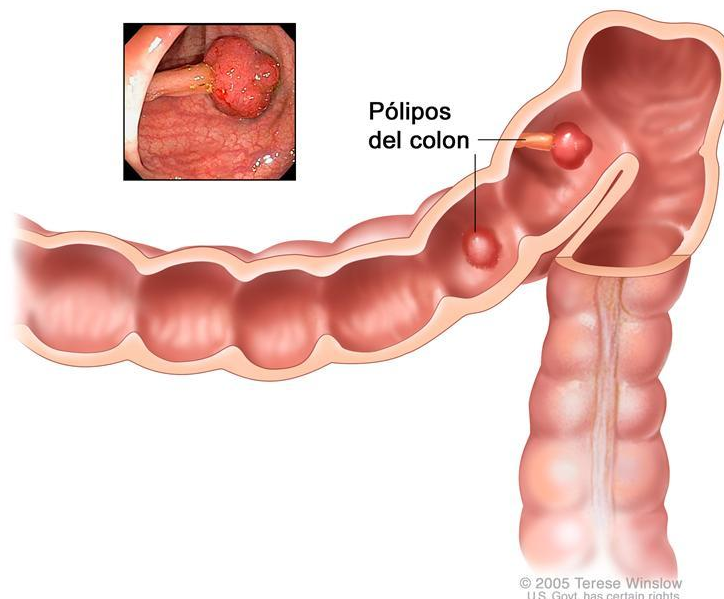


Figura 1. Pólipos en el colon (3).

1.1. Etiología y factores de riesgo

En la actualidad se acepta la existencia de diversos factores genéticos y ambientales que favorecen la aparición del cáncer colorrectal.

Entre los factores genéticos destaca la alteración en el gen supresor de tumores APC (adenomatous polyposis coli) identificado por Groden y cols. en 1991 (4). La inactivación del gen APC se ha encontrado en más del 80% de los casos descritos de tumores colorrectales, apareciendo como una alteración temprana durante el desarrollo del pólipo adenomatoso. Su modificación da lugar a afecciones hereditarias, como poliposis adenomatosa familiar (FAP) y cáncer de cólon hereditario no polipósico (HNPCC). La FAP es una entidad autosómica dominante, aunque un tercio de los casos nuevos son provocados por una mutación de novo. Por su parte, el cáncer colorrectal no polipósico hereditario (HNPCC) o síndrome de Lynch, con transmisión autosómica dominante, es la forma más común de cáncer colorrectal familiar síndromico. Para su diagnóstico, un grupo de consenso estableció una lista de criterios clínicos (criterios de Amsterdam II) que han de cumplirse para considerar que un paciente presenta fenotipo HNPCC (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de Amsterdam II para cáncer colorrectal no polipósico hereditario (HNPCC).

- Hay por lo menos tres parientes con cáncer colorrectal o con otros cánceres vinculados a HNPCC (endometrio, estómago, renal, uréter, biliar, intestino delgado), uno de los cuales es un pariente de primer grado de los otros dos.
- Están afectados por lo menos dos generaciones sucesivas.
- El cáncer colorrectal ha sido detectado antes de la edad de 50 en uno de los parientes.

Tal vez el CCR sea el cáncer humano con mayor componente familiar. La proporción estimada de cánceres colorrectales que es atribuible a causas hereditarias varía de entre un 5% y un 30%. Los síndromes heredados con defectos genéticos conocidos son responsables de un 1–5% de todos los CCR. Entre el 10% y el 30% de los pacientes con CCR tienen antecedentes familiares de CCR pero no pertenecen a un síndrome hereditario conocido. El acúmulo de casos familiares es frecuente, y aparentemente implica un mayor riesgo. Los parientes de primer grado de las personas con CCR tienen el doble o triple de riesgo de CCR que la población normal. Además, este riesgo aumenta con la cantidad de parientes con CCR, cuanto más cercanos sean los parientes al paciente y con la edad de presentación del CCR en los miembros de la familia. Los individuos con antecedentes personales de cáncer colorrectal también tienen un mayor riesgo de presentar cáncer posteriormente. Por lo tanto, el riesgo de CCR aumenta en las personas con antecedentes familiares de CCR no sindrómico y en aquellos con antecedentes de adenomas en parientes cercanos menores de 60 años. (Tabla 2).

Otros síndromes familiares menos comunes son:

- Poliposis juvenil (5).
- Síndrome de Peutz–Jeghers (6).
- Síndrome de Cowden (7).

De todas formas, en la mayoría de los casos de CCR no existe un claro patrón familiar (figura 2) y las alteraciones genéticas se producen de manera puntual en una o varias células del colon. Por ejemplo, mutaciones del oncogén K-ras poseen una alta actividad oncogénica (8) así como la alteración del oncogén p-53 situado en el cromosoma 17p facilita la acumulación de múltiples alteraciones genéticas en las células tumorales, lo cual propicia el paso de adenoma tipo 3 a carcinoma.

Tabla 2. RR, riesgo relativo; IC, intervalos de confianza. (*Adaptado de:* Burt RW (Gastroenterol Clin North Am 1996;25:793–803) and Johns LE, Houlsan RS (Am J Gastroenterol 2001;96:2992–3003).

Situación familiar	RR	IC 95%
Un pariente de primer grado con CCR	2.25	2.00 a 2.53
< 45 a	3.87	2.40 a 6.22
45–59 a	2.25	1.85 a 2.72
> 59 a	1.82	1.47 a 2.25
Dos o más parientes de primer grado con CCR	4.25	3.01 a 6.02
Solo dos parientes de primer grado	3.76	2.56 a 5.51
Un pariente de segundo o tercer grado con CCR	1.50	
Dos parientes de segundo grado con CCR	2.30	
Un pariente de primer grado con un adenoma < 60 a	1.99	1.55 a 2.55

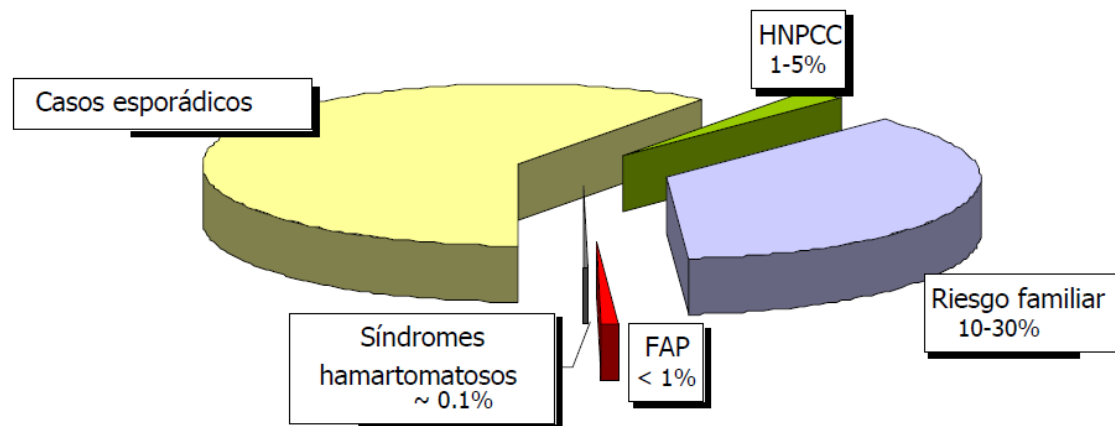


Figura 2. Factores de riesgo familiar y cáncer colorrectal (2).

Por otra parte, ciertos factores no genéticos aumentan aparentemente el riesgo de desarrollar esta enfermedad:

- Pólipos adenomatosos. Las personas que han tenido adenomas son más propensas a tener pólipos nuevamente y a sufrir cáncer de colon (9).
- La edad. El 93% de los casos diagnosticados pertenecen a personas mayores de 50 años, siendo la mitad de ellos mayores de 70 años (10).
- Enfermedad Inflamatoria Intestinal. En general, los procesos inflamatorios del intestino grueso aumentan la incidencia de cáncer de colon (11, 12).
- Inactividad física y obesidad. Aunque el mecanismo no es conocido, un estilo de vida sedentario y el sobrepeso se asocian a una mayor incidencia de cáncer colorrectal (13, 14).
- Productos pirróricos. Se generan al someter la carne a altas temperaturas, existiendo estudios que asocian el cáncer de colon al consumo de carne, sobre todo frita o asada en exceso (15-18).
- Vitaminas A, C, D y E. Las dietas ricas en estas vitaminas disminuyen el riesgo de desarrollar cáncer de colon (14; 19-21).
- Fibra y grasa de la dieta. Numerosos estudios epidemiológicos sugieren que la dieta rica en fibra y baja en grasa ejerce un papel protector en el desarrollo del cáncer de colon aunque el mecanismo sigue sin conocerse (14; 18; 22-25).

- Tabaco y alcohol. La ingesta de alcohol y el consumo de tabaco se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollo de adenomas y cáncer de colon (13; 26, 27).

1.2. Epidemiología

En la base de datos Globocan 2002 de la Agencia Internacional para Investigación sobre Cáncer (IARC), se estima que la incidencia mundial anual de cáncer colorrectal es 550.000 nuevos casos y 278.000 muertes para los hombres, y 473.000 nuevos casos y 255.000 muertes para las mujeres. En 2002, el cáncer colorrectal comprendía un 9.4% del cáncer mundial en ambos sexos, siendo la incidencia más alta en América del Norte, Australia, Nueva Zelanda, y partes de Europa. Esto llevó a que se considerara al cáncer colorrectal como una enfermedad del estilo de vida occidental.

Las tasas de mortalidad por cáncer colorrectal normalizadas por edad en hombres y mujeres en los países occidentales se mantuvieron estables durante todo el siglo XX, y tal vez ahora hayan comenzado a disminuir. En cambio, se están observando rápidos cambios en países considerados de bajo riesgo anteriormente (2).

En Europa, las tasas de mortalidad normalizadas por edad han aumentado en la zona del este y meridional, mientras que se han estabilizado en la mayoría de los países del norte y centro. En los últimos años, las tendencias de mortalidad se muestran sistemáticamente más favorables para las mujeres que para los hombres.

En EEUU los registros de Vigilancia Epidemiológica y Resultados Finales (28) sugieren que entre 1973 y 1989, la incidencia de cáncer de colon normalizada por edad en hombres se elevó un 11% en los caucásicos y un 39% en afroamericanos, mientras que la incidencia de cáncer rectal cayó un 5% en los caucásicos y se elevó un 27% en los afroamericanos. En las mujeres, la incidencia del cáncer de colon bajó un 3% en caucásicas y aumentó un 26% en las afroamericanas, mientras que las tasas de cáncer rectal cayeron un 7% y un 10%, respectivamente. Desde 1990, la incidencia de cáncer de colon (normalizada por edad) ha disminuido progresivamente. La práctica de prevención mediante polipectomía puede haber incidido en esto.

En Japón, las tasas de mortalidad normalizadas por edad para cáncer colorrectal eran bajas a mediados del siglo XX, pero aumentaron (multiplicándose aproximadamente por tres) en ambos sexos en el período 1955–84 (2).

En la figura 3 se muestra la incidencia de los distintos tipos de cáncer para hombres y mujeres en España (2).

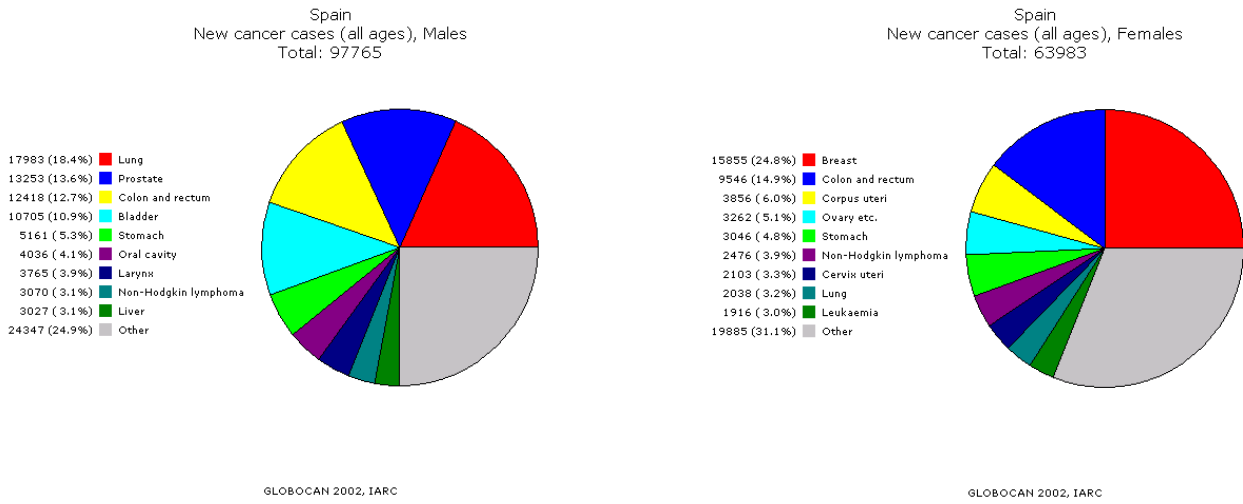


Figura 3. Representación gráfica de los nuevos casos de cáncer para los hombres y mujeres en España (Globocan 2002).

2.- CIRUGÍA Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Toda cirugía implica la producción de heridas que posteriormente habrán de cicatrizar. En el caso que nos ocupa (cirugía de las metástasis hepáticas del cáncer colorrectal) hay que añadir a éstas una pérdida de parénquima hepático que el organismo habrá de reponer. Por lo tanto, las resecciones hepáticas por metástasis dan lugar a la puesta en marcha de dos procesos biológicos de gran complejidad: la cicatrización y la regeneración hepática. Revisaremos a continuación los aspectos más relevantes para nuestro trabajo de ambos procesos.

2.1. Cicatrización de las heridas.

La aparición de una herida en cualquiera de sus formas altera el medio interno tisular condicionando la aparición de distintas respuestas biológicas, como la hemorragia, la vasoconstricción, la coagulación, la activación del sistema del complemento y otras respuestas inflamatorias (29). Esta compleja cascada de acontecimientos biológicos origina la formación de tejido reparador. Este crecerá desde los bordes de la lesión para unirlos y ocupar el espacio de la incisión, restableciendo la continuidad tisular.

Por tanto, podemos definir a la cicatrización como un proceso dinámico e interactivo que comienza en el momento de producirse la herida implicando a distintos tipos celulares, a la matriz extracelular y a gran número de mediadores bioquímicos y moléculas mensajeras (hormonas de la herida). Estos mecanismos biológicos son tanto más copiosos cuanto mayor sea la extensión del daño traumático. Ello justifica que cuando el mismo es amplio (gran quemado, traumatismos extensos múltiples) aquéllos puedan difundirse de manera profusa y establecer respuestas generales importantes (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica) (30).

En sentido estricto, la cicatriz resultante no constituye una auténtica regeneración pues siempre es de naturaleza conjuntiva y menos resistente que el tejido en el que se implanta. Dentro de los tejidos sólidos sólo poseen auténtica capacidad de regeneración las células epiteliales y los hepatocitos, por lo que en las heridas que afectan a los epitelios (piel y mucosas) a la cicatrización se suma una regeneración epitelial o epitelización, existiendo relaciones mutuas entre los fenómenos celulares que intervienen en ambos procesos (31,32). La cicatrización no debe ser considerada como un término genérico, único, sino más bien como una serie de procesos perfectamente regulados e interrelacionados. Estos procesos, que incluyen la coagulación, la inflamación, el depósito y diferenciación de la matriz extracelular, la angiogénesis, la fibroplasia, la epitelización, la contracción y la remodelación, comienzan en el momento de producirse la herida y duran durante todo el proceso (33-44).

Así pues, la respuesta normal a una lesión tisular es un proceso de reparación ordenado en el tiempo que resulta en una recuperación de la integridad anatómica y funcional. Esta respuesta precisa una compleja integración de procesos interactivos en la que son primordiales las relaciones célula-célula y célula-matriz extracelular, mediadas por mensajeros humorales y moléculas de adhesión. Estos procesos deben seguir una secuencia temporal estricta, de manera que cada uno tiene su cronología, aunque habitualmente se superponen. Dependiendo de las características de la herida cada uno de dichos procesos tendrá mayor o menor protagonismo. En la mayoría de los casos el resultado final será la curación, esto es, una óptima cicatrización, pero en ocasiones se producen problemas que alteran el proceso reparador y, por tanto, el resultado da lugar a situaciones patológicas (44).

Como ya hemos mencionado con anterioridad la cicatrización es el resultado de una serie de procesos interrelacionados que incluyen la coagulación, la inflamación, el depósito y la diferenciación de la matriz extracelular, la angiogénesis, la fibroplasia, la epitelización, la contracción y la remodelación. Tradicionalmente este conjunto de procesos se ha dividido de modo esquemático en tres fases:

- Fase catabólica, de inflamación postraumática, destructiva o desasimilativa. Su inicio lo marca el instante en que se produce la herida y sus objetivos básicos son el conseguir una hemostasia adecuada y crear una barrera inmune que evite la penetración de gérmenes. Por este motivo también es denominada etapa de hemostasia-inflamación.
- Fase anabólica, de reparación o asimilativa: fundamentalmente encaminada a conseguir una adecuada reparación tisular mediante la creación de nuevo tejido.
- Etapa de remodelado: encaminada a dotar de funcionalidad al tejido cicatricial formado con anterioridad.

Esta visión básica del proceso de cicatrización no supone que dichas etapas se encuentren realmente definidas sino que en su desarrollo, a pesar de tener un comienzo cronológicamente distinto, se encuentran además de superpuestas claramente interrelacionadas. De hecho, existe una dependencia total entre ellas para conseguir un resultado óptimo, lo que requiere de una regulación exquisita de las mismas para conseguir el objetivo final (44).

2.1.1. Fase inicial

Recientes estudios moleculares y biocelulares han puesto de manifiesto que los procesos reparadores de nuestro organismo comienzan en el preciso instante en que se produce la lesión tisular, intentando minimizar las consecuencias que se generan de dicha agresión e intentando poner en marcha los mecanismos específicos de reparación tisular. En condiciones normales, dura por término medio una semana y posee los rasgos biológicos comunes a cualquier reacción inflamatoria (31; 44).

La respuesta inicial ante cualquier herida es intentar reducir o frenar la hemorragia que casi inevitablemente la acompaña. Así, se produce una vasoconstricción refleja que, de manera temporal, reducirá las pérdidas hemáticas. Sin embargo, este mecanismo, dependiente del músculo liso vascular, se agota en unos pocos minutos. Para asegurar una hemostasia verdadera es necesaria la formación de un coágulo insoluble de fibrina. Con este objetivo se produce una agregación plaquetaria junto con la activación del sistema de la coagulación por el colágeno y las proteínas de las membranas basales expuestas tras la lesión (37; 45).

Las plaquetas activadas que se encuentran formando parte del coágulo se encargan de ampliar la respuesta inflamatoria que sigue a este momento, mediante la liberación de mediadores. Pero también liberan factores de crecimiento tisular como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet-derived growth factor: PDGF), el factor de crecimiento y transformación alfa y beta (transforming growth factor: TGF- α y TGF- β) y el péptido activador de los neutrófilos 2 (neutrophil activating peptide-2). Estas moléculas son potentes factores de crecimiento y agentes quimiotácticos para diferentes tipos celulares: leucocitos, monocitos, células endoteliales, fibroblastos y queratinocitos. De esta manera podemos afirmar que la coagulación y la agregación y degranulación plaquetaria son fenómenos críticos para el normal desarrollo del proceso de reparación tisular.

Una vez que la hemorragia ha sido controlada, la vasodilatación (aumentando el flujo sanguíneo local) y el aumento en la permeabilidad de los vasos adyacentes a la lesión facilita la migración de células inflamatorias hacia la herida. Estos fenómenos son mediados por la histamina, la PGE₂, la PGI₂ y el VEGF. Todas estas sustancias vasodilatadoras son liberadas por las células cebadas y por las células endoteliales previamente dañadas. En este momento, la herida se encuentra repleta de detritos derivados de la lesión inicial. Este material consiste en una mezcla de tejido lesionado y desvitalizado (grasa, músculo, epitelio), coágulo (plaquetas, fibrina, fibrinógeno, eritrocitos), bacterias (provenientes de la piel y del medio externo), proteínas plasmáticas extravasadas (glicoproteínas y mucopolisacáridos) y todo aquel material extraño incluido en el momento de producirse la agresión. Durante las próximas horas o días (dependiendo de la cantidad de material a desbridar) la herida será limpiada de bacterias, tejido desvitalizado y cuerpos extraños por las células reclutadas hacia el foco inflamatorio (46).

En la fase inflamatoria inicial los neutrófilos o polimorfonucleares (PMN) son la población celular predominante que llega a la herida. Ya se observa un aumento en la concentración de estas células casi inmediatamente después de producirse la lesión, alcanzando su pico máximo a las 48 horas. Para que los PMN alcancen el foco de la herida y desarrollen sus funciones deben haber tenido lugar diferentes procesos biológicos: adhesión de los PMN al endotelio, quimiotaxis y migración al foco inflamatorio y, finalmente, activación de

los mismos. En la actualidad conocemos que la extravasación de leucocitos circulantes es crucial para el desarrollo de las reacciones inflamatorias. En este sentido las células endoteliales y los leucocitos interactúan activándose y mostrando en superficie receptores para moléculas de adhesión a través de las cuales se llevará a cabo dicha interacción. Dentro de estas moléculas de adhesión se distinguen tres grandes familias: la familia de las supergeninmunoglobulinas, las selectinas y las integrinas. Si bien todas estas moléculas parecen tomar parte en estos procesos de interacción célula-célula, la integrina β_2 en la membrana leucocitaria y la inmunoglobulina ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) en la superficie endotelial son las moléculas que parecen gozar de mayor protagonismo. Una vez extravasados, los leucocitos deben acudir al foco de la lesión donde se activarán para desarrollar sus funciones. Además de las moléculas que ya hemos citado con anterioridad, se han identificado un grupo de moléculas proteicas de bajo peso molecular y con residuos de aminoácidos ricos en cisteína, denominadas quimiocinas C-X-C, que controlan la quimiotaxis y activación de los PMN. Entre ellas podemos citar la interleucina 8 (IL-8), las moléculas derivadas de la proteína plaquetaria básica (como el NAP-2), y la proteína activadora de neutrófilos de origen epitelial (ENA-78). Las funciones fundamentales de los PMN son la fagocitosis de microorganismos y la liberación de sustancias quimiotácticas (interferón alfa, TNF, IL-1, IL-6, IL-8, TGF- β , GM-CSF) capaces de propagar la respuesta inflamatoria. Sin embargo, en diferentes modelos experimentales se ha objetivado que no son imprescindibles para la cicatrización (sobre todo en ausencia de bacterias) e incluso que la inhibición de los PMN, en estudios sobre quemaduras, previene la aparición de algunas complicaciones como la necrosis progresiva. Por tanto, parece que existe un cierto equilibrio entre el beneficio y el perjuicio que producen en la herida y que cantidades excesivas de PMN dentro de ella pueden mostrarse perjudiciales.

La segunda ola de elementos celulares que llegan a la herida son los monocitos circulantes que terminan diferenciándose hacia macrófagos tisulares cuando alcanzan dicha herida. Generalmente comienzan a aparecer transcurridas 24 horas y persisten más allá de una semana. Estos macrófagos tienen capacidad para proliferar y, al igual que los PMN, capacidad fagocitaria, completando el proceso de destruir todo el material no necesario para las siguientes etapas de la cicatrización. Sin embargo, su función no se limita a la fagocitosis. Los macrófagos son la fuente de más de 30 tipos diferentes de citocinas, moléculas fundamentales para el proceso de la inflamación y de la reparación tisular. Diferentes estudios han puesto de manifiesto el papel preponderante de los macrófagos en la fase inflamatoria: su ausencia impide un correcto desarrollo del proceso reparador.

Los linfocitos también aparecen en las heridas en pequeño número durante la fase inflamatoria. Su papel en el proceso de reparación tisular parece centrarse en el control y regulación del resto de elementos celulares (31; 44).

2.1.2. Citocinas y cicatrización

Las citocinas son moléculas peptídicas solubles con capacidad para iniciar y propagar la respuesta inflamatoria. Estas moléculas deberían ser consideradas como los segundos mensajeros en el proceso de cicatrización de las heridas y algunos autores también las consideran como las hormonas de las heridas, dado que primero son sintetizadas y luego liberadas, pudiendo ejercer su efecto tanto en un modo autocrino como paracrino o en células distantes del sitio de secreción. Las citocinas juegan un papel primordial en la regulación de la respuesta inmune, en la biología tumoral, en el crecimiento y diferenciación celular y en la reparación tisular. En los últimos años se han sintetizado numerosas moléculas que cumplen esta definición, si bien haremos referencia a aquellas con más relevancia en el proceso de reparación tisular: las citocinas responsables de la respuesta precoz (interleucina 1, interleucina 6 y factor de necrosis tumoral), los diferentes factores de crecimiento (growth factors) y algunas moléculas de la familia de las quimiocinas C-X-C. Como células productoras de citocinas se han identificado todos los elementos celulares participantes en la cicatrización: plaquetas, neutrófilos, queratinocitos, células endoteliales, linfocitos y, sobremanera, macrófagos.

En las fases iniciales del proceso reparador, el TNF y la IL-1, junto con la IL-6 inician y amplifican la cascada de acontecimientos conducentes a la inflamación. Tanto el TNF como la IL-1 alcanzan sus concentraciones máximas a las 24 horas de producida la lesión, aunque sus efectos siguen siendo evidentes en fases más tardías del proceso reparador (fibroplasia, epitelización y remodelado). La producción de estas citocinas en diferentes sitios y la cuantía de dicha síntesis parece depender de la proximidad de la lesión así como de la magnitud de la misma. De esta manera, durante el proceso de reparación tisular, estas moléculas juegan un papel esencial no sólo en la fase de inflamación sino también regulando la proliferación vascular, la actividad fibroblástica y la síntesis de colágeno (34; 44; 47).

2.1.3. Fase proliferativa

La fase proliferativa de la reparación tisular comienza con la llegada de los fibroblastos a la herida en torno al segundo o tercer día después de la lesión solapándose con la respuesta inflamatoria que aún persiste (44).

Se caracteriza por la creación del tejido cicatricial, basada en dos aspectos fundamentales muy relacionados entre sí: la angiogénesis o proliferación vascular y la fibroplasia por crecimiento fibroblástico con síntesis de colágeno, proteoglicanos y otros constituyentes de la matriz extracelular (fibronectina).

Angiogénesis

Para el correcto desarrollo del proceso reparador es necesaria la existencia de un aporte inmediato de grandes cantidades de nutrientes indispensables para la subsistencia

celular y sus funciones de síntesis. Inicialmente no existe un aporte vascular hacia la herida y la existencia de un tejido viable se limita a los bordes de la herida donde el contacto con tejido no lesionado permite la existencia de una nutrición por difusión. Este mecanismo se muestra insuficiente y se hace necesaria la presencia de vasos dentro del tejido de reparación. Esta formación de nuevos vasos sanguíneos dentro del tejido de granulación se denomina neoangiogénesis y tiene lugar desde los vasos intactos que se encuentran en el tejido no lesionado de los bordes de la herida. Esta proliferación vascular se desarrolla a modo de arborización cerrada, esto es, sin producción de hemorragia. La formación de yemas vasculares va avanzando en el foco de la lesión hasta enlazar con los capilares del borde opuesto. Su penetración se ve facilitada por la proteólisis y despolimerización del tejido conectivo, en parte llevada a cabo por las propias células endoteliales. Inicialmente, se configuran cordones macizos que posteriormente sufrirán un proceso de tunelización para alcanzar su configuración típica.

Tanto la proliferación endotelial como la orientación de dicho desarrollo vascular son controladas por diferentes citocinas que se encuentran perfectamente reguladas. La existencia de un equilibrio entre factores angiogénicos y angioestáticos permite el correcto desarrollo del proceso. Dentro de estos factores, la IL-8 es considerada un potente factor angiogénico, al igual que el TNF, el VEGF y el bFGF. En el polo opuesto se encuentra el PF-4 (perteneciente a la familia de las quimiocinas C-X-C, donde se han objetivado efectos dispares sobre la angiogénesis) y la trombospondina-1. La presencia de macrófagos y diferentes gradientes de oxígeno en el foco de la herida también se han mostrado necesarios para el correcto desarrollo de este proceso (31; 36; 43).

Fibroplasia

Inicialmente el número de fibroblastos dentro de la herida aumenta debido a la migración de los mismos desde los tejidos cercanos, aparentemente originados en las células mesenquimatosas primitivas de las adventicias vasculares (células madre adultas). Esta migración tiene su inicio hacia el segundo día guiándose por la matriz provisional de fibrina y fibronectina creada tras la formación del coágulo. Paulatinamente se convierten en la población dominante del tejido de reparación. Para alcanzar esta proporción es necesaria que se produzca una proliferación celular, logrando la máxima densidad fibroblástica en torno a la una o dos semanas.

Tanto la migración como la proliferación fibroblástica se encuentran reguladas por factores de crecimiento tisular. Inicialmente, estos factores son de origen macrófágico de modo mayoritario (TGF α , TGF β , bFGF). A medida que la reparación tisular avanza y disminuye la densidad de macrófagos, los factores de crecimiento comienzan a ser sintetizados por otras células: los propios fibroblastos (bFGF, TGF β , PDGF, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF)), células endoteliales (factor de crecimiento de

endotelio vascular (VEGF), PDGF, bFGF) y queratinocitos ($TGF\alpha$, $TGF\beta$, KGF). Estos factores de crecimiento son los encargados de mantener la proliferación celular, pero también estimulan la producción de matriz extracelular, glucoproteínas y la angiogénesis.

La contracción de la herida es un fenómeno importante que sucede en las heridas abiertas, acercando los bordes de la herida y reduciendo su tamaño. Aunque su importancia biológica es clara, no guarda relación con el tema que nos ocupa, por lo que lo dejamos simplemente citado (31; 42; 44).

2.1.4. Fase de remodelado

A medida que transcurre el tiempo y el tejido de reparación va logrando sus objetivos (hemostasia, recuperación del mecanismo de barrera, relleno del defecto tisular, creación de una matriz extracelular competente...) se comienzan a producir cambios en su composición y organización encaminados a dotar de funcionalidad al tejido cicatricial existente. Estos cambios no tienen un inicio concreto, son progresivos y se mantienen en el tiempo durante semanas o meses.

Dentro de la herida el colágeno va reorganizándose estructuralmente (formación de haces gruesos de fibras de colágeno) además de reorientarse espacialmente según las fuerzas de tensión que inciden sobre la herida. La acumulación de colágeno alcanza su máximo entorno a las dos tres semanas, de modo que a partir de ese momento, aunque exista una elevada tasa de síntesis y degradación de colágeno, su concentración no aumentará. La lisis de aquellas moléculas inmaduras o funcionalmente deficientes es realizada por un grupo de metaloenzimas, entre las que destacan las colagenasas y las estromalinas. Su regulación es objeto de continuas actualizaciones, dado su elevado potencial terapéutico. Hoy podemos afirmar que algunas citocinas como la IL-6, la IL-1 y el TNF favorecen el remodelado tisular estimulando la síntesis y función de estas enzimas o frenando la síntesis de sus inhibidores. Por el contrario, el $TGF\beta$ estimula la síntesis de inhibidores de estas metaloproteasas. Nuevamente, la existencia de un equilibrio entre estas sustancias permitirá alcanzar o no un resultado óptimo en el proceso de reparación tisular (31, 32).

Desde un punto de vista celular, paulatinamente disminuyen las poblaciones de macrófagos y fibroblastos. El cese de los estímulos proliferativos y los cambios en la composición de la matriz extracelular (disminución en la concentración de ácido hialurónico y agua) son los reguladores de estos cambios. Paralelamente, el tejido de cicatrización va perdiendo gran parte de su vascularización a medida que disminuyen los requerimientos metabólicos, lo que se traduce, desde un punto de vista macroscópico, en que la cicatriz va adquiriendo palidez (44).

2.2. Regeneración hepática.

Las células hepáticas maduras tienen una vida extremadamente larga, y, en los roedores, sobreviven al menos hasta la edad adulta del animal.

El hígado es capaz de distintas formas de crecimiento. Así, además del crecimiento debido al desarrollo normal del individuo, este órgano también crece como respuesta a demandas fisiológicas alteradas (tales como el embarazo, la lactancia o la hiperfagia): es el llamado crecimiento aditivo. Por último, el hígado también crece para compensar la pérdida de tejido hepático: es el crecimiento regenerativo o recuperador. Únicamente este crecimiento regenerativo va a ser objeto de análisis.

Este proceso de regeneración del hígado (aunque el crecimiento recupera el total de la masa hepática y no la forma, se utiliza el término “regeneración” para describirlo) es rápido, bien coordinado y en muchas maneras espectacular. La función hepática se mantiene con muy pocos cambios durante todo el proceso de regeneración, incluyendo todas las funciones de biosíntesis, vías de desintoxicación, etc.

La rápida capacidad de regeneración del hígado es una rara propiedad que continúa fascinando a los investigadores y que no es igualada por ningún otro órgano en los mamíferos (48). La regeneración hepática se ha venido estudiando con interés desde que en 1931 Higgins y Anderson describieron la técnica quirúrgica de la hepatectomía parcial (70%) en la rata (49). Desde entonces, y a pesar de los numerosos hallazgos realizados, siguen surgiendo nuevos interrogantes en torno a este proceso biológico.

El mecanismo de este proceso regenerativo sigue siendo poco conocido, pero parece que la respuesta inicial a la pérdida de sustancia es la hipertrofia de las células restantes, seguida de su hiperplasia.

El conocimiento del ciclo celular hepatocitario, tanto en su duración como en su mecanismo intrínseco, fue uno de los avances más importantes. A partir de aquí se comenzaron a desarrollar modelos experimentales en los que poder estudiar con fiabilidad este proceso (hepatectomías de distintas extensiones, fístula de Eck, isquemia, administración de agentes hepatotóxicos como los hidrocarburos clorados...) (50, 51), así como técnicas de cuantificación de la respuesta regenerativa (peso seco hepático, índice mitótico, incorporación de timidina tritiada, microespectrofotometría, citometría de flujo).

La aparición del trasplante hepático supuso un fuerte impulso en el interés de los investigadores por este campo, ya que el implante de lóbulos hepáticos (extraídos de familiares adultos, como alternativa del donante-cadáver en los pacientes pediátricos), así como la recuperación del parénquima hepático tras el insulto que supone el trasplante (isquemia,

presección, manipulación quirúrgica, agresión inmune), ponen de manifiesto la importancia del fenómeno regenerativo, como también lo hace la posibilidad de realizar grandes resecciones hepáticas.

En la actualidad, los trabajos que se realizan en el campo de la regeneración hepática se encaminan hacia dos objetivos: conocimiento de los mecanismos intrínsecos que regulan dicho proceso, y modulación farmacológica del mismo; todo ello dirigido a un mayor perfeccionamiento de las técnicas de extracción, preservación e implante hepático.

2.2.1. Regeneración hepatocitaria

El hígado, como cualquier otro tejido maduro, contiene poblaciones celulares con funciones especializadas que son expresadas óptimamente durante la quiescencia o descanso proliferativo. Sin estas condiciones, no podrían existir ni estabilidad fenotípica ni vida, tal como es entendida por todos. Consecuentemente, el estado de reposo (también denominado G0) es un estado crítico caracterizado por presentar una frecuencia mínima de hepatocitos en proliferación, indispensable para suplir los hepatocitos en proceso de envejecimiento y muerte.

El concepto de ciclo celular es útil para cuantificar los cambios cinéticos durante la multiplicación celular. La regeneración hepática, tras un estímulo hepatoproliferativo, como una hepatectomía del 70%, se lleva a cabo en distintos intervalos según las diferentes especies. En la rata, se inician una larga serie de fenómenos que comienzan casi inmediatamente, localizados de una manera dispersa a lo largo de los lóbulos residuales. Así, en la rata el pico máximo de regeneración se produce a las 24 horas (48; 52), mientras que en el ratón a las 48 horas (53). En el perro (54) y en el cerdo (55) tiene lugar a las 72 horas. En humanos, no está totalmente establecido, aunque los últimos trabajos de Starzl y cols. apuntan a un inicio del proceso regenerativo tras 24 horas y una lenta progresión durante tres semanas (56).

Globalmente, la frecuencia de mitosis se incrementa por 600 al final del proceso regenerativo, pero este estado se alcanza de un modo progresivo: primero, la célula entra desde el estado G₀ en la fase prerreplicativa. Este periodo, denominado en su fase inicial «onset time» (St) (57, 58) y posteriormente G₁, dura entre 12 y 16 horas. Cuando finaliza, los hepatocitos sintetizan DNA semiconservadoramente (fase S). Los trabajos realizados sobre los % de hepatocitos que entran en esta fase han llegado a la conclusión de que no es un valor fijo y depende de la edad del animal y del tipo e intensidad del estímulo proliferativo (59). Sin embargo, el tiempo invertido en la replicación del DNA se mantiene constante (aproximadamente 8 h.), independiente de la naturaleza del estímulo y de su intensidad (60,61). Una vez concluída la fase S, se necesitan entre 4 y 6 horas para preparar la división celular (fase G₂). En este momento, el hepatocito puede iniciar el proceso mitótico (fase M) y tras 30-60 min. se forman dos núcleos a partir de uno. Si a esto se sigue una división citoplasmática se obtendrán dos hepatocitos. Sin embargo, el hepatocito tiene la posibilidad de

no realizar dicha división nuclear, con el consiguiente aumento en el nivel de ploidía, o de no realizar la división citoplasmática, obteniéndose un hepatocito binucleado (62).

En el hígado regenerante (rata) la mayoría de los hepatocitos proliferan al menos una vez dentro de las 24-35 h. posteriores al estímulo regenerativo. Las células no parenquimales, aunque también proliferan, lo hacen más tardíamente (63).

Si los hepatocitos proliferan de una manera continua, las células progenitoras entran en otro intervalo temporal (G1), entre la fase M y la siguiente fase S, manteniendo el nivel regenerativo y produciendo un aumento en el nivel de ploidía de los hepatocitos. Así, algunos hepatocitos entran en segundas y terceras rondas de proliferación. Bajo estas condiciones, la fase G1 hepatocitaria dura entre 6 y 8 horas, duración notablemente menor que la de la primera fase prerreplicativa (64).

Cuando se produce una proliferación crónica, la capacidad funcional de los hepatocitos se reduce. Si esta proliferación cesa, las funciones que se encontraban disminuidas son restauradas, aunque con distinta rapidez unas de otras. Esto ocurre usualmente dentro de los 7 a 28 días después de practicada la hepatectomía del 70% en la rata. Si se produce una proliferación anormal, las funciones diferenciadas pueden ser permanentemente suprimidas o reducidas. Este fenómeno ha sido descrito con detalle en numerosos estudios de desarrollo, regeneración y carcinogénesis hepática (65-67).

La capacidad de regeneración hepática es un fenómeno que expresa la funcionalidad del órgano, siendo por ello susceptible de modificarse por la existencia de daños o agresiones externas, como sería la isquemia hepática. De este modo, Furuchi y cols. observaron disminución de la regeneración hepática al asociar a una hepatectomía una isquemia hepática manteniendo la congestión esplácnica (no se alteraba en los casos en que se evitaba la citada congestión) (68). Sin embargo, diversos autores han señalado una disminución de la respuesta regenerativa al asociar isquemia hepática sin congestión esplácnica a las hepatectomías (69-71). Respecto a estos hallazgos Portugal, en su Tesis doctoral, teoriza que la isquemia hepática da lugar a lesiones intracelulares que producen una redirección de la maquinaria enzimática del hepatocito, otorgando prioridad a las funciones vitales y dejando en un segundo plano la respuesta al estímulo regenerativo. Otros autores establecen la hipótesis de que los RLO generados dañen los receptores de membrana de los factores de crecimiento y de este modo inhiben los pasos metabólicos de la regeneración hepática (70).

La respuesta a la hepatectomía parcial es muy homogénea y constante, pero sólo si se controlan rigurosamente las condiciones experimentales. Entre ellas se encuentran:

- La edad del animal, pues modifica considerablemente la cronología del proceso (72).

- Los niveles hormonales: la hipofisectomía, la resección del tiroides y las paratiroides, así como la administración de corticoides deprimen significativamente la respuesta regenerativa (73-75). Por su parte, las hormonas sexuales modifican en diferente grado dicha respuesta (76).
- Diversas experiencias realizadas, como la administración de hormona del crecimiento o el stress quirúrgico han producido modificaciones en el ritmo regenerativo (77).
- Igualmente, el ayuno de 24 horas disminuye también el proceso regenerativo (78).
- El patrón básico de regeneración también sufre modificaciones en función de factores ambientales, fundamentalmente las variaciones producidas por los ritmos nictamerales (79), donde no sólo influyen los diferentes niveles hormonales, sino también los hábitos de alimentación y actividad. Por todo ello es importante mantener constante el momento del día en que se realiza la experiencia quirúrgica (altura máxima del pico de síntesis de DNA a las 10 a.m. y mínima a las 10 p.m.) (80).

Para una adecuada repuesta regenerativa se precisa de un órgano funcionalmente adecuado siendo por ello la regeneración más limitada en un hígado cirrótico que en uno sano. La recuperación más o menos rápida del funcionalismo completo del órgano por medio de la regeneración va a depender también del porcentaje de hígado resecado.

Durante la década de los setenta fueron muy aceptadas las hipótesis hemodinámicas y humorales en torno al control e inicio de la regeneración hepática. Así, algunos autores postularon el papel primordial de la sangre portal en el desencadenamiento de la respuesta regenerativa (81, 82). La deprivación del flujo portal conduce a la anulación de la regeneración hepática (83), mientras que la inversión del flujo (aferencia portal a través de suprahepáticas y drenaje portal a la cava) traslada la zona de máxima actividad de síntesis a la región centrolobulillar (84). Sin embargo, hoy día se acepta que los aspectos hemodinámicos son requisitos necesarios (como vehículos de oxígeno y de otras sustancias), pero no pueden considerarse estrictamente un factor de control.

El otro grupo de hipótesis se encuadra dentro del concepto de «factores humorales», y surgió de considerar que no era el flujo sanguíneo portal, en cuanto tal aporte de sangre, el «factor hepatotrófico», sino que dicha cualidad debía residir en determinadas sustancias que llegaban al hígado vehiculizadas por la sangre procedentes de los órganos que drenan al sistema porta. Las mediciones de niveles plasmáticos de insulina y glucagón en sangre portal y en sangre venosa suprahepática, permitieron objetivar diferencias en los niveles plasmáticos de insulina y glucagón durante la regeneración hepática, así como en la proporción existente entre ambas hormonas (85). Estos hallazgos llevaron a considerar que las variaciones en la concentración sanguínea de insulina y glucagón serían la señal responsable del inicio de la regeneración hepática (86). Sin embargo, estudios posteriores sobre cultivos de hepatocitos han demostrado que, si bien dichos cambios son condición «sine qua non» para el inicio de la

regeneración (87), el factor iniciador propiamente dicho habría que buscarlo en otras sustancias como el epidermal growth factor (EGF) (88, 89) o los insulin like growth factors (ILGF) (90-92). La hipertrofia de los islotes de Langerhans que puede observarse durante la regeneración hepática apoya la idea de una íntima relación entre insulina/glucagon y reduplicación hepatocitaria (93).

2.2.2. Otras estirpes celulares del hígado

La hepatectomía parcial rápidamente origina muchos cambios en todas las poblaciones celulares del hígado: hepatocitos, células sinusoidales endoteliales, células del epitelio biliar y células estrelladas. Estas últimas son un tipo celular altamente especializado y localizado entre las células endoteliales y los hepatocitos cuyo papel ha pasado desapercibido durante mucho tiempo (94). Las células estrelladas llevan a cabo numerosos procesos importantes para los hepatocitos (sintetizan proteínas para la matriz extracelular, almacenan vitamina A, producen factores de crecimiento,...) y tienen un patrón de expresión de genes muy similar al de los astrocitos del cerebro.

Los hepatocitos son las primeras células del hígado en comenzar la duplicación de su ADN tras producirse la resección quirúrgica de una parte del órgano. La primera "oleada" suele estar bastante sincronizada, de tal manera que se produce un claro pico de síntesis de ADN cuyo momento de aparición depende del porcentaje de hígado perdido y de la especie animal. Así, en la rata, y tras una resección del 70%, el primer pico de síntesis de ADN se produce a las 24 horas; en cambio, tras una resección del 40%, el pico se retrasa hasta las 40 horas. Si miramos el ratón, tras una hepatectomía del 70%, el primer pico de síntesis se produce a las 36 horas. En cambio, en el ser humano, el momento de ese primer pico es más variable, ya que se ve afectado por variables que no existen en los animales de experimentación, como el estado nutricional, otras enfermedades de base, etc. (95).

Cabe destacar en este punto que la regeneración hepática está mediada por la participación de la mayoría de los hepatocitos del órgano, y que no depende de la proliferación de una sub-población celular específica, con características de células madre. Estudios detallados mediante la incorporación de timidina han demostrado que más del 90% de los hepatocitos participa en el proceso regenerativo (95).

La proliferación de los hepatocitos (figura 4) se inicia en zona portal del lobulillo hepático (hepatocitos periportales), para posteriormente avanzar a lo largo del eje hasta alcanzar a los hepatocitos localizados alrededor de las venas centrales (hepatocitos pericentrales); en la rata esto ocurre a las 48 h. (96). La proliferación del resto de las células del lóbulo hepático progresa a ritmos diferentes. Las células estrelladas y el epitelio biliar alcanzan un primer pico de proliferación a las 48 horas (en la rata); ya después el proceso proliferativo

transcurre muy lentamente. Por último, tras la hepatectomía parcial, las células endoteliales no empiezan a proliferar hasta completarse el tercer día, con un pico claro a los cinco días (97).

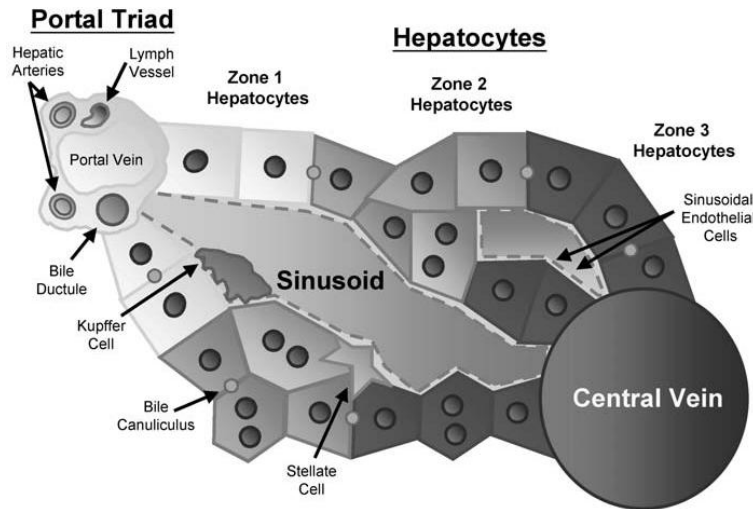


Figura 4. Diagrama resumen de los elementos celulares clave y su localización en la arquitectura histológica del lobulillo hepático (98).

El proceso de regeneración tiene como objetivo reemplazar el tejido perdido; por eso, la proliferación de los hepatocitos por sí sola resultaría insuficiente, ya que faltaría el resto de componentes normales del tejido hepático sano. Ahora bien, son los hepatocitos los primeros en responder; no sólo iniciando su duplicación, sino produciendo múltiples citoquinas reguladoras del crecimiento (figura 5) las cuales tienen conocidos efectos estimulatorios del crecimiento de las células adyacentes (99-101).

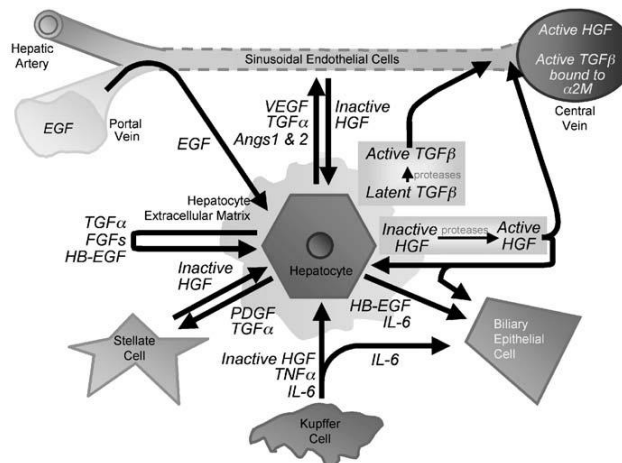


Figura 5. Interacción de redes de señalización de los factores de crecimiento y citoquinas producidas por los hepatocitos y otros elementos celulares del hígado durante la regeneración hepática (98).

2.2.3. Regulación del proceso

Actualmente son numerosos los «factores» a los que se atribuye la capacidad de inducir o potenciar la regeneración hepática. Se ha comprobado el papel positivo de la PGE₂ (102), de la pentagastrina (103) y de la famotidina (104). En cambio los bloqueantes alfa-adrenérgicos frenan la actividad regenerativa (105), mientras que la vagotomía hepática produce alteraciones en la coordinación y sincronía de la respuesta hepatocitaria a la hepatectomía (106).

Los factores de crecimiento producidos por los hepatocitos incluyen TGF α , VEGF, FGF1, FGF2, Angiopoyetinas 1 y 2, PDGF, HB-EGF, etc. Todos estos factores pueden estimular el crecimiento de las células del endotelio, las células estrelladas y el epitelio biliar. Alguno de ellos (por ejemplo, TGF α , FGF1, FGF2, HB-EGF) también pueden estimular el crecimiento de hepatocitos. La posibilidad de los efectos de la estimulación autocrina de los factores producidos por los hepatocitos sobre sí mismos, no ha sido firmemente establecida, pero la mayoría de los autores la acepta (98).

Los factores de crecimiento que afectan a los hepatocitos también son fabricados por las células estrelladas y endoteliales del hígado. El HGF es producido por las células estrelladas (107) y por las células endoteliales también (108). Evidencias recientes sugieren que el VEGF producido durante la replicación de los hepatocitos estimula a través del receptor del VEGFR-1 la producción HGF por parte de las células endoteliales (108). Las mismas redes de interacción actúan entre el HGF y el TGF α . La administración de HGF a hepatocitos en cultivo conlleva la producción de TGF α , un mitógeno para los hepatocitos, células endoteliales y células estrelladas (109).

La IL6, producida por las células de Kupffer y los hepatocitos, estimula la fase de síntesis y acelera la activación del factor de transcripción Stat-3 (110). La IL6 está involucrada en el “priming” de los hepatocitos a fin de sensibilizarlos al estímulo mitogénico de los factores de crecimiento. La IL6 es un mitógeno directo de las células del epitelio biliar (111).

Las células estrelladas también sintetizan TGF β 1. Esta citoquina, aunque resulta un mitoinhibidor de los hepatocitos en cultivo, no afecta a la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración. Estimula, sin embargo, la motogénesis hepatocitaria (como lo hace el HGF) y, más importante aún, es un regulador de la producción de matriz extracelular por respuesta celular.

Recientes evidencias con cultivos de órganos han demostrado que el HGF y el EGF (el cual llega en último lugar al hígado desde las glándulas del tracto gastrointestinal) estimulan la producción del TGF β 1 en células estrelladas (112, 113). La norepinefrina, sustancia involucrada en el aumento de los efectos mitógenos, también estimula la producción de HGF y

EGF nuevos a partir de los tejidos de origen. De manera significativa, se han descrito rutas similares en la mayoría de las células neoplásicas malignas. La evidencia de la regulación del crecimiento de tejidos normales, como el hígado, sugiere que los efectos de regulación paracrina del crecimiento de las células neoplásicas imitan las rutas seguidas en los tejidos normales de las que surgen las neoplasias.

La existencia de una cantidad tan importante de «reguladores» ha llevado a pensar a diferentes autores que estas sustancias probablemente no sean más que mediadores, debiendo de existir algún elemento coordinador de su actividad. Son numerosos los trabajos que aportan evidencias sobre la relación existente entre los elementos del sistema inmunitario y la regeneración hepática. Así, Bavaera y cols. hablan de un papel positivo por parte de los linfocitos T (114). Esta misma idea apuntan las experiencias de Yokomura y cols. (115) y Miyahara y cols. (116), que muestran la activación de linfocitos singénicos «in vitro» e «in vivo» por los hepatocitos en regeneración. Se ha llegado a comunicar que la hepatectomía provoca un predominio de los linfocitos T supresores (117), e incluso un estado de inmunosupresión (118-120). Son también numerosos los autores que han encontrado una relación entre los timocitos y la regeneración hepática (121, 122). En este mismo sentido, Ruhstroth-Bower localiza la producción de la hepatopoyetina en las placas de Peyer, estructura netamente imbricada en el sistema inmunitario (123). La Interleukina-6 (una citokina) ha sido reconocida por diversos autores como promotora de la regeneración hepática.(69; 124).

A favor de un papel regulador de la regeneración hepática por parte del sistema inmune, se encuentran los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo (125, 126). Según estos trabajos, la CsA induce la entrada de los hepatocitos en fase de síntesis y potencia la regeneración hepatocitaria subsiguiente a la hepatectomía parcial. Similares resultados han sido obtenidos posteriormente por otros grupos de trabajo (127-129).

Así mismo, hemos comprobado que la CsA potencia la regeneración hepática en la hepatectomía asociada a isquemia hepática (130).

Todos estos datos parecen apuntar hacia el sistema inmunitario como coordinador o modulador de las diversas sustancias reguladoras de la regeneración hepática (131).

2.3. Factores de Crecimiento y desarrollo tumoral.

Desde que Higgins et al. (49) demostrara hace más de medio siglo la capacidad del hígado para regenerarse tras hepatectomía parcial y para recuperar rápidamente su masa inicial, la resección hepática ha constituido una importante área de estudio experimental en cirugía.

El interés en este campo de investigación ha aumentado tras el reciente aislamiento de las sustancias responsables para la regeneración del hígado (132-136). Como se ha comentado en el apartado anterior, hay un factor específico de crecimiento de hepatocitos (HGF) pero también hay una serie de otros factores de crecimiento que también están involucrados en la regulación de la proliferación de hepatocitos, como es el caso del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) entre otros (98; 137, 138).

Si bien la cirugía puede ser considerada como una de las más efectivas terapias para el tratamiento de metástasis hepáticas, la recidiva de la enfermedad es un fenómeno común. La recidiva se produce cuando la micrometástasis residual presente en el hígado resecado comienza a crecer (139).

Existen por lo menos dos grandes procesos biológicos que intervienen en este desarrollo metastásico, los cuales dependen de la presencia de los factores de crecimiento, la proliferación celular y la angiogénesis. Gracias a la presencia en la superficie de la membrana plasmática de receptores específicos para los factores de crecimiento secretados por las células neoplásicas (Factores de crecimiento autocrinos) o por las células del órgano diana (Factores de crecimiento paracrinos), las células tumorales reciben la señal mitogénica que necesitan para la división y proliferación, dando así lugar a un aumento de la masa tumoral (140-142).

Sin embargo, esto no sería posible sin una adecuada red conjuntiva-vascular favoreciendo la acelerada proliferación. Este apoyo puede ser inducido por las células del tumor o por las células del órgano invadido, a través de la secreción de Factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y Factores de crecimiento de fibroblastos (FGFb) entre otros (143-145).

En esta comunicación de doble vía entre las células tumorales y las células hepáticas (146-148), los factores de crecimiento responsables de la regeneración hepática como el HGF, FGFb, EGF, VEGF etc. están involucrados (98; 135-137; 149-153).

Esto significa que los factores de crecimiento secretados durante la hepatectomía parcial no sólo promueven la proliferación hepatocitaria sino también el crecimiento de las células tumorales (154).

3.- RETINOIDES EN TERAPÉUTICA ONCOLÓGICA

El tratamiento estándar curativo en pacientes con metástasis hepáticas colorrectales es la resección del hígado o tratamiento local ablativo como la radiofrecuencia o citotablación. Gracias a estos tratamientos, la tasa de supervivencia a los 5 años siguientes a la resección hepática ha aumentado significativamente hasta un 58% (155) en comparación con el 0% al 5% para los pacientes que no pueden o no quieren someterse a cirugía (156).

En la última década se han ido desarrollando novedosas estrategias para facilitar una resección masiva en pacientes con metástasis hepáticas colorrectales (157), incluyendo la embolización venosa portal y la hepatectomía en dos etapas.

La mejora en las combinaciones del ácido 5-fluorouracilo/folínico con irinotecan (FOLFIRI) u oxaliplatino (FOLFOX) han aumentado progresivamente la respuesta tumoral a 73%, y la media de supervivencia de los pacientes no resecables se ha incrementado a 20 meses (158).

Los nuevos regímenes han permitido también que sea posible la resección de aquellas enfermedades que habrían sido antes no resecables (tabla 3). Esto ha dado lugar a que los pacientes tengan la misma supervivencia post-resección que aquellos pacientes con metástasis resecables inicialmente (159-161).

Tabla 3. Resultados quirúrgicos de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal (157)

Investigador	Año	Años incluidos en el estudio	Supervivencia a los 5 años (%)
Huges	1988	1948-1985	24
Sheele	1991	1960-1988	31
Sheele	1995	1960-1992	39
Fong	1999	1985-1998	37
Minagawa	2000	1980-1997	38
Choti	2002	1993-1999	58
Okano	2002	1992-1996	67.88
Abdalla	2004	1992-2002	58
Fernandez	2004	1992-2002	58
Pawlik	2005	1990-2004	58
Tanaka	2008	1990-2006	45.7

La adición de nuevos agentes biológicos, incluidos anticuerpos frente a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) como el cetuximab (159-162) y anticuerpos frente a los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como el bevacizumab (163), en combinación con los regímenes de fármacos parecen mostrar un mayor efecto sobre la media de supervivencia y la tasa de resección.

Sin embargo, no hay un consenso claro con respecto al uso de la quimioterapia preoperatoria para metástasis colorrectales resecables. Además, el beneficio de un enfoque neoadyuvante en esta situación es controvertido, especialmente considerando el riesgo del aumento de la morbilidad quirúrgica.

Otra línea de investigación consiste en el uso de retinoides en terapia contra el cáncer y quimioprevención.

El término de retinoides fue acuñado por primera vez en 1976 por Sporn (164), refiriéndose en términos generales a todo el conjunto de compuestos que incluye a los metabolitos y análogos de la vitamina A (Retinol) tanto de origen natural como sintético. Los retinoides son reguladores fisiológicos de un gran número de procesos biológicos esenciales como son el desarrollo embrionario, la visión, la reproducción, la formación ósea, el metabolismo, la hematopoyesis, la diferenciación, proliferación y apoptosis (165-172). Farmacológicamente han sido reconocidos como moduladores del crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Además, los retinoides se han mostrado eficaces en la supresión de la carcinogénesis en una amplia variedad de tipos de tejido como, por ejemplo, el cáncer oral, piel, vejiga, pulmón, próstata y mama en animales de experimentación (172, 173).

En clínica, son capaces de revertir las lesiones pre-malignas y de frenar el desarrollo de segundos tumores primarios en la zona de la cabeza y cuello y en pacientes con xeroderma pigmentosum (174, 175). Estos descubrimientos confirmaron que los retinoides pueden resultar útiles tanto en quimioterapia como en la quimio-prevención de cánceres humanos. De hecho, el ácido all-trans-retinoico (ATRA), un metabolito natural de la vitamina A, fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en el tratamiento de pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL).

No obstante, los estudios referidos a la utilización de retinoides en el tratamiento de metástasis hepáticas son escasos (176-178).

4.- Modelos experimentales para el estudio de metástasis hepáticas

Aunque existen muy diversos modelos para el estudio experimental de los procesos neoplásicos, la rata constituye sin lugar a dudas el principal reactivo biológico en investigación oncológica. Este hecho resulta todavía más sobresaliente si nos centramos en el estudio de las metástasis afincadas en el hígado. Así pues, antes de analizar en detalle los diferentes modelos de inducción de metástasis hepáticas en la rata, revisaremos someramente algunos aspectos sobre su anatomía y función.

4.1. Anatomía-fisiología del hígado de la rata

4.1.1. Estructura anatómica

El hígado de la rata es un órgano de consistencia blanda, rojo oscuro, en el que, siguiendo la descripción de Higgins y Anderson (49), se pueden distinguir cuatro lóbulos principales: el lóbulo mediano, el lóbulo lateral izquierdo (la suma de los cuales supone el 70% de la masa hepática de la rata), el lóbulo lateral derecho y el lóbulo caudado. El peso medio del hígado de la rata es de 3 gramos por cada 100 gramos de peso corporal (179).

El lóbulo mediano está hendido por una cisura longitudinal que lo divide en dos lóbulos centrales: derecho e izquierdo. El lóbulo central derecho está flanqueado por el lóbulo lateral derecho, que a su vez, se encuentra hendido transversalmente por una cisura que lo divide en dos lóbulos menores, de los cuales el más posterior contacta con el polo superior del riñón derecho (49).

El lóbulo lateral izquierdo es un lóbulo grande y sin cisuras que se sitúa inmediatamente detrás del lóbulo central izquierdo (49).

El lóbulo caudado está dividido por una cisura transversal en dos lóbulos menores que contactan con la curvatura menor del estómago y rodean la porción abdominal del esófago (179).

La cápsula conectiva reviste todo el órgano y se refleja (adhiriéndose a ellos) en los órganos y estructuras vecinas: diafragma (cúpula y pilares), estómago, esófago, riñón derecho y vena cava suprahepática.

4.1.2. Vascularización hepática

La característica fundamental de la circulación hepática radica en la existencia de dos sistemas aferentes: la arteria hepática, cuya función primordial es nutricia, y la vena porta, encargada de transportar y facilitar la exposición de nutrientes y toxinas a los hepatocitos y a

las células reticuloendoteliales, siendo la composición de su sangre consecuencia de la actividad gastrointestinal (180).

La vena porta recoge toda la sangre procedente de los órganos digestivos y comúnmente se forma por la unión de la vena mesentérica superior y la vena esplénica a nivel de la segunda vértebra lumbar, detrás del cuello del páncreas (181). A la altura del pedículo porta hepatis (aquel en el que confluyen la vena porta, la arteria hepática y el conducto hepático) la vena porta se divide en diferentes ramas para irrigar los lóbulos hepáticos, con una disposición tal que cada lóbulo tiene su propio pedículo vascular, que es doble en aquellos lóbulos que presentan cisura.

La vena porta presenta peculiaridades anatómicas con relevancia funcional (figuras 6 y 7):

- es un vaso avalvular, por lo que las elevaciones de presión serán transmitidas a todas sus ramas con facilidad.
- a nivel del ligamento hepatoduodenal se encuentra estrechamente relacionada con la arteria hepática y el conducto biliar común, configurando, como ya ha sido indicado, el denominado pedículo porta hepatis.
- existen numerosas anastomosis entre el sistema de la vena porta y los de las venas cava superior e inferior (habitualmente no funcionantes, pero que en situaciones de hipertensión portal dan lugar al desarrollo de la circulación colateral).

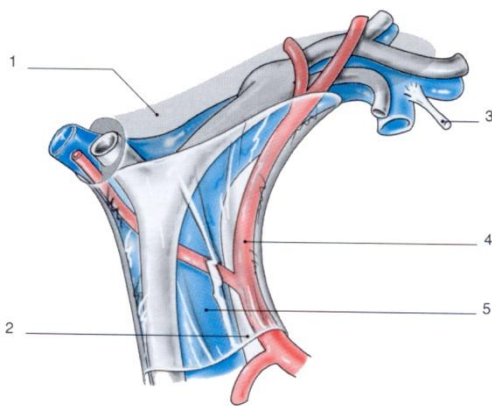


Figura 6. Esquema del ligamento hepatoduodenal (1 placa hiliar; 2 peritoneo del ligamento; 3 ligamento redondo; 4arteria hepática; 5 vena porta).

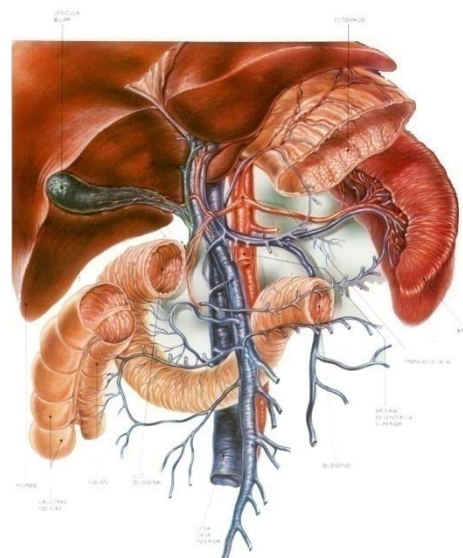


Figura 7. Circulación portal y hepática.

La arteria hepática nace del tronco celíaco y siguiendo un trayecto más o menos horizontal alcanza la parte posterior de la cabeza del páncreas, situándose a nivel del ligamento hepatoduodenal, medial respecto al conducto biliar común y anterior a la vena porta.

intraparenquimatosa. La red subserosa discurre por debajo de la cápsula de Glisson y se comunica, en el humano, con los linfáticos que rodean la vesícula. La linfa intraparenquimatosa se origina a nivel de los acinos en el espacio perivascular de Disse y se recoge alrededor de los vasos de la tríada portal, en el espacio de Mall localizado en la periferia de los lobulillos. Aquí se originan los vasos linfáticos profundos que discurren en la masa parenquimatosa junto con la arteria hepática y la vena porta en dirección al hilio hepático. Los linfáticos hiliares drenan en los ganglios que se encuentran en el ligamento hepatoduodenal, rodeando el conducto hepático, hacia los ganglios celiacos y la cisterna quilosa. Entre los vasos linfáticos superficiales y profundos existen abundantes comunicaciones. Existe una tercera red linfática que rodea las venas suprahepáticas y drena directamente en los ganglios que rodean la vena cava inferior (181).

4.1.3. Inervación del hígado

El hígado es inervado por fibras nerviosas aferentes simpáticas (que nacen en las fibras postganglionares de los ganglios celiacos) y parasimpáticas (que provienen del nervio vago derecho y de la rama hepática del vago izquierdo). En el hilio estas fibras forman los plexos hepáticos anterior y posterior. El plexo anterior rodea la arteria hepática y el posterior se localiza por detrás de la vena porta (181). Las fibras simpáticas y parasimpáticas siguen el trayecto de la arteria hepática y el conducto biliar al penetrar en el hígado y también cuando se ramifican en el interior del órgano (182).

La arteria está inervada exclusivamente por fibras simpáticas, mientras que el árbol biliar recibe fibras tanto simpáticas como parasimpáticas. Las fibras nerviosas se extienden hacia los espacios porta menores e incluso hacia el parénquima perilobulillar. Alrededor de los conductos biliares, especialmente de los mayores, existe un plexo subepitelial. Las principales funciones de estos nervios son las de regular el flujo arterial y controlar la glucogenolisis (182).

Las fibras eferentes sensoriales inervan el hígado a través de las fibras simpáticas, los nervios espláncnicos y el nervio frénico derecho (181). Estas actúan como osmorreceptores, barorreceptores y receptores metabólicos (182). El nervio frénico inerva la cápsula de Glisson y los ligamentos coronario y falciforme, siendo responsable del dolor hepático (181).

4.1.4. El sistema biliar

La red biliar canalicular, inicialmente conformada por espacios interhepatocitarios de una micra de diámetro, drena, por medio de los canales de Hering, en los conductillos biliares tapizados por células ductales (células epiteliales cuboideas sin borde estriado), con una luz central de 2-20 micras de diámetro. Estos forman una red ricamente anastomosada que desemboca en los conductos biliares, exclusivamente presentes en los espacios porta (y acompañados siempre por una arteria y una vena), los cuales incrementan su diámetro hasta alcanzar los conductos biliares intrahepáticos mayores, y, posteriormente, los extrahepáticos,

para conformar finalmente el conducto biliar común a nivel del ligamento hepatoduodenal, antes de su desembocadura en el duodeno. La distribución anatómica de los conductos biliares es análoga a la de la vena porta (51; 182).

4.1.5. Fisiología hepática

El hígado interviene en la mayoría de los procesos metabólicos del ser humano y de los animales superiores. Recibe los productos finales de la absorción intestinal de las proteínas, hidratos de carbono y lípidos, y los transforma en sustancias más complejas, indispensables para el normal mantenimiento del equilibrio del medio interno.

Además, controla la producción y secreción de bilis y regula la concentración plasmática de una gran cantidad de pequeñas moléculas imprescindibles para el metabolismo normal de los seres vivos. Fagocita innumerables sustancias del torrente circulatorio (como los quilomicrones, las partículas coloidales, las bacterias y virus, así como los hematíes, los leucocitos y las plaquetas envejecidos) por medio de las células de Kupffer y las células embrionarias, que se encuentran en las paredes de los sinusoides y en los tractos portales (ambas pertenecientes al sistema reticuloendotelial) (181) y es capaz de eliminar ciertos medicamentos, hormonas y otros productos metabólicos. Las células del sistema reticuloendotelial hepático participan en la inmunidad celular y también en la humoral, a través de la producción de inmunoglobulinas, interleukinas... (181).

Metabolismo de los hidratos de carbono

El hígado interviene de una forma directa en el metabolismo de los hidratos de carbono: retiene los azúcares procedentes de la alimentación y transforma la glucosa en glucógeno para que pueda ser almacenada en el interior de los hepatocitos (glucogenogénesis); en ausencia de glucosa es capaz de transformar los aminoácidos y los lípidos en glucosa (gluconeogénesis) y, finalmente, puede despolimerizar el glucógeno en glucosa (glucogenolisis) y luego transformar ésta en ácido pirúvico (glucólisis) (182).

El glucógeno es el material de almacenamiento de la glucosa, pero el contenido total de éste en el hígado sólo alcanza los 75 gramos en el humano, cantidad insuficiente para mantener el nivel de glucemia durante una noche de ayuno, siendo la producción de glucosa a partir de aminoácidos una importante fuente en esta situación. Cuando existe un exceso de glucosa en la sangre, ésta es transformada en el hígado en aminoácidos y ácidos grasos que forman cuerpos cetónicos durante su metabolismo (181). El conjunto de estos fenómenos es coordinado en todo momento por el hígado en dependencia del estado de la alimentación del organismo (fase de ayuno, fase postprandial) y de las disponibilidades del mismo, en perfecta conjunción con los niveles hormonales de insulina y glucagón (182).

Otros monosacáridos como la fructosa y la galactosa son convertidos por el hígado en glucosa y posteriormente en glucógeno, completando el aprovechamiento casi total de los hidratos de carbono provenientes de la digestión intestinal (182).

Metabolismo de los lípidos

El hígado tiene un papel fundamental en el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas plasmáticas. El metabolismo lipídico es de una gran complejidad y el hígado cumple una función integradora y reguladora de la mayoría de los procesos, tanto anabólicos como catabólicos. La máxima expresión de esta función la realiza en las siguientes rutas metabólicas:

- Síntesis hepática de ácidos grasos a partir de precursores hidrocarbonados y en menor medida de las proteínas (lipogénesis). Este proceso está sujeto a regulación hormonal, pero sobre todo a un mecanismo autorregulador dependiente de la llegada al hígado de ácidos grasos, tanto exógenos como endógenos. Los ácidos grasos hepáticos se destinan a: oxidación como fuente de energía para el metabolismo celular, esterificación del colesterol hepático, síntesis de fosfolípidos y resíntesis de triglicéridos para su depósito y secreción al plasma en forma de prebetalipoproteínas o proteínas de muy bajo peso molecular (VLDL) (182).
- Metabolismo hepático del colesterol. El colesterol se forma a partir del acetato siendo la enzima limitante en la cadena sintética la hidroximetil-glutamil-CoA reductasa, cuya acción es controlada por la concentración de colesterol exógeno (absorción intestinal) y endógeno. Así mismo, el colesterol es el único substrato a partir del cual se forman los ácidos biliares (la formación de estos es responsable del 80-90% del recambio del colesterol endógeno y exógeno en la rata y de aproximadamente la mitad de ese porcentaje en el humano), mecanismo que sirve para evitar la acumulación de cantidades excesivas de colesterol (182). El colesterol hepático es destinado a la incorporación en la estructura de las membranas celulares hepáticas, catabolismo a sales biliares, excreción en la bilis y esterificación para su almacenamiento.
- Síntesis hepática de fosfolípidos, como reflejo de una función ubicada en las células de todo el organismo, aunque alrededor del 90% se forman en el hígado. Son destinados a formar parte integrante de las membranas celulares y además a la excreción biliar y a la síntesis de lipoproteínas (182).
- Metabolismo de las sales biliares. En todos los vertebrados el precursor obligado de los ácidos biliares es el colesterol y el hígado es el único órgano capaz de transformar el colesterol en derivados hidroxilados del ácido colonoico.

Los ácidos biliares formados a partir del colesterol en el hígado, se denominan ácidos biliares primarios: ácido cólico y quenodesoxicólico, los cuales son escasamente solubles a pH fisiológico, siendo la esterificación a nivel hepático con glicina o taurina la que les permite ser

libremente solubles en el medio acuoso de la bilis y el intestino (dando lugar a las sales biliares) (182). A su paso por el intestino éstos experimentan ciertas transformaciones estructurales por efecto de las bacterias intestinales, dando lugar a los ácidos biliares secundarios (desoxicólico y litocólico) que bien son absorbidos en el intestino para volver al hígado (ácido desoxicólico) y ser reexcretados por la bilis, o bien son eliminados, tras precipitar, por las heces (ácido litocólico).

La síntesis hepática de ácidos biliares se encuentra controlada por un mecanismo de retroalimentación, dependiente del flujo transhepático de sales biliares transportadas por la vena porta (circulación enterohepática). De la integridad de este circuito y de los sistemas en él implicados (absorción ileal y filtro hepático) depende la correcta función de las sales biliares, evitándose su acción detergente en otras localizaciones donde serían nocivas.

Derivado de esta correcta función, se encuentra el papel solubilizador de las sales biliares de los productos lipolíticos originados tras la ingesta, facilitando la absorción de los compuestos lipídicos por la mucosa del intestino (182).

Metabolismo de los aminoácidos y de las proteínas

En condiciones normales, el hígado cataboliza más de la mitad de los aminoácidos exógenos procedentes de la hidrólisis de las proteínas y de los péptidos alimentarios, transformándolos en urea (función hepática exclusiva) (182). Otra fracción de aminoácidos exógenos, junto con los aminoácidos endógenos que llegan al hígado desde la periferia, es utilizada por el hígado para sintetizar proteínas, participar en reacciones de transaminación, en la gluconeogénesis y en la degradación metabólica y el resto pasa a la circulación general para difundir rápidamente en el espacio extracelular y facilitar, de este modo, su captación por las células de los diferentes tejidos y sistemas de la economía (182).

El hígado constituye uno de los reservorios más importantes de aminoácidos libres, asegurándose de este modo la síntesis de las proteínas que emplea para su propia estructura y función excretora, de las enzimas de membrana, cuya continua renovación permite regular numerosas reacciones metabólicas, y de la mayoría de las proteínas plasmáticas (albúmina sérica, fibrinógeno, protrombina, haptoglobina, glucoproteínas, transferrina, ceruloplasmina, lipoproteínas, globulinas alfa1 y alfa2...), excepto las inmunoglobulinas (en la producción de las cuales también participa por sus células del sistema reticuloendotelial, como se ha indicado previamente) (181).

Asimismo el hígado es un órgano fundamental para el catabolismo de las proteínas plasmáticas. El ciclo de la urea (también denominado ciclo de la ornitina de Krebs-Henseleit) (181) es el mecanismo fisiológico para la detoxificación y eliminación del amoníaco procedente del metabolismo de las proteínas y de otros compuestos nitrogenados. Este ciclo tiene lugar en el hígado y en él intervienen cinco enzimas: carbamil fosfato sintetasa, ornitina carbamoil

transferasa, arginina succinato sintetasa, arginina succinato liasa y arginasa. Las dos primeras se encuentran en la matriz mitocondrial, en tanto que las tres últimas se hallan en el citoplasma. La acción secuencial de estas enzimas conduce a la transformación del amoníaco en urea (182).

Metabolismo de la bilirrubina

Aunque la bilirrubina puede considerarse como un producto de desecho del metabolismo, su formación es esencial para la homeostasis de nuestro organismo. Impide la acumulación del grupo hemo liberado de los eritrocitos envejecidos y, por tanto, regula la síntesis del hemo nuevamente formado, un constituyente importante de los citocromos así como de la hemoglobina. Aunque el metabolismo hepático de la bilirrubina tiene muchas similitudes con el de otros aniones orgánicos, incluidos fármacos, hormonas y colorantes como la bromosulfaleína (BSP) y el verde de indocianina (ICG), se diferencia en muchos aspectos del de los ácidos biliares (182).

Los pigmentos biliares comprenden una cadena de cuatro anillos pirrólicos unidos por grupos metano o meteno. La bilirrubina es liposoluble e insoluble en solución acuosa a pH fisiológico (182).

La mayor parte de la bilirrubina circulante se deriva de los hematíes envejecidos que, secuestrados en las células reticuloendoteliales del bazo, el hígado y la médula ósea, sufren lisis dando lugar a la liberación de la hemoglobina, la posterior excisión de ésta del grupo hemo y su transformación en bilirrubina. El porcentaje restante de la formación de bilirrubina total en el adulto normal, deriva principalmente del recambio rápido del hemo hepático libre o de otras proteínas hemo como el citocromo p-450; también existe un pequeño componente eritropoyético de bilirrubina marcada precoz y la mucosa del intestino delgado puede contribuir al catabolismo del grupo hemo (182).

Aunque los linfocitos y los hematíes pueden desempeñar una pequeña función en el transporte de la bilirrubina, la mayor parte circula en el plasma unida a la albúmina antes de ser captada por el hígado u otros tejidos (182).

La captación hepática de la bilirrubina está mediada por un receptor específico de la albúmina en el hepatocito. Una vez en el hepatocito es conjugada con ácido glucurónico por medio de enzimas microsomales, transformándose en una sustancia hidrosoluble, el glucuronato de bilirrubina (aunque en algunos animales pueden formarse conjugados de glucosa y xilosa, en el humano sólo se han registrado en la colostasis y durante el desarrollo fetal) (182).

Esta sustancia es eliminada por la bilis, siendo reducida en el intestino por la acción de las bacterias, transformándose en un conjunto de compuestos conocidos como urobilinógenos.

Aunque la mayor parte de estos son eliminados por las heces, una parte es reabsorbida y vuelve al hígado para ser re-excretada con la bilis o a través de la orina (181).

Los aumentos de la bilirrubina en sangre pueden deberse a incrementos en la producción de la misma que superen la capacidad del hígado para eliminarla, a captación disminuida por parte del hígado, a alteración de la capacidad de conjugación del hígado o a impedimento a la excreción por obstrucción de los conductos biliares (181).

Metabolismo de los fármacos

Los sistemas enzimáticos responsables del metabolismo de los fármacos en otras sustancias químicas se encuentran en las membranas del retículo endoplásmico liso de los hepatocitos formando parte del denominado sistema microsomal (181, 182).

Muchos fármacos y otros compuestos extraños, incluidos ciertos carcinógenos y sustancias endógenas, como las hormonas esteroideas y las prostaglandinas, son metabolizados en el hígado dando lugar a formas más hidrosolubles que pueden ser excretadas en la orina o en la bilis (182). Sin la presencia de determinados sistemas enzimáticos localizados en el hígado, que convierten los fármacos liposolubles (no polares) en sustancias hidrosolubles (polares), muchos agentes farmacológicos actuarían en el organismo durante tiempo indefinido, ya que la hidrosolubilidad determina la excreción por orina. Por otra parte, la excesiva acumulación de sustancias no polares produce lesiones de mayor o menor gravedad en la mayoría de órganos y sistemas.

Aunque el metabolismo de los fármacos en el hígado da lugar habitualmente a sustancias sin actividad farmacológica o con una actividad muy escasa, la forma activa del fármaco se produce a veces a partir de un precursor inactivo. El metabolismo hepático del fármaco también puede dar lugar a metabolitos que, o bien conservan cierta actividad farmacológica, o bien adquieren su toxicidad (182).

El metabolismo de los fármacos en el hígado suele dividirse en dos fases. En las reacciones de fase 1 interviene la adición o exposición de grupos reactivos, que a continuación son conjugados en las reacciones de fase 2 con sustancias como el glucurónido, el sulfato y la glicina. Algún fármaco puede ser metabolizado por más de una vía (182).

Las enzimas microsomales metabolizadoras de fármacos funcionan como un sistema de transporte electrónico de multicomponentes. Estas enzimas se conocen como hidroxilasas microsomales, monooxigenasas u oxidasas de función mixta y precisan NADPH y oxígeno molecular para ser activos (182).

La conjugación de los fármacos en las reacciones de fase 2 aumenta la hidrosolubilidad y la acidez, facilitando la eliminación (182).

4.2. Modelos experimentales de metástasis hepáticas

Debido a que entre un 50 y 60% de los pacientes con carcinoma colorrectal desarrollan metástasis hepáticas a lo largo de la enfermedad, y dado que la cirugía de resección se muestra como la mejor opción de tratamiento, se han desarrollado muy diversos modelos experimentales para el estudio de metástasis hepáticas (183). Cada uno de ellos resulta especialmente útil en ciertos aspectos, a la vez que muestra desventajas claras desde otros puntos de vista; así, no existe un modelo que podamos considerar universalmente válido.

En 1959, Leduc fue el primero en describir con éxito la formación de tumores en el hígado tras la inyección de células tumorales en el bazo (184).

Tras este estudio se describieron numerosos modelos animales para las metástasis hepáticas de carcinoma colorrectal. No obstante, un modelo animal ideal debería poder imitar todos los aspectos del desarrollo metastático humano, como pueden ser (183):

- a) Las células tumorales necesitan estar vivas y mostrar potencial metastático.
- b) Las células tumorales deben alcanzar e invadir el parénquima del hígado y posteriormente asentarse y crecer como nódulos tumorales.
- c) El modelo debe de ser eficiente (Una alta proporción de los animales utilizados debería exhibir las características requeridas).
- d) El modelo debe de ser reproducible.
- e) El modelo debe de ser práctico.
- f) El modelo debe de ser óptimo en términos de consideraciones éticas.

Hasta la fecha actual, ningún modelo ha sido capaz de satisfacer todas estas condiciones. Como consecuencia, la elección del modelo animal para el estudio de las metástasis hepáticas requiere de elecciones acerca de las características necesarias que dependen a su vez del objetivo de los experimentos.

Los roedores son los animales utilizados con más frecuencia para el estudio de carcinomas de origen colorrectal. Las primeras ratas empleadas con esta finalidad fueron *Rattus norvegicus*, que aparecen en publicaciones años anteriores a 1.828 (185). A partir de aquellos primeros estudios, se han ido desarrollando cepas de ratas modificadas genéticamente, que se emplean en la actualidad por su propensión a desarrollar espontáneamente CCR; también se emplean con asiduidad cepas singénicas en las que se implantan líneas tumorales estabilizadas. Los primeros estudios de CCR en ratón datan de 1.900, y se llevaron a cabo en el ratón *Mus musculus*.

Con respecto a los procedimientos de inducción tumoral, básicamente se encuentran dos opciones:

- a) Transplante de xenoinjertos en animales inmunodeficientes.

- b) Transplante de isoinjertos en animales inmunocompetentes.

Por su parte, los animales inmunocompetentes reflejan mejor el estado inmune normal de pacientes con carcinoma colorrectal que desarrollan metástasis. También, como los animales generalmente muestran un estado de salud más estable, su sistema inmune intacto permite examinar los efectos de la inmunoterapia, la cual es intensamente investigada como opción de tratamiento contra el cáncer (186, 187).

Respecto al proceso de inoculación de las células de carcinoma colorrectal, las principales vías son cinco:

- a) Subcutánea (188-190).
- b) Intraesplénica (191-193).
- c) Intraportal (194-196).
- d) Intrahepática (197-199).
- e) En la pared del colon (189; 200, 201).

Las ventajas o desventajas de los diferentes métodos depende en gran medida del objetivo del experimento. Una diferencia elemental para las experiencias con animales es la necesidad de obtener metástasis hepática local o difusa a través del hígado. En aquellos casos en los que se requiere un modelo de metástasis hepáticas reseccables, uno de los principales criterios debe ser la creación reproducible de tumores únicos (183).

La inoculación subcapsular en el hígado o la implantación intraparenquimal de una pequeña porción tumoral, ha mostrado un 100% de eficacia en la obtención de tumores hepáticos tras 15-43 días. Por lo tanto, este método es muy práctico y eficiente, pero en cambio, no representa la diseminación hematogena de las células tumorales producida en humanos (183; 197-199).

Con el fin de obtener una metástasis hepática difusa, la inyección ortotópica en la pared cecal de células tumorales ofrece un modelo que parece incluir todos los pasos de la compleja vía metastática, logrando con ello una mayor aproximación a la práctica clínica. Sin embargo, el desarrollo de la metástasis hepática es más impredecible e ineficiente, lo que hace a este método menos adecuado para los estudios terapéuticos (183; 189; 200, 201).

La inoculación en bazo o en el sistema portal reproduce una propagación hematogena de las células tumorales en el hígado. Este modelo puede lograr una inducción de metástasis macroscópicas hasta en un 100% de los animales. Los mejores resultados han sido descritos utilizando ratones C57Bl/6 con células MCA y con las ratas Wistar, WAG/Rij o BDIX con células de adenocarcinoma inducidas mediante N-methyl-N-nitrosoguanidina, CC531 o células de carcinoma de colon DHDK12/TR respectivamente. Las desventajas de la inoculación intraesplénica incluyen una tasa de mortalidad del 10% debido a la operación y al desarrollo de

metástasis esplénicas, pancreáticas y pulmonares, situando al método de inoculación intraportal como una opción eficiente, reproducible y práctica. En este modelo, el crecimiento tumoral puede estar limitado a una parte del hígado mediante el clampaje del vaso portal periférico previo a la inoculación de las células tumorales (183; 191-196).

Por otra parte, conviene tener en cuenta a la hora de comparar los diferentes modelos, el uso de la gran variedad de líneas celulares diferentes, en algunos casos seleccionadas por su potencial metastásico (183).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXPERIMENTOS IN VITRO

1.1. Células

1.1.1. Origen

Para la elaboración de esta Tesis se han utilizado células de Adeno Carcinoma de Colon de rata (ACC-531). Se adquirieron dos crioviales a Cell Line Service (Alemania) de pase 21 (06/06/06) de los cuales, amplificamos uno obteniendo 20 crioviales de pase 22 que fueron congelados en nitrógeno líquido (19/07/06). Posteriormente, se utilizó uno de los crioviales de pase 22 para amplificarlo hasta pase 24, stock que fue utilizado para las experiencias de la Tesis.

Los estudios in vitro se llevaron a cabo en la unidad de cultivos celulares del Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física de la UPV.

1.1.2. Amplificación y almacenamiento

Las células de ACC-531 fueron adquiridas congeladas en crioviales de 10^6 células en 1ml de medio de congelación. Para su descongelación se atemperaron rápidamente en baño a 37°C sembrándose seguidamente en frasco de cultivo T-25 (*Tissue Culture Flasks; Orange Scientific, 5510100*) en 4ml de medio RPMI (*RPMI-1640; Gibco, 52400-025*) y 1ml de Suero Fetal Bovino (*SFB; Biochrom AG, S0115*). A las cuatro horas (una vez adheridas al fondo del frasco) se les retiró el medio y se añadió 5ml de medio nuevo (RPMI + SFB 10%).

Las células fueron mantenidas en medio RPMI complementado con Suero Fetal Bovino y suplementado con Penicilina (100 U.I./ml)/ Estreptomicina (100 mgr/ml) (LONZA; DE 17-602E). Las condiciones del medio del incubador fueron de 37°C de temperatura, en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 .

En primer lugar, las células de pase 21 se amplificaron hasta el pase 22 para posteriormente, amplificar un criovial de pase 22 hasta pase 24, siendo la totalidad de los experimentos realizados tanto in vitro como in vivo de este último pase y en fase de crecimiento exponencial. Las células amplificadas fueron congeladas en crioviales a una concentración de 10^6 células/ml siendo el medio de congelación 10% Dimetilsulfóxido (*MERCK, 1.02952.1000*) y 90% SFB.

En cada pase se realizó una valoración de la viabilidad celular utilizando únicamente aquellos cultivos en los que dicha viabilidad fuese igual o superior al 95%.

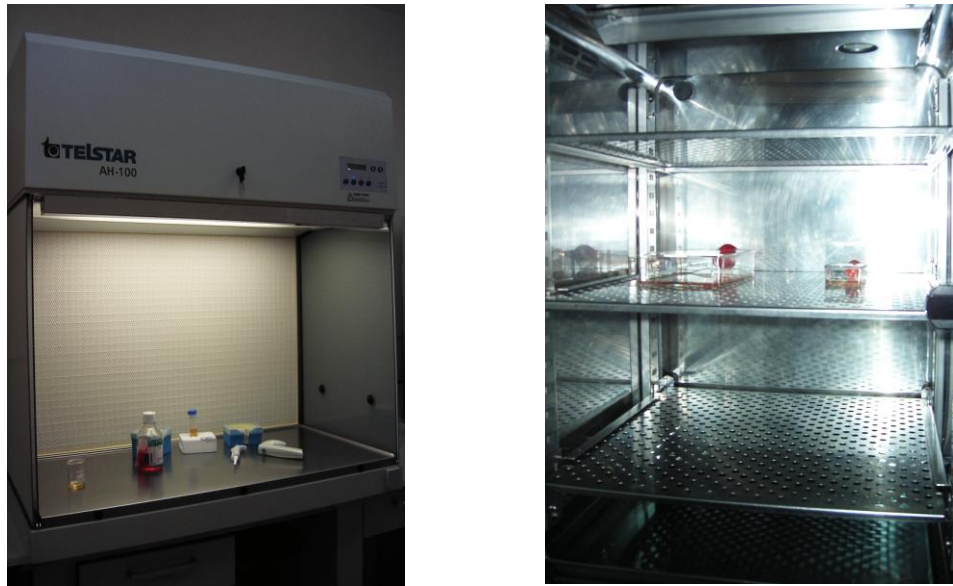


Figura 9. Cabina de flujo laminar e incubador de células de CO₂

Para la realización de cada experiencia se descongeló un nuevo criovial. En el momento en el que las células llegan a la semiconfluencia, se realiza el pase de las mismas.

En campana de cultivos, tras vaciar de medio el frasco T-25, se añaden unos 3ml de PBS (*Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Sigma, P-3813*) para limpiar las células adheridas al frasco de restos de medio. Se retira el PBS y se adiciona 3ml de Tripsina –Edta (*0.05% Trypsin-EDTA 1X; Gibco, 25300*) y se deja en incubador durante 5 minutos apróx. Tras los cuales, las células que quedan en suspensión se vierten en un falcon – en el cual se adiciona previamente 1ml de SFB para inactivar la Tripsina-Edta - para ser centrifugadas (1500 rpm a 6°C durante 5 minutos).



Figura 10. Criocentrífuga.

Tras la centrifugación, se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en un volumen conocido de RPMI. Se calcula mediante un Hemocitómetro la concentración celular de nuestra suspensión y en función de la experiencia a realizar, se siembra un número conocido de células en un frasco T-75 (*Cell Culture Flasks; CORNING, 430641*), con 10ml de medio (RPMI + SFB 10%). Los frascos T-75 serán los que se utilicen posteriormente para la siembra de las placas multipocillo al llegar las células al estado de semiconfluencia.



Figura 11. Frasco de Cultivo Celular T-75

Si el objetivo de la resuspensión celular es el de congelar las células para la obtención de un stock, se siembran las células del falcon en una T-150 con medio RPMI + SFB 10%. Cada tres días se renueva el medio. Una vez llegadas las células al estado de semiconfluencia, se levantan mediante tripsina-EDTA y tras centrifugarlas se resuspenden en medio RPMI y se calcula el número de células viables de la suspensión mediante Hemocitómetro o NucleoCounter. Se vuelven a centrifugar y el pellet de número de células conocido, se resuspende en esta ocasión en medio de congelación (SFB 90% + DMSO 10%). El volumen de medio de congelación es tal que la concentración celular resultante sea de 10^6 células/ml.

Finalmente, tras etiquetarlos con la fecha y el nº de pase se llenan los crioviales con 1ml de la suspensión celular. Los crioviales se enfrían a -20°C durante dos horas y posteriormente se trasladan a un ultracongelador a -80°C . Con el fin de disponer de un stock celular más duradero, parte de los crioviales se almacenan en Nitrógeno líquido ($-195,8^{\circ}\text{C}$).

1.1.3. Cultivo en placas de 24 pocillos

Una vez que las células llegan al estado de semiconfluencia en el frasco de cultivo T-75, están listas para ser levantadas y utilizarlas en las experiencias. En campana de cultivos, se retira el medio del frasco y se añaden unos 5ml de PBS para limpiar las células adheridas al frasco de restos de medio. Se retira el PBS y se añaden 5ml de TRIS-EDTA al frasco dejándolo

nuevamente en la estufa de cultivos durante 5-10 minutos (hasta que se despeguen la mayoría de las células).

Una vez despegadas las células del fondo del frasco, se vierten a un falcon al que previamente se le ha añadido 1ml de SFB (para neutralizar la Tripsina-Edta). El falcon se introduce en la centrífuga y se centrifuga a 1500 rpm a 6°C durante 5 minutos.

Tras el centrifugado, se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 5ml de RPMI. Se mide la concentración y la viabilidad celular mediante la técnica de hemocitómetro o NucleoCounter. Una vez conocida la concentración de células que disponemos en los 5ml, se calcula el volumen de dicha suspensión celular que debemos tomar para conseguir una solución final de 50ml de RPMI + SFB 10% con una concentración de 30.000 células/ml.

Se toman cuatro placas de 24 pocillos (*Tissue Culture Plate 24-Well Flat Bottom with Lid; Sarstedt, 83.1836*) y se rotulan como 0-horas, 24-horas, 48-horas y 72-horas. Se coge la placa de 0 horas y se llenan 6 pocillos con 500 μ l de medio por pocillo (RPMI + SFB 10%). Luego se llenan las otras tres placas de igual manera pero por completo. Finalmente, se toma la suspensión celular preparada y tras resuspender bien las células, se llenan los pocillos anteriores con otros 500 μ l de medio y células. La concentración por pocillo resultante es de 15.000células/ml.



Figura 12. Placa de 24 pocillos

Una vez sembradas las placas, se comprueba mediante observación al microscopio que todos los pocillos contienen las células, y a continuación se introducen en la estufa de cultivos. Transcurridas 24 horas, dará comienzo la experiencia.

1.1.4. Cultivo en placas de 96 pocillos

Preparamos en la campana de cultivos cuatro placas de 96 pocillos (*Tissue Culture Plate 96-Well Flat Bottom with Lid; Sarstedt, 83.1835*) etiquetadas igualmente como 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas. Calculamos qué volumen de nuestra suspensión de células debemos tomar para preparar en un falcon de 50ml una suspensión celular de 25.000células/ml con un volumen final de 30ml de RPMI + SFB 10%. En otro falcon se preparan 5ml de medio (RPMI + SFB 10%) que se utilizará como blanco.

Se toma la placa de 0-horas y se siembran seis pocillos con 100 μ l/pocillo de la suspensión celular, resultando de esta manera una concentración final de 2.500 células/pocillo. Se llenan otros 6 pocillos con 100 μ l/pocillo de medio sin células, que serán el blanco. Las otras tres placas se siembran cada una por completo de células salvo seis pocillos que se llenarán de medio sin células (blancos). De esta manera obtendremos un blanco, un control y un total de 10 medios problema a testar.

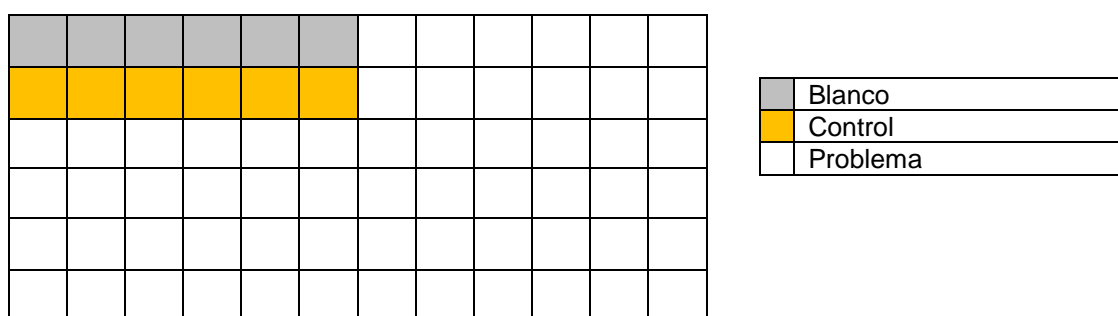


Figura 13. Esquema de la siembra celular y distribución de medios en una placa de 96 pocillos.

Tras asegurarnos de la correcta siembra mediante la observación de los pocillos al microscopio, se introducen en la estufa de cultivos durante 24 horas momento en el que dará lugar el inicio de la experiencia.

1.2. Técnicas de recuento celular

Son cuatro las técnicas utilizadas para el recuento de las células: recuento manual mediante hemocitómetro, medida de la absorbancia mediante el test mitocondrial de Tetrazolio (MTT), microscopio de fluorescencia NucleoCounter y lector de placas xCELLigence.

1.2.1. Recuento mediante hemocitómetro

Se fundamenta en el recuento manual realizado por el investigador mediante observación directa con microscopio óptico.

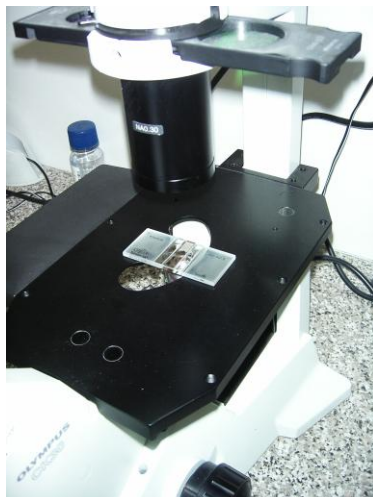


Figura 14. Recuento al microscopio mediante hemocitómetro

Se utiliza un hemocitómetro o cámara de contaje de Neubauer (o Bürker), combinado con la tinción vital de azul de tripán (*Trypan Blue Stain 0,4%; Gibco, 15250-061*) para distinguir las células vivas de las muertas (teñidas de azul).

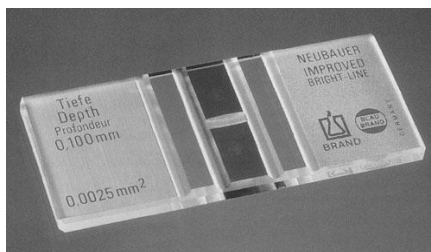


Figura 15. Hemocitómetro

La cámara Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0,25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0,1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0,1 milímetros, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0,1 milímetros cúbicos, es decir 0,1 microlitros (figura 16).

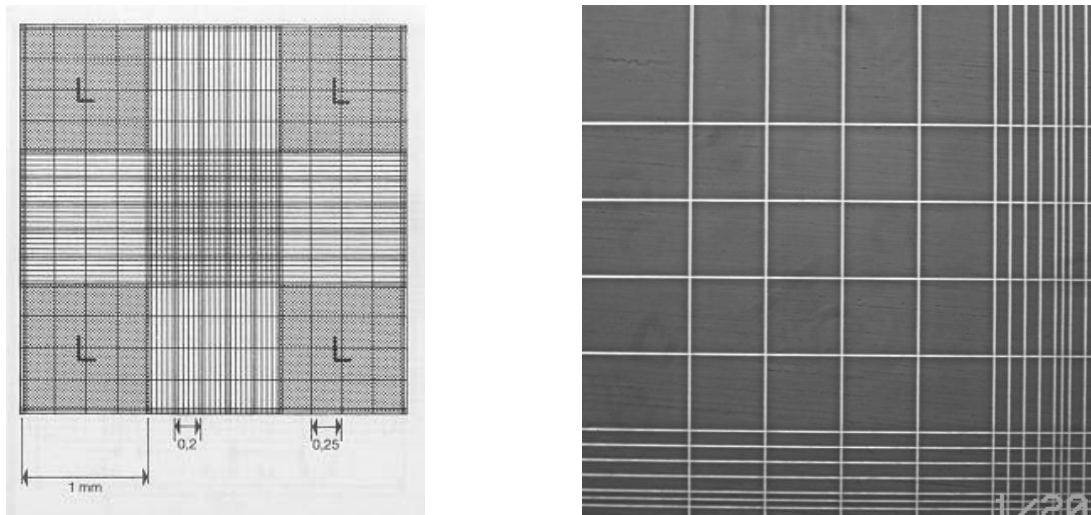


Figura 16. Cámara Neubauer (imagen izquierda). En la imagen de la derecha se puede observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 milímetros de lado. Esta imagen ha sido tomada empleando un microscopio invertido de contraste de fases.

Para determinar la viabilidad celular se pueden emplear diferentes métodos. El más común es el de tinción con azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Asimilar células blancas, por exclusión, a células viables es un error pues por este método se sobrevalora la viabilidad de las células en la suspensión, determinando como inviables sólo aquellas con la membrana rota. De modo esquemático, el proceso se realiza de la siguiente manera:

1. Preparar la cámara de Neubauer: limpiar bien la cámara de recuento con alcohol 70%, secarla con esmero, y cubrirla con un cubreobjetos de 1mm de grosor (ajustado correctamente).
2. Homogeneizar la suspensión de células con una micropipeta, coger 0,05 ml e introducirlos por capilaridad entre el cubre y la cámara.
3. Contar las células en el microscopio de contraste de fases con el objetivo adecuado al tamaño de las células, que en nuestro caso es 10X. Con este aumento de 10X, se pueden contar uno a uno los 4 cuadrados grandes de los extremos (con 16 cuadraditos cada uno), que bordean una cruz en cuyo centro hay 16 cuadrados idénticos a éstos de los extremos (figura 16). No se deben contar las células que tocan uno de los extremos horizontales y uno de los verticales de cada cuadrado grande.

4. A continuación, se calcula la media de los recuentos, y a partir de ese dato se puede calcular el número de células por ml y, si se necesita, el número de células totales.

1.2.2. Valoración de la proliferación mediante MTT

El test mitocondrial de Tetrazolio (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*; Sigma, M2128-1G), se basa en la capacidad que tienen las enzimas celulares para transformar determinados sustratos en otros metabolitos secundarios. La cantidad de compuesto que se forma depende de la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, lo cual es un claro indicador del número de células viables que existen en el cultivo.

En este caso, las sales de tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), que son de un color amarillo, por la acción de la succinato deshidrogenasa mitocondrial, se transforman en un metabolito insoluble, el formazán, que es de color violeta, resultando en un cambio de color del medio de cultivo. La formación de formazán se puede cuantificar midiendo la absorbancia del cultivo en un lector de ELISA a una longitud de onda de 540nm. Por su sencillez, sensibilidad y semiautomatismo permite cuantificar un elevado número de muestras.

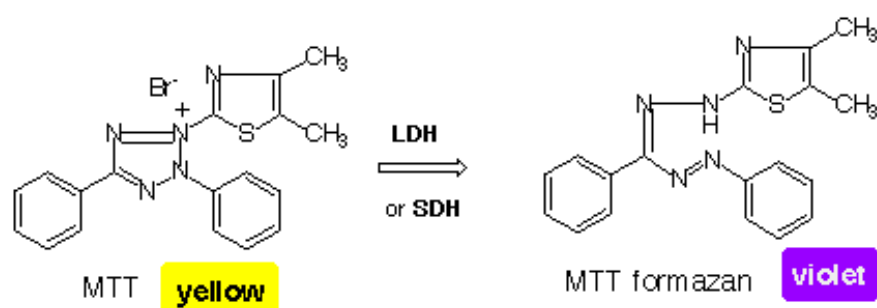


Figura 17. Reacción mediada por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial.

Para cuantificar el número de células en un cultivo, en las placas de 96 pocillos se añaden 10 μ l/pocillo de MTT, se esperan 2 horas, se añade DMSO para lisar las células, y finalmente se mide la absorbancia en el espectrofotómetro.

1.2.3. NucleoCounter

Recientemente se ha incorporado a nuestro laboratorio un moderno equipo de recuento celular para aquellas mediciones cuya importancia requiera de una mayor exactitud en comparación al recuento manual con el Hemocitómetro.

Es un microscopio de fluorescencia dotado de un potente software de análisis de imagen que es capaz de identificar y contar las células teñidas.

El NucleoCounter cuenta con una serie de cassettes en los cuales se introduce un pequeño volumen (50µl) de la muestra de células que queremos contar. Cada cassette contiene a su vez 2,8µgr de Ioduro de Propidio (IP). El IP se intercala entre las bases de ADN del núcleo celular de tal forma que, cada 4-5 pares de bases se intercala una de yoduro.

Una vez producida en el cassette la tinción de las células con el Ioduro de Propidio (sólo permeable en células muertas, con la membrana rota), se introduce en el lector y éste lo traduce en forma de una imagen fluorescente, la cual a su vez se traduce en nº de células muertas por ml de muestra.

Tomando otra muestra de nuestra suspensión celular y lisando las células, se repite el proceso anterior. Esto se realiza mediante un tampón de lisis seguido de otro tampón de estabilización incorporados ambos en el kit. Al repetir ahora la lectura, se obtiene el número total de células (vivas y muertas) que había en el cultivo.



Figura 18. Lector NucleoCounter y NucleoCassette. (*Chemometec*)

1.2.4. xCELLigence

El fundamento de la técnica del lector de placas xCELLigence consiste en medir las variaciones en la impedancia eléctrica mediante microelectrodos interdigitales integrados en el fondo de los pocillos de la placa. La presencia de las células sobre los electrodos afectará al ambiente local iónico en la interfaz de electrodo/solución, conduciendo a un aumento de la impedancia registrada por el electrodo (figura 19).

La medida de impedancia proporciona la información cuantitativa sobre el estado biológico de las células, incluyendo el número de células, la viabilidad, y la morfología.

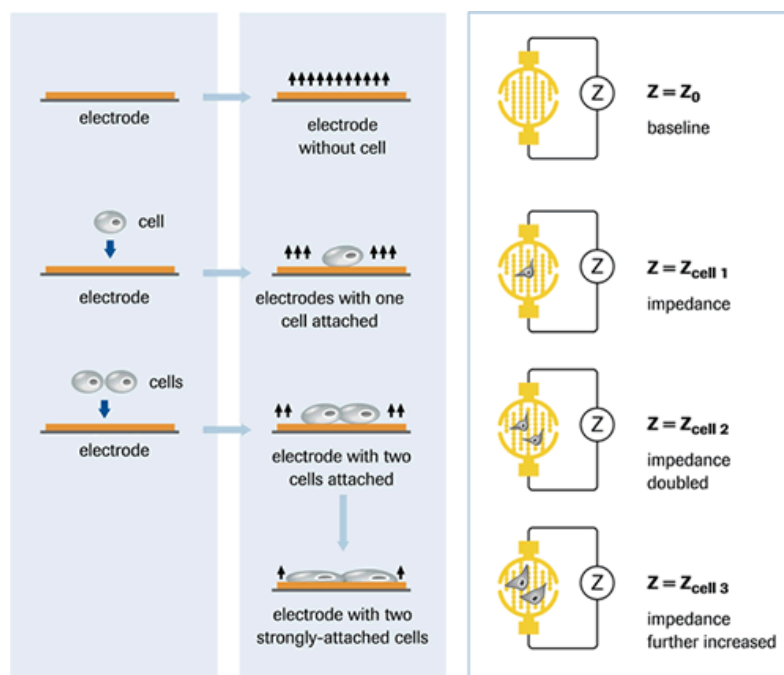
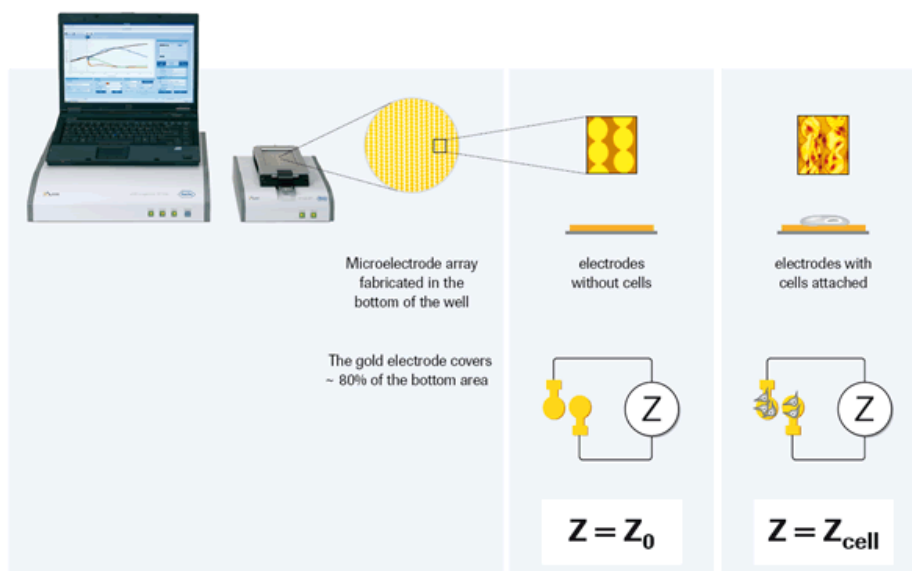


Figura 19. Esquema del funcionamiento del lector de placas xCELLigence.

Cuantas más células se ubican sobre los electrodos de los pocillos de la placa, más grandes resultan los aumentos de la impedancia del electrodo. Además, la impedancia depende de la calidad de la interacción de la célula con los electrodos. Por ejemplo, la adherencia de una célula aumentada o de la extensión conducirán a un cambio más grande de la impedancia de electrodo. Así, la impedancia de electrodo, que es mostrada como el índice de célula (CI), puede ser usada para supervisar la viabilidad de la célula, el número, la morfología, y el grado de adherencia en los ensayos celulares.

1.3. Cálculo de la viabilidad celular

Para el estudio de la viabilidad celular se utilizan las técnicas de recuento por hemocitómetro y el lector NucleoCounter.

1.3.1. Mediante el uso del hemocitómetro

Mediante el uso de Azul de Tripán que es un colorante que tiñe las células con membrana celular dañada de azul y el hemocitómetro se puede calcular la viabilidad celular del cultivo. Para calcular el porcentaje de células viables se cuentan las células vivas y muertas (teñidas de azul), y así se calcula la viabilidad celular, que siempre debe ser superior al 90%.

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{n}^\circ \text{ cél. Vivas} / \text{n}^\circ \text{ cél. Totales}) \times 100$$

1.3.2. Mediante el uso del lector NucleoCounter

Mediante el Ioduro de Propidio que se intercala en el ADN de las células muertas y el NucleoCounter calculamos también la viabilidad celular fácilmente.

La primera medida que nos da el lector es el número de células muertas que tenemos en la suspensión celular. Tras añadir el tampón de lisis a la suspensión de células, éstas se lisan y el lector nos da el número de células totales (vivas y muertas) que hay en nuestra suspensión. Mediante la resta del primer valor calculado (células muertas al inicio) al segundo (total de células), obtenemos el número de células vivas que hay en la suspensión celular.

Mediante la misma fórmula anterior el software del equipo realiza el cálculo y nos muestra directamente en pantalla el valor de la viabilidad celular.

1.4. Estudios de proliferación

Los estudios de proliferación se han llevado a cabo en placas multipocillo de 24 y 96 pocillos. En ambos casos, la siembra de las células se realiza el primer día (-24 horas), en cuatro placas por curva correspondientes a las 0, 24, 48 y 72 horas y en medio RPMI + Suero Fetal Bovino al 10%.

En las placas de 24 pocillos se siembra una concentración de 15.000 células/pocillo y en las placas de 96 pocillos 2.500 células/pocillo. El volumen final por pocillo es de 1ml en las placas de 24 pocillos y de 100µl para las de 96 pocillos.

Pasadas 24 horas desde la siembra de las placas, para que estén bien adheridas, se lee una de las placas cuyos valores serán el número de células que tengamos a las 0 horas.

Inmediatamente después, se van cambiando progresivamente a todos los pocillos de las restantes placas el medio RPMI + SFB 10% por los nuevos medios a testar.

En aquellas curvas de proliferación en las que no intervenga el quimioterápico 5-FU, el medio de las placas se cambia una única vez el segundo día (0-horas). En el caso de estar utilizándose ATRA en la experiencia, éste se añade junto con el medio nuevo el segundo día (con el cambio de medio) y el cuarto día (añadiendo más medio al ya existente en el pocillo) (figura 20).

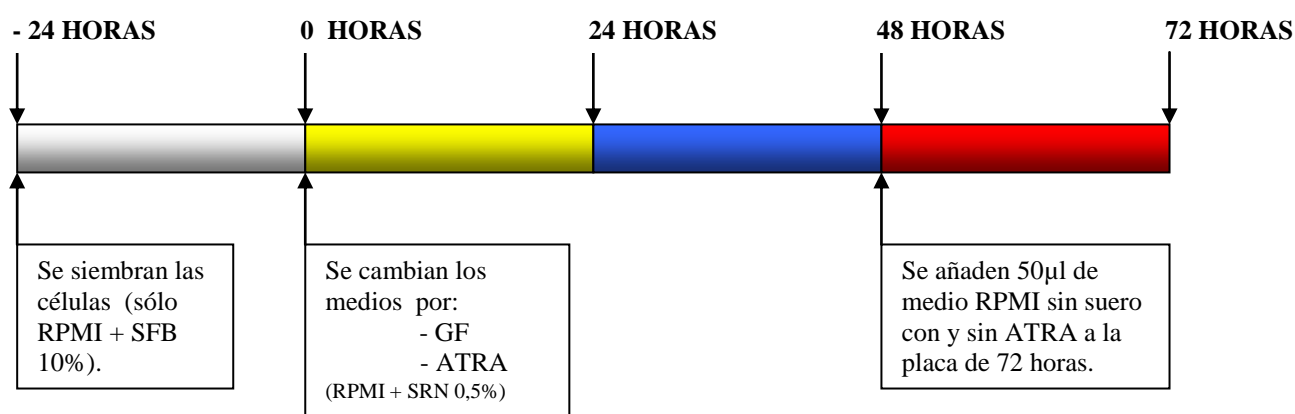


Figura 20. Esquema de cambio de medios con Factores de Crecimiento (GF) y Ácido All Trans Retinoico (ATRA).

En el caso de estar trabajando con el quimioterápico 5-FU, se debe de retirar del medio pasadas 24 horas. Por lo que, los medios de los pocillos se cambian en dos ocasiones; el segundo día (0-horas) y el tercer día (24 horas). Si además se está trabajando con ATRA, al renovar el ATRA el tercer día con el nuevo medio, no se precisa de añadirlo el cuarto día (figura 21).

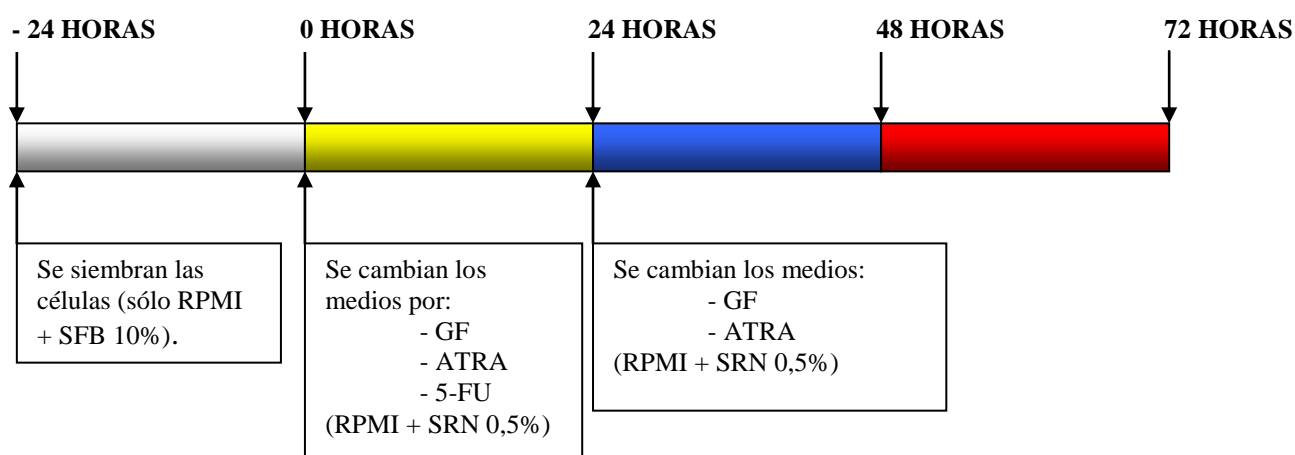


Figura 21. Esquema de cambio de medios con Factores de Crecimiento (GF), Ácido All Trans Retinoico (ATRA) y 5-Fluorouracilo (5-FU)

Diariamente se levanta una placa y se comprueba la concentración de células por cada medio. La proliferación celular se mide mediante Hemocitómetro, NucleoCounter, MTT o xCELLigence.

Tanto en las placas de 24 pocillos como en las de 96 pocillos, para cada medio se utilizan 6 pocillos con el fin de tener una N que permita obtener una significación estadística.

Mediante el programa estadístico GraphPad®, se procesan las mediciones, y los resultados se muestran en gráficas que incluyen en el eje de ordenadas los valores obtenidos (absorbancia, número de células, o "cell index") y en el eje de abscisas el tiempo de cultivo transcurrido (24, 48, 72 horas).

1.5. Biomoléculas utilizadas

Las biomoléculas utilizadas para la elaboración de ésta Tesis Doctoral son el Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF), Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb), el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Ácido All Trans Retinoico (ATRA) y el 5-Fluorouracilo (5-FU).

1.5.1. Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF)

El Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF) es suministrado por PeproTech (Referencia 100-39), en un vial de 10 μ gr de Factor liofilizado y conservado a -20°C.

Primeramente se centrifuga el vial para su total aprovechamiento previo a su resuspensión en 20 μ l de agua resultando la concentración de 0,5 mgr/ml. A esta solución se le añade 10ml de PBS obteniéndose un stock de 1 μ gr/ml de concentración final.

Se alicuota en eppendorfs y se guardan a -20°C hasta su utilización en los ensayos in vitro de proliferación celular.

1.5.2. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) es suministrado por Sigma (Referencia V 7259), en un vial liofilizado y conservado a -20°C.

Se prepara una solución stock, para lo cual se reconstituye el contenido del vial en agua hasta una concentración de 0,5 mgr/ml; a continuación, se añaden 10 ml de PBS obteniendo un stock de 1 μ gr/ml de concentración final.

Se alicuota en eppendorfs y se guardan a -20°C hasta su utilización en los ensayos in vitro de proliferación celular.

1.5.3. Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)

El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) es suministrado por Sigma (Referencia P3201), en un vial liofilizado y conservado a -20°C.

El contenido del vial se reconstituye en HCl 4mM estéril conteniendo un 0,1% de seroalbúmina humana o bovina, hasta una concentración final de 2,5 µgr/ml.

Se alicuota en eppendorfs y se guardan a -20°C hasta su utilización en los ensayos in vitro de proliferación celular.

1.5.4. Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb)

El Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb) es suministrado por PeproTech (Referencia 100-18B) en un vial liofilizado y conservado a -20°C.

Primeramente se centrifuga el vial para su total aprovechamiento previo a su resuspensión en Tris 5 mM (pH 7,6) hasta una concentración de 0,5mgr/ml. A esta dilución se le añade PBS hasta alcanzar la concentración final de 2,5 µgr/ml.

Se alicuota en eppendorfs y se guardan a -20°C hasta su utilización en los ensayos in vitro de proliferación celular.

1.5.5. Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) es suministrado por PeproTech (Referencia 100-15), en un vial de 100 µgr de EGF liofilizado y conservado a -20°C.

Se procede a su resuspensión centrifugando previamente el vial para su total aprovechamiento. Posteriormente, se resuspende en 1 ml de agua destilada resultando una concentración de 0,1 mgr/ml. A esta dilución se le añaden 4 ml de PBS, llegando así a la concentración final de stock de 20 µgr/ml.

Este stock se alicuota en eppendorfs y se almacena a -20°C hasta su utilización en las experiencias in vitro.

1.5.6. Ácido All Trans Retinoico (ATRA)

El Ácido All Trans Retinoico (ATRA) es suministrado por Sigma (R-2625) en frasco opaco con 1 gr de ATRA en polvo.

Para posteriores experiencias in vitro, se prepara un stock de ATRA 10^{-2} Molar. Para ello, se disuelven 0,03gr de ATRA (PM 300,44) en 10 ml de Etanol absoluto. Esta disolución se alícuota en eppendorfs que se almacenan a -20°C en oscuridad hasta la hora de ser utilizados. El ATRA cristaliza y precipita en estas condiciones por lo que es necesario atemperar estos eppendorfs en baño a 37°C hasta su completa resuspensión antes de ser utilizados en las experiencias.



Figura 22. Preparación del ATRA.

1.5.7. 5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-Fluorouracilo (5-FU) es suministrado por Sigma (F6627-5G). Para su posterior utilización en los ensayos in vitro, se disuelven 0,003 gr en 10 ml de medio RPMI-1640; a continuación se esteriliza la preparación mediante microfiltrado (filtros de $0,2\mu\text{m}$ Orange Scientific, 1520012), resultando una solución stock de 0,3 mgr/ml. Esta solución stock, se alícuota en eppendorfs y se almacena a -20°C .

2. EXPERIMENTOS IN VIVO

2.1. Animales utilizados

Los animales utilizados en la experimentación han sido ratas singénicas WAG/RijCrl machos de 8-10 semanas de edad (200-300g de peso).

Nuestra cepa es originaria de Harlam-Netherland, y ha sido expandida en el Estabulario de la UPV/EHU. Los animales, estabulados en grupos de cinco, se han mantenido en ritmo circadiano de 12 horas, con alimentación (PanLab A-04) y bebida "ad libitum". Estas ratas muestran un ritmo de crecimiento moderado, llegando a estabilizarse en la decimocuarta semana, en la que alcanzan un peso de 300g los machos y de 200g las hembras. La supervivencia no suele superar los 22 meses en los machos y los 31 meses en las hembras.

2.2. Técnicas quirúrgicas

2.2.1. Inoculación de células tumorales

Bajo anestesia con halotano (2%), el animal se coloca sobre la mesa de operaciones en decúbito supino. La piel se lava con alcohol con fines antisépticos y para humedecer el pelo de modo no interfiera en el acto quirúrgico. A continuación se practica una laparotomía media subxifoidea de 3cm de longitud. A través de la incisión se rechaza el paquete intestinal y se expone el bazo, apoyándolo con delicadeza sobre una gasa humedecida con suero fisiológico. Antes de la inoculación, se dispone una pequeña ligadura de seda 2/0 alrededor del polo esplénico en el que se va a realizar la punción, y no totalmente ceñida. Posteriormente se punciona la pulpa esplénica con una aguja de 25G, y se inocula lentamente la suspensión celular (250.000 células tumorales, vehiculizadas en 0,5 ml de solución de Hank). Una vez retirada la aguja, se taponan el orificio con esponja de fibrina y se ciñe la ligadura para evitar la diseminación de células en la cavidad peritoneal.

Transcurridos cinco minutos para permitir la diseminación tumoral hacia el hígado, se practica la esplenectomía. Para ello, se identifican los pedículos vasculares del bazo y se ligan de forma individualizada; a continuación se seccionan y se extrae el bazo. Finalmente, los muñones vasculares y el resto del paquete intestinal se devuelven a su ubicación originaria en el interior de la cavidad abdominal, y se procede al cierre de la incisión. Se realiza una sutura con puntos sueltos de seda de 3/0, en un plano.

2.2.2. Hepatectomía parcial

La hepatectomía del 40% se realiza 10 días después de la inoculación tumoral. Bajo anestesia con halotano, se practica una laparotomía media subxifoidea de unos 3 cm de longitud. A través de la incisión se extrae el lóbulo lateral izquierdo, se seccionan los repliegues peritoneales que le unen al lóbulo mediano y al caudado, y se liga por su base con una hebra de Catgut 2/0. Esta maniobra debe ser especialmente cuidadosa. Una ligadura demasiado baja reduce el porcentaje de hepatectomía realizado. Por el contrario, si es excesivamente alta se pueden comprimir los vasos supra-hepáticos, comprometiendo su drenaje y provocando una insuficiencia hepática aguda. Una correcta ligadura permite, al mismo tiempo, una adecuada hemostasia.

Concluida la resección hepática, se procede al cierre de la laparotomía mediante puntos sueltos de seda 3/0, en un solo plano.

2.2.3. Obtención de suero de rata

Bajo anestesia con Halotano, se practica una laparotomía media amplia, y se extrae el paquete intestinal fuera de la cavidad peritoneal. Mediante disección roma del retroperitoneo, se expone la aorta infrarenal, que se canula con una aguja de 23G. Mediante aspiración lenta se obtienen 5 ml de sangre. Concluida la extracción de sangre, se procede a la eutanasia del animal.

La sangre obtenida se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos tras los cuales, mediante una pipeta se recoge el sobrenadante (suero). Este suero se filtra en campana, en condiciones estériles, y se almacena en alícuotas de 1 ml a -20°C.

2.2.4. Eutanasia de los animales

Bajo anestesia profunda con Halotano (4%), se practica una luxación cervical alta.

2.3. Recuento de focos metastáticos y supervivencia

Una vez sacrificado el animal, se extrae el hígado completo y se individualizan los lóbulos. Sobre cada uno de ellos se practican secciones seriadas de 3 mm de espesor. Un observador independiente ha llevado a cabo el recuento de metástasis, sobre dichas secciones, discriminando 3 tamaños diferentes: menos de 1 mm, entre 1 y 3 mm, y más de 3 mm.

Para el estudio de supervivencia se ha realizado un seguimiento diario de los animales, sacrificándolos cuando la pérdida ponderal superaba el 20%.

2.4. Fármacos utilizados

2.4.1. Ácido All Trans Retinoico (ATRA)

El ATRA se ha administrado a los animales en dosis diarias de 5 mg/kg i.p. Para ello, el fármaco se disuelve primero en alcohol absoluto, y a continuación en un preparado lipídico (ClinOleic) a 60°C, obteniéndose una disolución final de 2 mg de ATRA por ml de solvente (Alcohol 10% / ClinOleic 90%).

Los tratamientos se han iniciado tres días antes de practicar la resección hepática (día 7), y se han prolongado durante dos semanas (hasta el día 21).

2.4.2. 5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-FU se ha disuelto en suero fisiológico alcalinizado, administrándose en dosis de 50 mg/k o 100 mg/k.

El tratamiento ha supuesto la administración de una dosis semanal por vía intraperitoneal, comenzando tres días después de la resección hepática (día 13), y prolongándose durante tres semanas (días 13, 20 y 27).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados, dependiendo de las variables a analizar, se ha realizado mediante análisis de la varianza (ANOVA), t de Student y análisis de las curvas de supervivencia por Kaplan-Meier. Para ello se ha utilizado el programa informático GraphPad (Prism®).

3.1. Comparaciones entre dos grupos

En estos casos, una vez comprobado que los resultados obtenidos se ajustan a una distribución normal, se utilizó la T de Student para estudiar la significación de las diferencias observadas. Se han aceptado como significativas aquellas diferencias que mostraron una $p < 0.05$.

3.2. Comparación entre tres o más grupos

En estos casos, comprobada la normalidad de nuestros resultados, se procedió a realizar una ANOVA de 1 vía. En aquellos casos en los que este test demostró la existencia de diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$), se procedió a realizar comparaciones dos a dos mediante el test de Newman-Keuls.

3.3. Estudios de Supervivencia

Los estudios de supervivencia se han valorado mediante el test de Kaplan Meier. Se han aceptado como significativas diferencias con $p < 0.05$.

HIPÓTESIS

Justificación del trabajo

El cáncer colorrectal es una de las principales causas de mortalidad por cáncer en los países desarrollados y cuya incidencia va en aumento en los últimos años.

El hígado es un lugar muy habitual de metástasis, especialmente en el caso del cáncer colo-rectal. La cirugía de resección practicada sobre estas metástasis es, hoy por hoy, una técnica estándar de utilidad innegable. Sin embargo, la tasa de recidivas sigue siendo muy elevada, debido a la persistencia de microfocos en el parénquima hepático respetado. De hecho, se postula que los mejores resultados obtenidos en las resecciones anatómicas se deben a la eliminación de esos focos tumorales no detectables que pueden encontrarse en la relativa vecindad de la o las metástasis macroscópicas a reseñar.

Este hecho recalca la importancia que pueden llegar a tener los factores de crecimiento liberados por la hepatectomía en la aparición de recidivas. Existen numerosas evidencias de la sensibilidad (al menos in vitro) de muchas estirpes tumorales a diversos factores de crecimiento: factor de crecimiento hepatocitario (HGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), etc. Estudios en animales de experimentación implican al EGF, el VEGF y el IGF en la progresión de las metástasis hepáticas del cáncer colo-rectal.

La existencia de células tumorales residuales en el hígado remanente tras cirugía de metástasis, y su más que probable sensibilidad frente a los factores de crecimiento liberados por la cirugía y la resección hepática, llevan a plantear el interés por diseñar estrategias terapéuticas que contribuyan a reducir la tasa de recidivas tras la cirugía.

Basándonos en la hipótesis de que la sensibilidad de estas células tumorales a los factores de crecimiento se debe a su dediferenciación, planteamos ensayar el tratamiento con un agente promotor de la diferenciación celular, como es el ácido retinoico (ATRA) y un antimetabolito como es el 5-Fluorouracilo (5-FU).

Hipótesis de trabajo

Los resultados obtenidos en clínica sobre el control de la proliferación de metástasis hepáticas por adenocarcinoma de colon tras resección parcial del hígado no son del todo satisfactorios. Además de que la quimioterapia actual no es plenamente eficaz en todos los casos y de que no todos los tipos de cáncer responden de igual manera a los tratamientos, los factores de crecimiento liberados tras la cirugía pueden ser responsables de buena parte de los fracasos del tratamiento quirúrgico.

El Ácido All Trans Retinoico (ATRA), en su calidad de agente promotor de la diferenciación celular, debería reducir la sensibilidad de las células tumorales residuales a los estímulos generados por la cirugía de resección; y ello, sin reducir la eficacia de la quimioterapia convencional.

Para comprobar esta hipótesis, se plantea un estudio combinado “in vitro” e “in vivo” en un modelo de experimentación animal en el que se reproduzcan las condiciones clínicas: metástasis hepáticas por adenocarcinoma de colon y hepatectomía parcial. Deberían poderse comprobar los siguientes puntos:

1. La resección parcial del hígado sembrado con células de adenocarcinoma de colon origina un incremento tanto de la velocidad de crecimiento de los focos metastásicos como de su número total.
2. El tratamiento perioperatorio de los animales con Acido Retinoico (ATRA) reduce el estímulo ejercido por la hepatectomía.
3. La proliferación en cultivo de las células de adenocarcinoma de colon se ve incrementada al añadir Factores de Crecimiento al medio.

4. En cultivos celulares de adenocarcinoma de colon el ATRA bloquea el estímulo ejercido por los Factores de Crecimiento.

5. El ATRA no condiciona negativamente la actividad del 5-FU frente a los cultivos de células de adenocarcinoma de colon.

RESULTADOS

Este capítulo de Resultados se divide en dos grandes secciones. En la primera se presentan los resultados de nuestros estudios “in vitro” con la línea celular CC-531. La segunda sección de este capítulo recoge los experimentos llevados a cabo “in vivo” con ratas singénicas respecto a la línea celular CC-531.

1. Estudios “in vitro”

Centrándonos en la primera sección, abordamos sucesivamente las diferentes hipótesis planteadas para el estudio. En primer lugar, la capacidad de las células CC-531 para responder al estímulo del suero de rata y de los factores de crecimiento; a continuación, el efecto del ATRA sobre estos cultivos (estimulados o no con FC); en tercer lugar, el efecto del 5-FU sobre dichos cultivos; y por último los resultados del tratamiento de los cultivos con ATRA y 5-FU.

Por lo tanto, tenemos un primer apartado de experiencias que analizan el efecto de diversas concentraciones de suero de rata sobre las células cultivadas. A continuación, se sustituye el suero de rata normal por el obtenido a partir de ratas sometidas a hepatectomía del 40% (por ello, rico en FC). Por último, en este apartado se incluyen las experiencias de estimulación de los cultivos con diversos factores de crecimiento.

El segundo apartado de esta primera sección recoge las experiencias llevadas a cabo con ATRA, tanto sobre cultivos estándar, como sobre cultivos estimulados con suero de rata (normal o hepatectomizada) y factores de crecimiento.

El tercer apartado recoge los resultados del tratamiento de los cultivos con un quimioterápico convencional en el tratamiento de las metástasis hepáticas del cáncer de colon: el 5 Fluor-Uracilo (5-FU). Se incluyen tanto cultivos en condiciones estándar como cultivos estimulados con suero procedente de animales sometidos a resección parcial del hígado (por tanto ricos en numerosos factores de crecimiento) o con factores de crecimiento aislados.

Por último, un cuarto apartado contempla los resultados obtenidos al tratar con ATRA los diferentes cultivos ensayados en el apartado anterior.

1.1. Efecto del suero de rata sobre cultivos de ACC-531

Tal y como acabamos de indicar, en este primer apartado de resultados de nuestros estudios “in vitro” vamos a proceder a reseñar las experiencias realizadas para valorar el efecto que sobre las células CC-531 ejerce el suero obtenido a partir de ratas previamente hepatectomizadas, así como de algunos factores de crecimiento con probada actividad hepatotrófica.

1.1.1. Proliferación “in vitro” con suero de rata normal

Un paso previo al inicio de esta serie de experimentos, fue determinar la concentración óptima de **suero bobino fetal** (SFB) para el crecimiento de las células de Adenocarcinoma de Colon (ACC-531). Para ello realizamos cuatro cultivos con concentraciones decrecientes de SFB: 20%, 15%, 10% y 5%. Cada 24 horas se realizó un recuento de células mediante hemocitómetro, obteniéndose las cifras que se detallan en la tabla 24.

Tabla 24. N° de células por concentración de SFB (5%, 10%, 15% y 20%).

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
SFB 5 %	30.556	66.519	191.296	206.444
SFB 10%	30.556	67.407	202.407	384.667
SFB 15%	30.556	89.185	240.185	405.556
SFB 20%	30.556	77.185	226.481	408.667

La representación gráfica de dichos resultados (fig.23) muestra claramente un aplanamiento de la curva a las 48 horas en las células cultivadas con SFB 5%; de tal manera que a las 72 horas nos encontramos con que la concentración de células en cultivo no alcanza el 50% de lo obtenido (46,51%) con concentraciones superiores de SFB (ANOVA $p > 0,0001$).

Por otra parte, la concentración del 10% no muestra diferencias significativas frente al 20% recomendado por la casa (“Newman-Keuls Multiple Comparison Test”, $p > 0,05$).

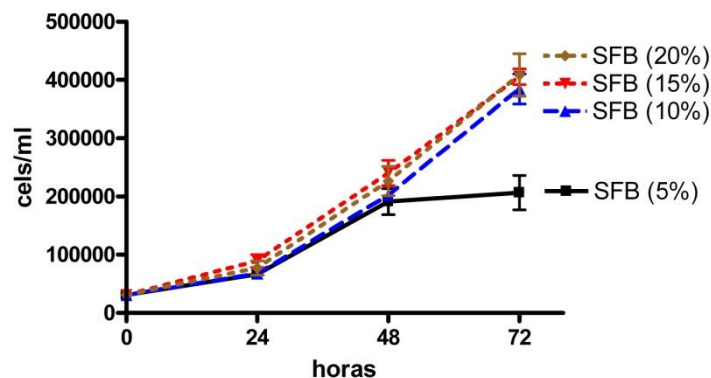


Figura 23. Proliferación celular de ACC-531 con medios enriquecidos con SFB 5%, 10%, 15% y 20% .

De manera similar, se ha estudiado el comportamiento de las células al suplementar los cultivos con **suero de rata normal** (SRN), en sustitución del SFB. Para ello, se realizó un barrido de concentraciones desde 20% hasta 5% (Fig. 24.).

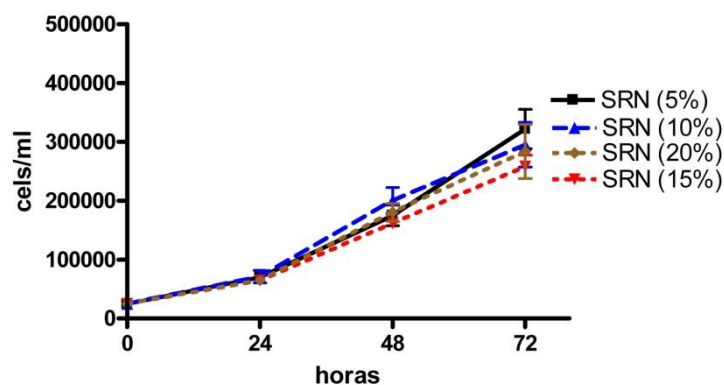


Figura 24. Proliferación celular con medios enriquecidos con SRN al 5%, 10%, 15% y 20%.

En esta gráfica se ve como el crecimiento de las células en cultivo no parece modificarse significativamente al variar las concentraciones de SRN, ya que las cuatro curvas se superponen y entrecruzan.

El estudio estadístico realizado comparando los resultados a las 48 horas y 72 horas mediante ANOVA confirma esa impresión al aportar una $p = 0,43$ y $p = 0,65$, respectivamente (tabla 25.).

Tabla 25. N° de células por concentración de SRN al 5%, 10%, 15% y 20%.

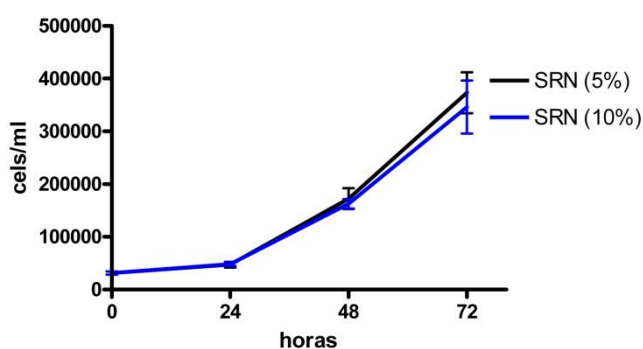
	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
SRN 5 %	25.111	70.222	175.370	322.000
SRN 10%	25.111	71.259	200.741	295.333
SRN 15%	25.111	64.296	162.037	258.000
SRN 20%	25.111	64.593	180.556	284.000

De todas formas, viendo que el mejor resultado se habría obtenido con SRN 5% se repitió la experiencia utilizando únicamente concentraciones de 5% y 10% de SRN. Los resultados obtenidos en este experimento se detallan en la tabla 26.

Tabla 26. N° de células por concentración de SRN 5% y 10%.

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
SRN 5 %	31.333	47.111	172.407	373.333
SRN 10%	31.333	48.296	162.593	346.222

Tal y como se puede observar en la figura 25, las dos curvas son muy similares, sin que existan diferencias significativas en ningún momento del estudio. Ahora bien, de nuevo en este experimento el cultivo con SRN 5% obtiene valores ligeramente superiores al de 10% ($p=0,34$).

**Figura 25.** Proliferación celular de ACC-531 con SRN al 5% y 10%.

Por último, se realizó un experimento en el que se comparó el efecto de SBF 10% frente a SRN 5%. Durante las primeras 48 horas de cultivo no se apreciaron diferencias entre los dos grupos (tabla 27). Sin embargo, a las 72 horas se manifestó una clara superioridad del

SRN 5% (214.333 ± 59.283) frente al SBF 10% (169.000 ± 30.876). Sin embargo, esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p=0,11$).

Tabla 27. N° de células por concentración de SRN 5% y SFB 10%.

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
SRN 5 %	16.667	33.778	136.111	214.333
SFB 10%	16.667	44.000	133.611	169.000

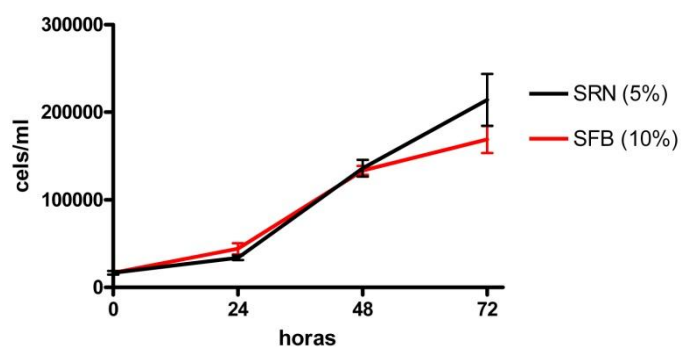


Figura 26. Proliferación celular de ACC-531 enfrentando Suero Fetal Bovino y Suero de Rata Normal.

A la vista de estos resultados, se decidió adoptar para el estudio la concentración de 5% de SRN, que –por otra parte– produce un efecto sobre el cultivo similar al del SBF 10%.

1.1.2. Proliferación “in vitro” con suero de rata hepatectomizada (SRH)

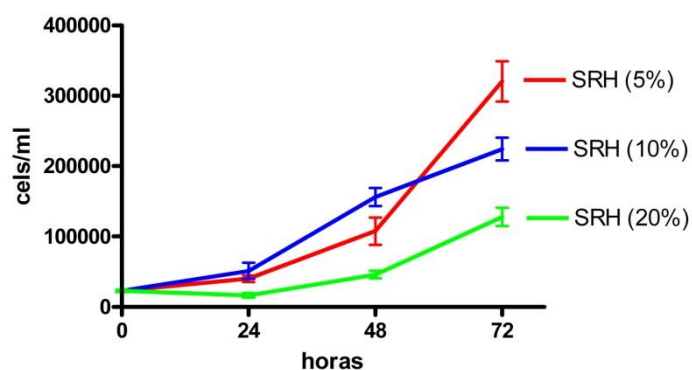
Con el fin de hallar la concentración de suero óptima para el cultivo, se realizó una experiencia enfrentando una serie de concentraciones de suero de rata hepatectomizada (20%, 10% y 5%). El recuento celular se realizó mediante la técnica de hemocitómetro.

Tal y como podemos ver en la figura 27, las células cultivadas con un 20% de SRH crecieron mucho más lentamente que aquellas cultivadas con concentraciones menores de SRH ($p<0,001$).

Si nos fijamos ahora en los otros dos cultivos, veremos que en las primeras 48h las células cultivadas con un 10% de SRH crecen más deprisa que las que lo hicieron con sólo un 5%, alcanzando cifras de recuento celular significativamente superiores ($p<0,05$; tabla 28).

Tabla 28. Nº de células por concentración de SRH 5%, 10% y 20%.

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
SRH (5%)	22.833	40.185	107.778	320.444
SRH (10%)	22.833	51.296	156.296	224.222
SRH (20%)	22.833	16.481	45.926	127.778

**Figura 27.** Proliferación celular con medios enriquecidos con SRH al 5%, 10% y 20%.

Sin embargo, en las últimas 24 h, los cultivos con un 5% de SRH presentaron un ritmo de proliferación muy superior, alcanzando unos recuentos un 45% superiores a los cultivos con 10% de SRH ($p < 0,01$).

Con el fin de confirmar los resultados anteriores, se repitió la experiencia comparando las concentraciones de 5% y 10%. En esta nueva experiencia los cultivos con SRH 5% mostraron un crecimiento más rápido que los de SRH 10% a todo lo largo del estudio (fig. 28 y tabla 29); sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significación estadística (48h: $p = 0,052$; 72h: $p = 0,22$).

Tabla 29. Nº de células por concentración de SRH (5% y 10%).

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
SRH (5%)	14.222	25.556	113.889	248.333
SRH (10%)	14.222	15.333	71.667	212.667

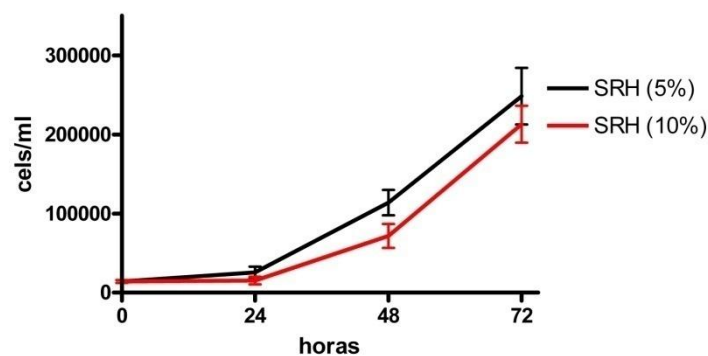


Figura 28. Proliferación celular: SRH 5% vs SRH 10%

Dado que en las dos experiencias que acabamos de describir el resultado fue similar (con el SRH 5% mostrando mayor proliferación que el SRH 10%), pero el tamaño muestral no permitió extraer conclusiones definitivas, se repitieron las experiencias, pero utilizando placas de 96 pocillos (que permiten un mayor número de muestras) y sustituyendo el recuento manual con hemocitómetro por cuantificación mediante la técnica de MTT. Se analizó el efecto de concentraciones decrecientes de SRH, desde 15% hasta 5%.

Los cuatro tipos de cultivos presentaron ritmos de proliferación muy similares durante las primeras 48 horas. Llama la atención, sin embargo, que tras las primeras 24 horas de cultivo se aprecia casi una relación inversa entre concentración de SRH y tasa de proliferación (ANOVA, $p < 0,0001$). Por el contrario, durante las últimas 24 horas de estudio se aprecia una disminución en el número de células presentes en los cultivos, siendo más intensa la caída cuanto mayor es la concentración de SRH (ANOVA, $p < 0,0001$). Así, el mejor resultado final se obtuvo con SRH 5%.

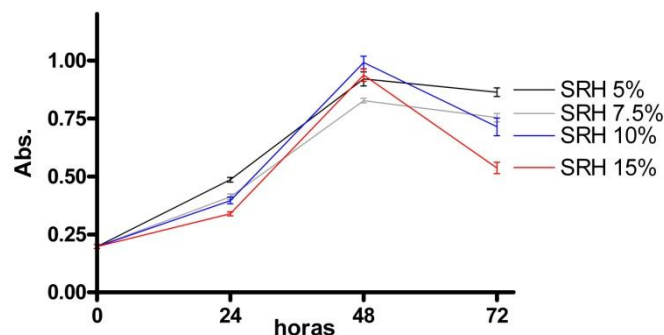
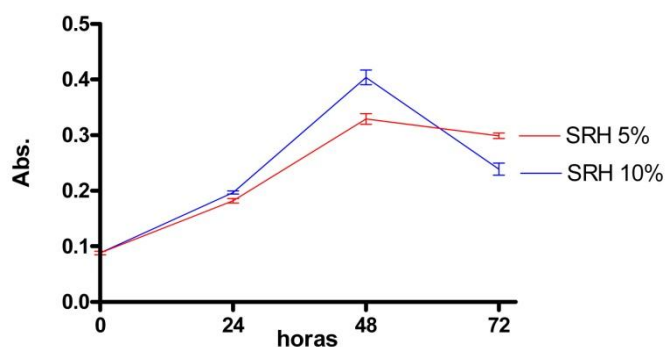


Figura 29. Proliferación celular con SRH 5%, 7,5%, 10% y 15%.

Tabla 30. Absorbancia de los pocillos con SRH 5%, 7,5%, 10% y 15%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRH 5%	0,1975	0,4853	0,9203	0,8628
SRH 7,5%	0,1975	0,4120	0,8263	0,7533
SRH 10%	0,1975	0,3960	0,9903	0,7135
SRH 15%	0,1975	0,3388	0,9363	0,5358

Esta caída en los recuentos celulares de los cultivos durante las 24 horas finales del estudio no se había producido en ninguna de las experiencias previas, realizadas sobre placas de 24 pocillos. Por ello, y con intención de corroborar las observaciones descritas en los párrafos precedentes, se repitió el estudio, enfrentando únicamente las concentraciones de 5% y 10% de SRH (Fig. 30).

**Figura 30.** Proliferación celular con SRH: 5% vs 10% (cuantificado mediante MTT).**Tabla 31.** Absorbancia de los pocillos con SRH 5% y 10%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRH 5%	0,088	0,182	0,329	0,299
SRH 10%	0,088	0,197	0,404	0,239

El comportamiento de los cultivos resultó prácticamente idéntico al de la experiencia previa. Así, tras 48h los mejores resultados se obtienen con SRH 10% ($p=0,0024$), momento a partir del cual se inicia un descenso en el número de células presentes en los cultivos; este descenso es más acusado en los cultivos con SRH 10%, por lo que, de nuevo, el resultado final con SRH 5% es superior al de SRH 10% ($p=0,0006$).

La persistencia del pico a las 48 horas, seguido de un descenso del número de células obligó a realizar una serie de experiencias para descartar que fueran errores técnicos los responsables de dicho comportamiento anómalo. (Fig. 31)

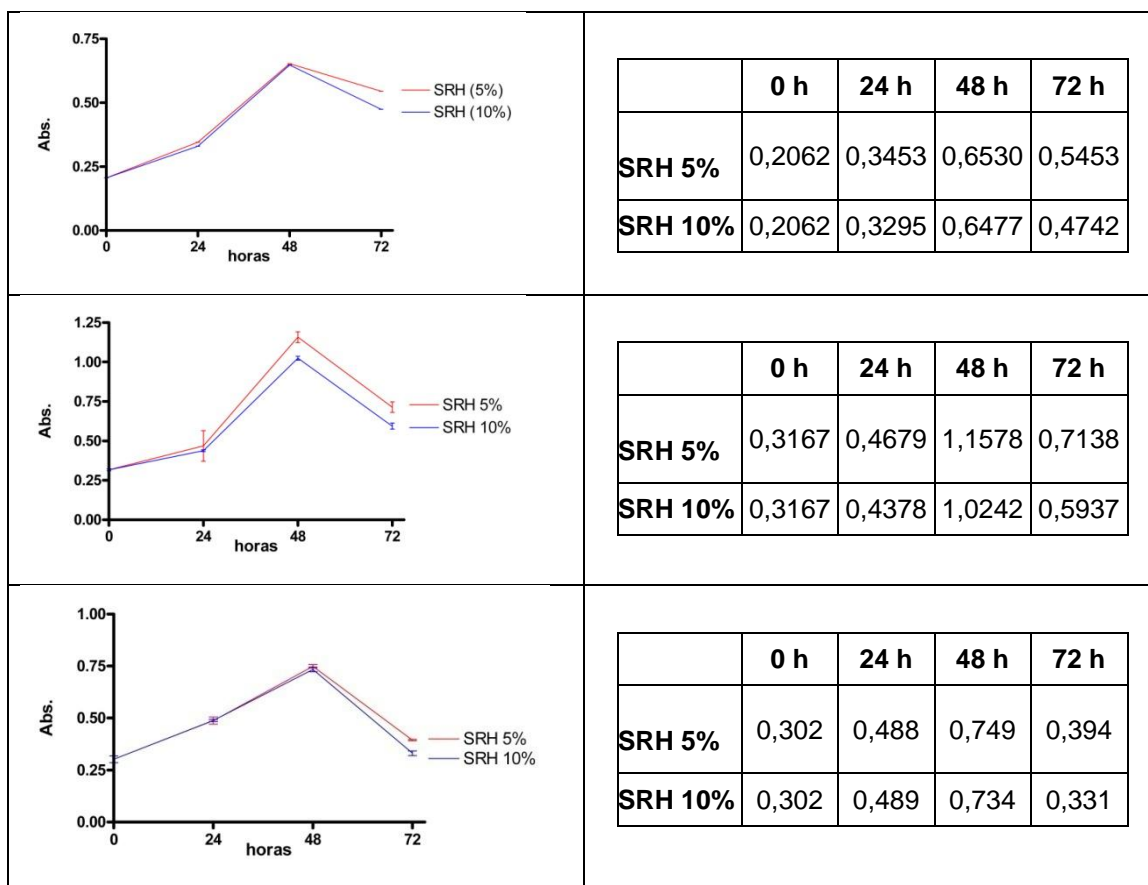


Figura 31. Proliferación celular con SRH: 5% vs 10% (cuantificado mediante MTT).

La persistencia en la caída de valores a partir de las 48 horas sugirió una saturación celular de los pocillos, por lo que se decidió ensayar con concentraciones menores de SRH, buscando aportar estímulos más bajos a los cultivos.

Así, se realizó una curva de proliferación con concentraciones de SRH de 2,5%, 1% y 0,5% (fig. 32). En esta experiencia se observó cómo los cultivos realizados con un 2,5% de SRH seguían presentando el pico a las 48h, seguido de una discreta disminución del número de células en los pocillos. En cambio, con concentraciones del 1% y 0,5% se produce un crecimiento constante a lo largo de los tres días del experimento. En las primeras 24 h no hay diferencia apreciable entre ambas concentraciones, pero a las 48 h se aprecia claramente que las células cultivadas con tan sólo un 0,5% de SRH crecen más despacio (tabla 32; $p > 0,05$), siendo la diferencia mucho más acusada a las 72 h, ya que se aprecia una reducción del 30% ($p < 0,001$).

Por último, hay que destacar que las células cultivadas con 1% de SRH, al final de la experiencia igualan las cifras de células que se encuentran en los cultivos realizados con un 2,5% de SRH.

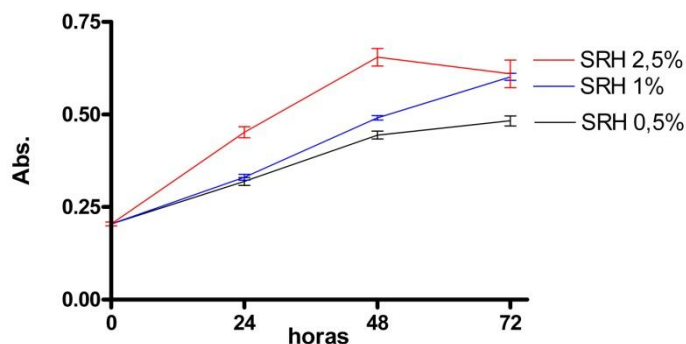


Figura 32. Cultivos con Suero de Rata Hepatectomizada: 2,5%, 1% y 0,5%.

Tabla 32. Absorbancia de los pocillos con concentraciones de SRH 2,5%, 1% y 0,5%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRH 0,5%	0,2042	0,3191	0,4442	0,4827
SRH 1%	0,2042	0,3303	0,4908	0,6013
SRH 2,5%	0,2042	0,4521	0,6547	0,6097

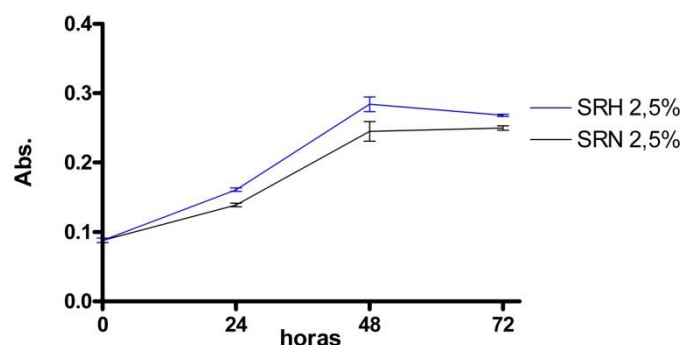
1.1.3. Comparación entre el suero de rata hepatectomizada (SRH) y de rata normal (SRN)

Para comprobar si existe en el suero de la rata hepatectomizada alguna molécula con efecto estimulador de la proliferación de células tumorales realizamos ensayos en los que se enfrentaron concentraciones idénticas de suero de rata normal y hepatectomizada. Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos y mediciones mediante MTT, por lo que se utilizaron aquellas concentraciones de SRH que no provocaron saturación del cultivo a las 48h.

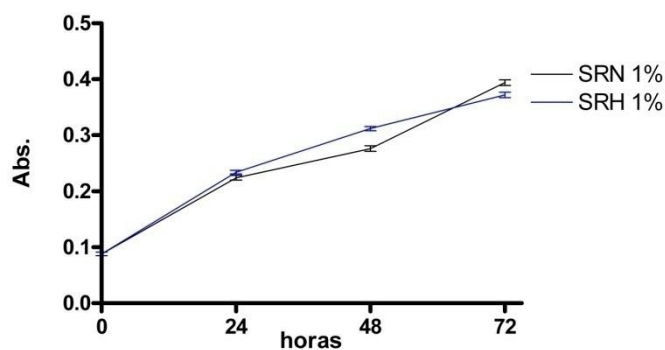
En primer lugar, veremos los resultados obtenidos en cultivos enriquecidos con 2,5% de suero de rata. En la figura 33 se aprecia con nitidez que los cultivos enriquecidos con SRH proliferaron a un ritmo significativamente mayor que aquellos en los que se añadió suero de rata normal a la misma concentración.

Tabla 33. Absorbancia de los pocillos. SRN y SRH al 2,5%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN 2,5%	0,088	0,139	0,245	0,250
SRH 2,5%	0,088	0,161	0,284	0,268
Valor de <i>p</i>	---	<0,0001	0,0513	0,0005

**Figura 33.** Cultivos enriquecidos con SRN y SRH al 2,5%.

En cambio, al reducir la concentración de suero de rata a sólo un 1% ya no se aprecia la mayor efectividad promotora de proliferación del SRH. Si bien a las 48 h el recuento celular es más alto en los cultivos suplementados con SRH que en los que recibieron SRN (tabla 34; $p < 0,01$), al finalizar el experimento esa superioridad se desdibuja por completo (fig. 34).

**Figura 34.** Cultivos enriquecidos con SRN y SRH al 1%.**Tabla 34.** Absorbancia de los pocillos por concentración de suero y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN 1%	0,088	0,224	0,276	0,394
SRH 1%	0,088	0,234	0,312	0,372
Valor de <i>p</i>	---	<i>ns</i>	0,0001	0,0079

Por último, fijémonos en lo ocurrido al reducir la concentración de suero de rata en el medio de cultivo a cifras tan bajas como un 0,5% (fig. 35). Como cabe esperar, el ritmo de proliferación (la pendiente de las curvas) se reduce sensiblemente. Pero, dentro de ese menor ritmo, los cultivos enriquecidos con SRH muestran un comportamiento claramente mejor que aquellos que recibieron SRN, siendo estas diferencias significativas en todos los momentos del estudio (tabla 35).

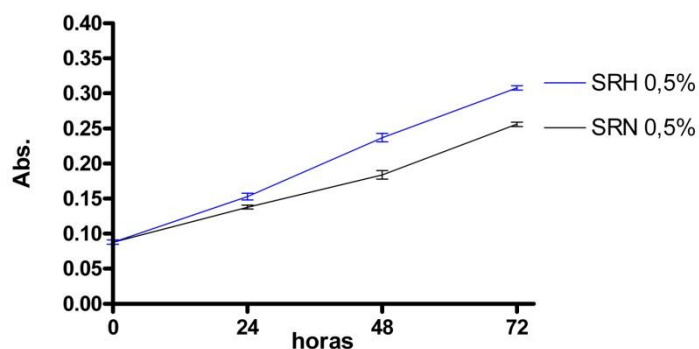


Figura 35. Cultivos enriquecidos con SRN y SRH al 0,5%.

Tabla 35. Valores de absorbancia de los pocillos por concentración de suero y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN 0,5%	0,088	0,138	0,184	0,256
SRH 0,5%	0,088	0,153	0,237	0,308
<i>Valor de p</i>	---	0,0222	0,0001	$P < 0.0001$

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos, se repitieron las experiencias pero utilizando para el recuento celular un microscopio de fluorescencia automatizado (NucleoCounter) y un equipo que utiliza las microvariaciones en la resistencia eléctrica del cultivo para realizar recuentos celulares seriados “in vivo” en los cultivos (xCELLigence).

En la figura 36 se representan los resultados obtenidos mediante Nucleocounter en cultivos enriquecidos con suero de rata al 2,5%. Se aprecia como el SRH induce una proliferación más intensa que el SRN.

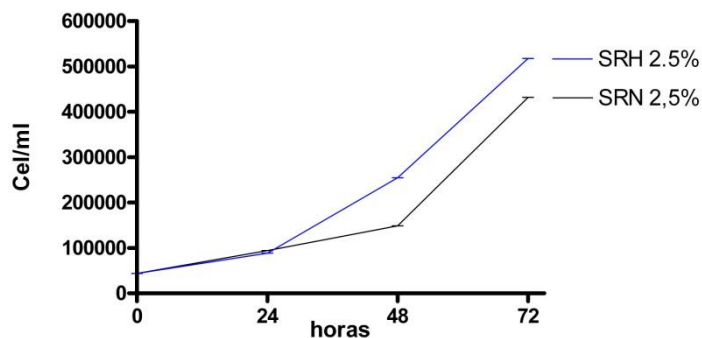


Figura 36. Recuento celular mediante NucleoCounter de cultivos enriquecidos con SRN y SRH al 2,5%.

Tabla 36. Nº de células por ml. Medios enriquecidos con SRN y SRH al 2,5%.

	Cel/ml			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
SRN 2,5%	43.500	94.050	148.950	432.000
SRH 2,5%	43.500	88.650	254.700	517.800

Por otra parte, el ensayo realizado con concentraciones de suero del 1% mostró un resultado similar al obtenido en las experiencias valoradas mediante MTT: no existen diferencias apreciables entre los cultivos enriquecidos con SRH y los suplementados con SRN.

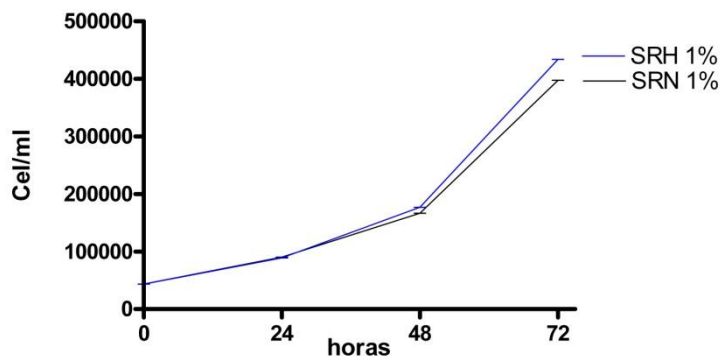


Figura 37. Proliferación celular de ACC-531 enfrentando las concentraciones de SRN y SRH al 1%.

Tabla 37. Nº de células por ml en función de la concentración de suero y tiempo.

	Cel/ml			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
SRN 1%	43.500	90.450	166.950	397.800
SRH 1%	43.500	89.550	177.300	433.800

Por último, recogemos los resultados del estudio realizado mediante el equipo de medición in vivo (xCELLigence). En la figura 38 se recogen las mediciones realizadas de manera continua a lo largo de 120 horas. Sin embargo, los resultados más significativos son los que reflejan los cambios acontecidos en los cultivos durante las primeras 72 horas, antes de que algunos de ellos alcancen confluencia y saturen los pocillos de cultivo. Las dos curvas superiores reflejan el comportamiento de los cultivos suplementados con un 2,5% de suero de rata; se aprecia como en todo momento el cultivo on SRH se sitúa por encima del de SRN. Algo muy similar ocurre con los cultivos suplementados con un 0,5%, si bien aquí la diferencia es mucho más acusada a favor del SRH.

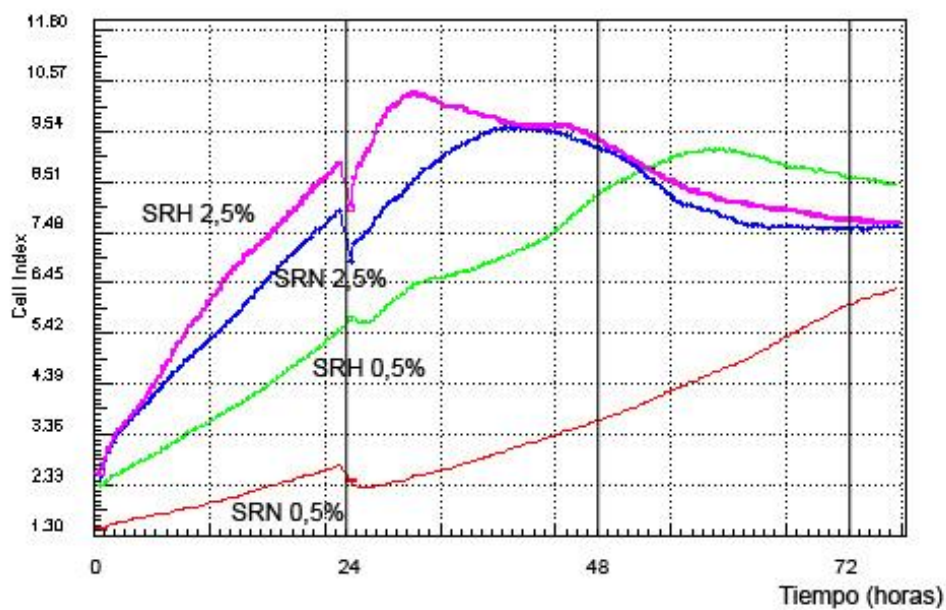


Figura 38. Proliferación celular de ACC-531. SRN y SRH al 2,5% y 0,5%.

1.2. Efecto de los factores de crecimiento sobre las células tumorales

Una vez constatado que en el suero de ratas sometidas a resección parcial del hígado existen sustancias con capacidad de estimular el crecimiento tumoral, procedimos a probar una serie de factores de crecimiento. Con el fin de dejar más margen para apreciar posibles efectos protumorales de los factores de crecimiento, se redujo el contenido de suero (SRN) hasta el 0,5%.

1.2.1. Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF)

Se realizó un estudio con diferentes concentraciones de HGF (5; 7,5; 10; 15 y 20 ngr/ml) sobre cultivos con un 0,5% de SRN. Durante las primeras 48 horas apenas se aprecian diferencias entre los cultivos suplementados con HGF y los controles (fig. 39). Sin embargo, tras 72 horas, todos los cultivos enriquecidos con HGF presentaron concentraciones de células superiores al control (ANOVA, $p < 0,0001$), si bien las concentraciones de 5 ngr/ml y 20 ngr/ml se comportaban peor (tabla 38; $p < 0,05$).

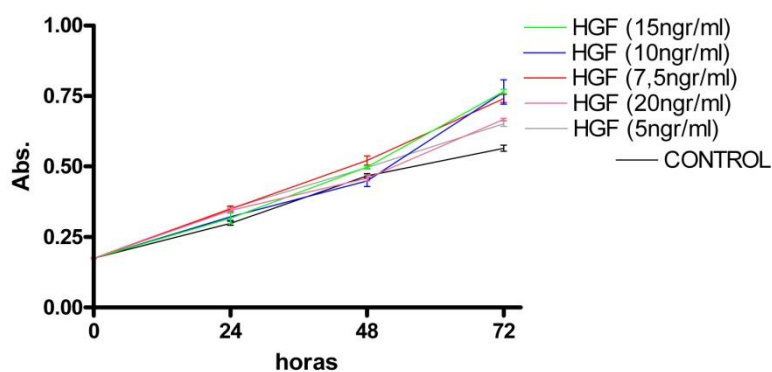
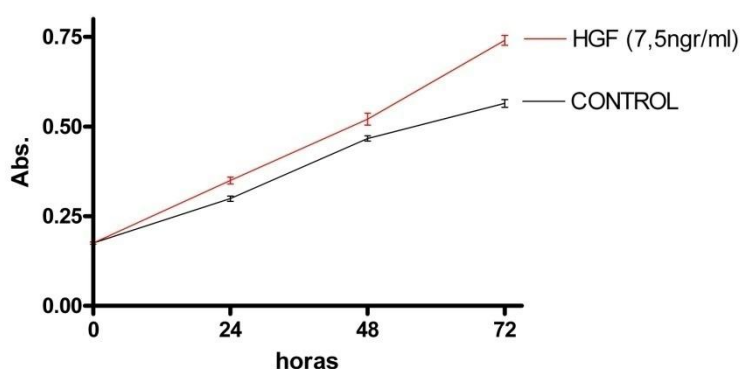


Figura 39. Proliferación celular en respuesta al HGF 5; 7,5; 10; 15 y 20 ngr/ml.

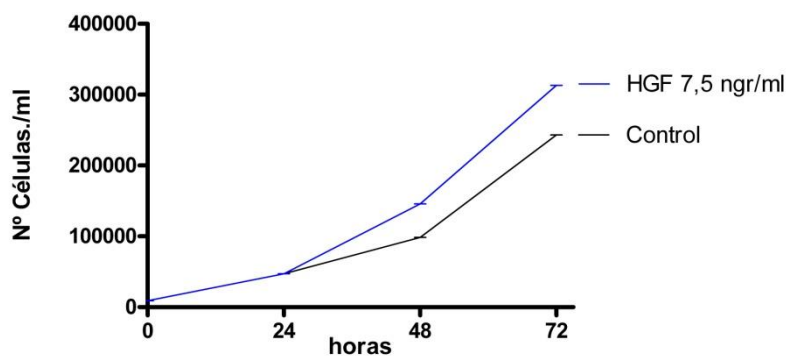
De las tres concentraciones que presentaron mejor comportamiento a las 72 h, la de 7,5 ngr/ml es la que alcanzó las mejores cifras también a las 24 h y a las 48 h, por lo que se consideró como la concentración óptima para el HGF. Las diferencias entre los cultivos enriquecidos con HGF al 7,5 ngr/ml y los controles (fig. 40) alcanzaron significación estadística en todos los momentos del estudio (tabla 38).

Tabla 38. Absorbancia de los pocillos por concentración de HGF y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,175	0,299	0,467	0,565
HGF 5 ngr/ml	0,175	0,351	0,496	0,652
HGF 7,5 ngr/ml	0,175	0,350	0,521	0,741
HGF 10 ngr/ml	0,175	0,322	0,449	0,764
HGF 15 ngr/ml	0,175	0,317	0,498	0,766
HGF 20 ngr/ml	0,175	0,345	0,459	0,667
<i>p (ctrol vs 7,5ng/ml)</i>	-----	< 0,05	< 0,05	< 0,001

**Figura 40.** Proliferación celular en respuesta al HGF 7,5 ngr/ml

Se optó por repetir la experiencia anterior y realizar la cuantificación del número de células mediante el uso del NucleoCounter (fig.41).

**Figura 41.** Proliferación celular en respuesta al HGF 7,5 ngr/ml

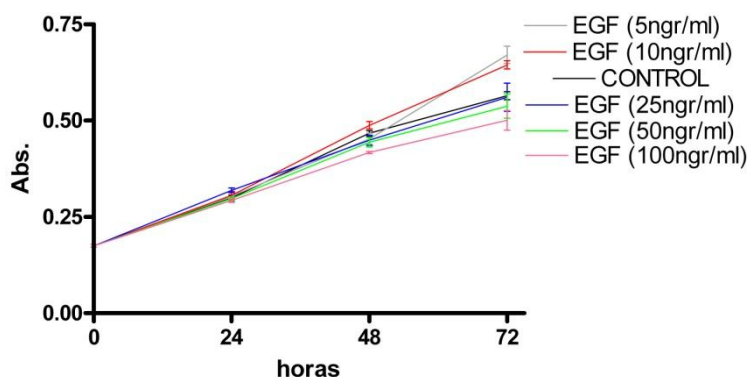
El estudio al NucleoCounter mostró un efecto potenciador de la proliferación de las células de ACC-531 observable a partir de las 24 primeras horas de exposición al HGF (tabla 39)

Tabla 39. Número de células por ml en respuesta al HGF 7,5ngr/ml.

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	9.000	47.250	98.550	243.000
HGF (7,5ngr/ml)	9.000	47.250	145.800	313.200

1.2.2. Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

Para valorar el efecto protumoral del EGF se realizó un estudio seriado con concentraciones crecientes de factor de crecimiento, desde los 5 ng/ml hasta 100 ng/ml (fig. 42). De nuevo es difícil apreciar diferencias durante las primeras 48 horas, pero al finalizar el experimento se comprobó que las concentraciones más elevadas de EGF (25, 50 y 100 ng/ml) no mejoraron los resultados obtenidos con el grupo control; incluso con 100 ng/ml se obtuvieron cifras claramente inferiores a las del control (0,501 vs 0,565; $p=0,03$).

**Figura 42.** Proliferación celular en respuesta al EGF 5, 10, 25; 50 y 100 ngr/ml.**Tabla 40.** Absorbancia de los pocillos por concentración de EGF y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,175	0,299	0,467	0,565
EGF 5 ngr/ml	0,175	0,304	0,453	0,671
EGF 10 ngr/ml	0,175	0,306	0,488	0,645
EGF 25 ngr/ml	0,175	0,319	0,449	0,561
EGF 50 ngr/ml	0,175	0,297	0,444	0,538
EGF 100 ngr/ml	0,175	0,293	0,417	0,501

En cambio, con concentraciones de 5 y 10 ng/ml, a las 72 horas se aprecian recuentos celulares significativamente superiores a los obtenidos en el grupo control ($p < 0,05$).

Si estudiamos separadamente estos dos grupos (fig. 43) vemos como las tres líneas que representan el número de células en los pocillos de cultivo prácticamente se superponen, con una variabilidad escasísima en los resultados individuales de cada experiencia. En cambio, a las 72 horas el ritmo de crecimiento en los cultivos con EGF mejora sensiblemente.

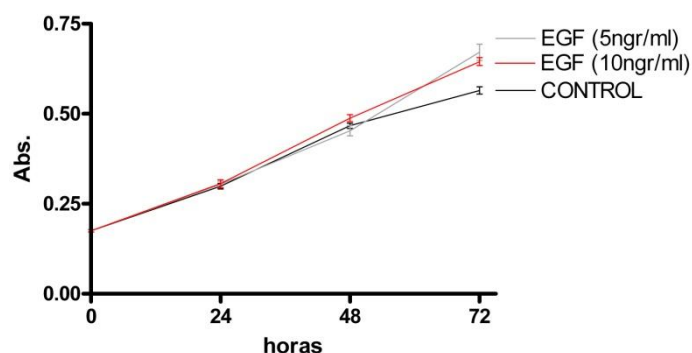


Figura 43. Proliferación celular en respuesta a las concentraciones 5 y 10ng/ml de EGF.

1.2.3. Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)

Como con los factores anteriores, en primer lugar se realiza un barrido de concentraciones sobre cultivos con un 0,5% de SRN (5; 10; 20; 30 y 40 ngr/ml). De nuevo durante las primeras 48 h las líneas de la gráfica se superponen y/o entrecruzan sin manifestar ningún efecto definido por parte del PDGF (fig. 44). En cambio, a las 72 h todos los cultivos suplementados con PDGF presentan cifras de recuento celular superiores a los controles (tabla 41), si bien el excesivo número de grupos, a pesar de una variabilidad intragrupo escasa, hace que el análisis con ANOVA no muestre significación estadística.

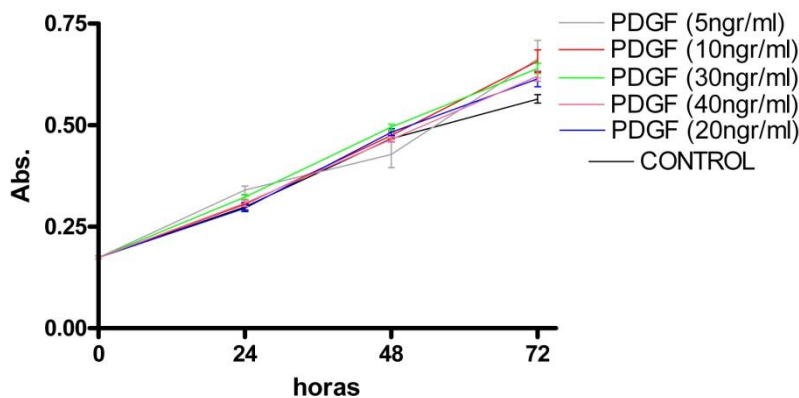


Figura 44. Proliferación celular en respuesta a PDGF 5; 10; 20; 30 y 40 ngr/ml.

Tabla 41. Absorbancia de los pocillos por concentración de PDGF y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,175	0,299	0,467	0,565
PDGF 5 ngr/ml	0,175	0,340	0,428	0,663
PDGF 10 ngr/ml	0,175	0,305	0,475	0,658
PDGF 20 ngr/ml	0,175	0,296	0,483	0,614
PDGF 30 ngr/ml	0,175	0,323	0,495	0,640
PDGF 40 ngr/ml	0,175	0,308	0,465	0,621

Si nos fijamos sólo en el efecto final (tras 72 horas de cultivo), los mejores resultados se obtuvieron con las concentraciones más bajas (5 y 10 ngr/ml; fig 45). En el grupo control, la pendiente de la recta se abate tras las 48 h, mientras que al suplementar los cultivos con PDGF no se produce ese descenso en el ritmo proliferativo ($p < 0,05$), poniendo en evidencia un efecto estimulador de este factor de crecimiento sobre las células tumorales de nuestro estudio.

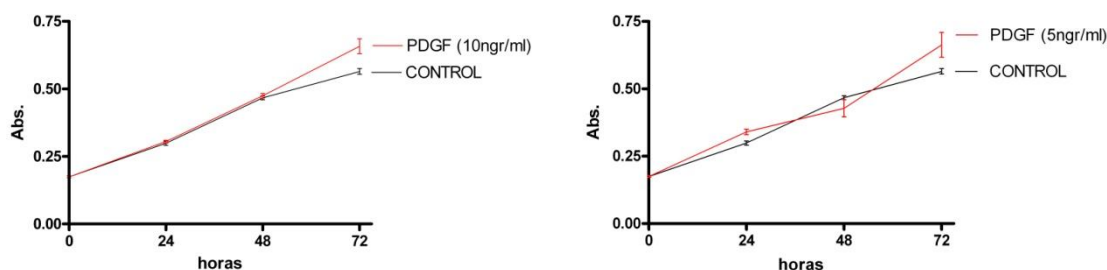


Figura 45. Proliferación celular en respuesta a la concentración de 10 y 5 ngr/ml de PDGF.

Se repitió la experiencia con la concentración de 10ngr/ml y se utilizó la técnica del NucleoCounter para su cuantificación (fig. 46).

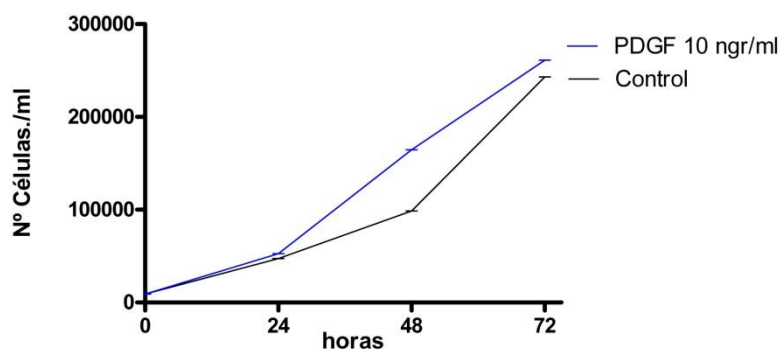


Figura 46. Proliferación celular en respuesta al PDGF 10ngr/ml.

El efecto potenciador de la proliferación celular del PDGF 10 ngr/ml queda en evidencia a partir de las 24 primeras horas de su exposición al cultivo, siendo a las 48 horas donde más notoriamente se observa dicho efecto (tabla 42).

Tabla 42. Número de células por ml en respuesta al PDGF 10ngr/ml.

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	9.000	47.250	98.550	243.000
PDGF (10ngr/ml)	9.000	52.650	164.700	261.000

1.2.4. Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb)

Con el FGFb también estudiamos concentraciones crecientes, en un rango similar al explorado previamente con el HGF: 2,5, 5, 7,5, 10, 15 y 20 ngr/ml. En líneas generales el comportamiento fue similar al observado con los factores de crecimiento previamente descritos: escasas diferencias durante las primeras 48 horas y mejores resultados al final del experimento en los cultivos suplementados con menores concentraciones de factor (fig. 47).

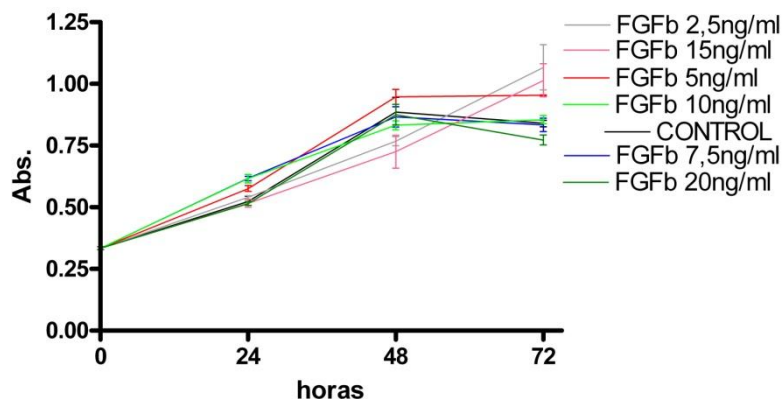


Figura 47. Proliferación celular en respuesta al FGFb 2,5, 5, 7,5, 10, 15 y 20 ngr/ml.

Tabla 43. Absorbancia de los pocillos por concentración de FGFb y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,3342	0,5230	0,8855	0,8398
FGFb 2,5 ngr/ml	0,3342	0,5398	0,7678	1,0673
FGFb 5 ngr/ml	0,3342	0,5758	0,9473	0,9535
FGFb 7,5 ngr/ml	0,3342	0,6168	0,8665	0,8335
FGFb 10 ngr/ml	0,3342	0,6163	0,8325	0,8548
FGFb 15 ngr/ml	0,3342	0,5165	0,7253	1,0143
FGFb 20 ngr/ml	0,3342	0,5155	0,8755	0,7728

El estudio específico de los resultados a las 72 h, realizado mediante ANOVA y Test de Neuman-Keuls, sólo muestra significación estadística para los resultados obtenidos con 2,5 ng/ml ($p < 0,05$).

Estudiando de manera individualizada las concentraciones de 2,5 ngr/ml y 5 ng/ml vemos que ambas mejoran los resultados a las 72 horas ($p < 0,05$ y $p < 0,001$), la primera de ellas de manera más acusada (fig. 48). Sin embargo, con 5 ngr/ml la curva de proliferación se sitúa por encima del control a lo largo de todo el experimento, aunque las diferencias a las 24h y 48 h no alcanzan significación estadística ($p > 0,05$).

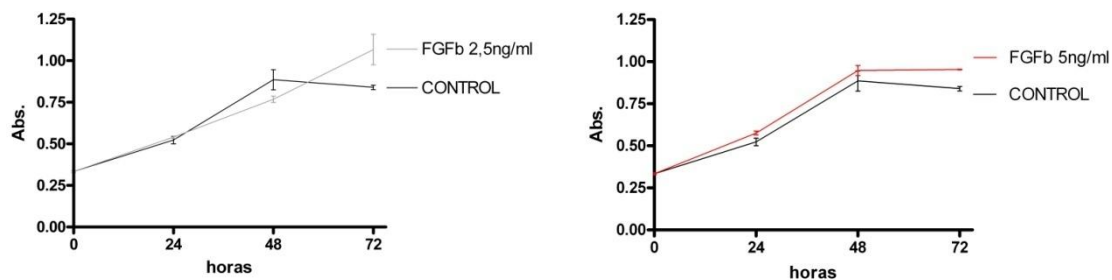


Figura 48. Proliferación celular en respuesta a la concentración de 2,5 y 5 ngr/ml de FGFb.

Posteriormente, se estudió la concentración de 2,5 ngr/ml mediante la técnica del NucleoCounter (fig. 49).

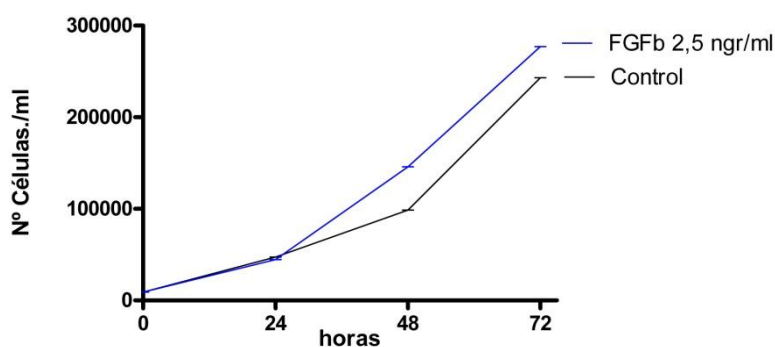


Figura 49. Proliferación celular en respuesta a FGFb 2,5 ngr/ml.

El efecto potenciador del FGFb 2,5ngr/ml se observa a partir de las 24 primeras horas de su exposición al cultivo y se prolonga durante toda la curva de crecimiento (tabla 44).

Tabla 44. Número de células por ml en respuesta al FGFb 2,5ngr/ml.

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	9.000	47.250	98.550	243.000
FGFb (2,5ngr/ml)	9.000	44.550	145.800	277.200

1.2.5. Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

Por último, se realizó el estudio con el factor VEGF a las concentraciones de 1, 2,5, 5, 7,5, 10 y 20 ngr/ml, como muestra la figura 50. De nuevo hay que fijarse únicamente en los

resultados al final del experimento, ya que durante las primeras 48 horas no se manifiesta con claridad ningún efecto.

El ANOVA realizado sobre los resultados obtenidos a las 72 horas es altamente significativo ($p < 0,0001$). Los cultivos realizados con concentraciones de 10, 7,5 y 5 ngr/ml obtienen cifras superiores a los controles, pero de estas diferencias únicamente la producida por la concentración de 7,5 ngr/ml alcanza significación estadística ($p < 0,001$).

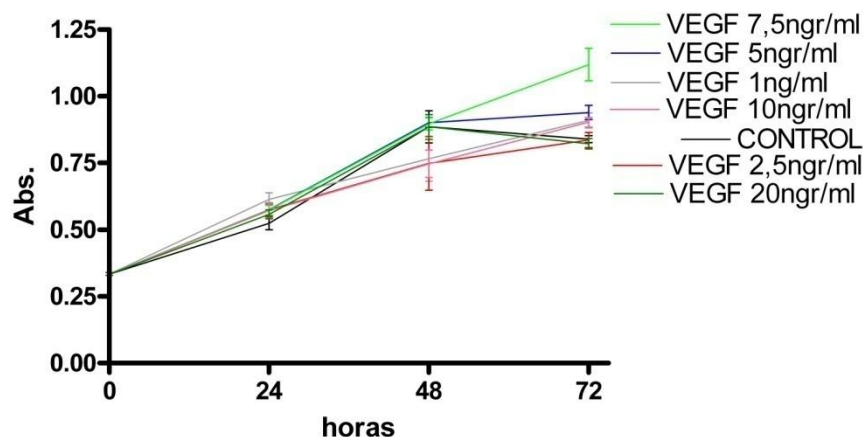


Figura 50. Proliferación celular en respuesta al VEGF 1, 2,5, 5, 7,5, 10 y 20 ngr/ml.

Tabla 45. Absorbancia de los pocillos por concentración de VEGF y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,3342	0,5230	0,8855	0,8398
VEGF 1 ngr/ml	0,3342	0,6145	0,7660	0,9095
VEGF 2,5 ngr/ml	0,3342	0,5745	0,7488	0,8373
VEGF 5 ngr/ml	0,3342	0,5750	0,9020	0,9393
VEGF 7,5 ngr/ml	0,3342	0,5738	0,8970	1,1195
VEGF 10 ngr/ml	0,3342	0,5715	0,7465	0,9033
VEGF 20 ngr/ml	0,3342	0,5580	0,8855	0,8225

Si observamos aisladamente los cultivos controles junto a los suplementados con 7,5 ngr/ml (fig. 51) vemos que mientras los controles detienen su crecimiento tras las primeras 48 h, los enriquecidos con VEGF continúan con un ritmo de proliferación inalterado.

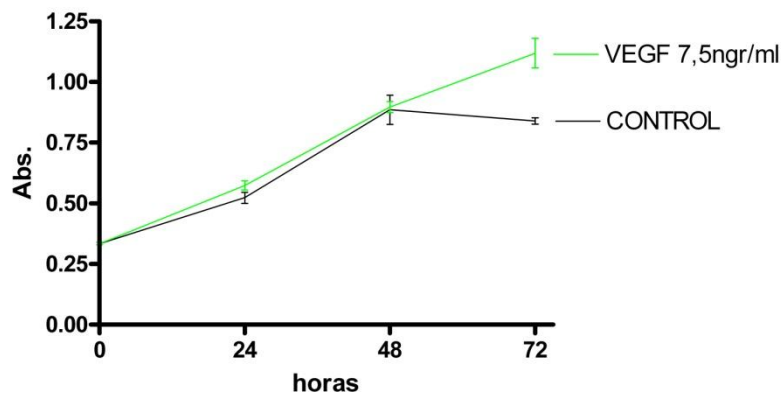


Figura 51. Proliferación celular en respuesta a la concentración de 7,5ngr/ml de VEGF.

Nuevamente se repitió la experiencia con la concentración de 7,5ngr/ml utilizando en esta ocasión la técnica del NucleoCounter para su medición (fig. 52).

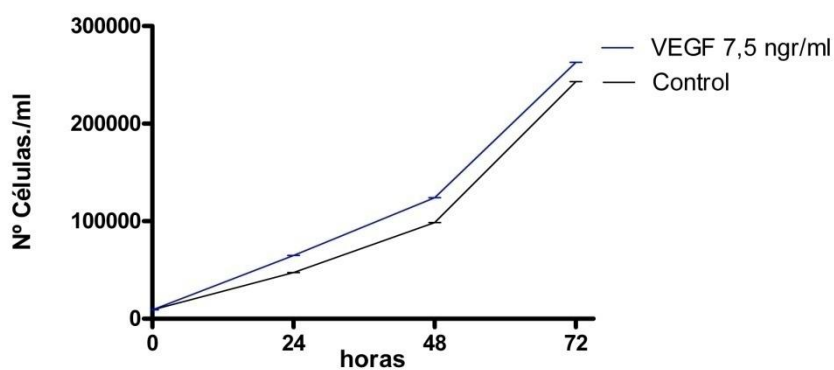


Figura 52. Proliferación celular en respuesta a VEGF 7,5 ngr/ml.

El efecto potenciador del VEGF 7,5ngr/ml se observó a lo largo de toda la curva de crecimiento (tabla 46).

Tabla 46. Número de células por ml y por concentración de VEGF y tiempo.

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	9.000	47.250	98.550	243.000
VEGF (7,5ngr/ml)	9.000	64.800	124.200	262.800

1.3. Efecto del ATRA sobre el desarrollo tumoral

En este apartado se recogen los resultados obtenidos con ATRA, tanto administrado a animales portadores de metástasis hepáticas, como añadido en concentraciones farmacológicas a cultivos de células tumorales sometidas a diversos estímulos proliferativos. Comenzaremos exponiendo estos últimos.

1.3.1. Efecto sobre cultivos de ACC-531

Presentamos en este apartado los resultados obtenidos al añadir ATRA a cultivos de células no estimulados, y a cultivos suplementados con suero de ratas (normales o hepatectomizadas) o con factores de crecimiento.

a) Efecto del ATRA sobre cultivos celulares enriquecidos con suero de rata normal

Para valorar el efecto del ATRA sobre los cultivos celulares se analizaron los efectos de diversas concentraciones del fármaco en cultivos suplementados con diversas concentraciones de suero de rata normal. En primer lugar se estudió el efecto del ATRA sobre células cultivadas en condiciones estándar, y posteriormente en cultivos suplementados con bajas concentraciones de suero como los utilizados para valorar los efectos de los factores de crecimiento.

Experimentos en cultivos suplementados con SRN 5%

En estos estudios se utilizaron cultivos en los que el medio RPMI fue complementado con SRN al 5%, ya que equivale a suplementarlo con SFB 10% (considerado el estándar en la mayoría de los trabajos publicados).

El ATRA se añadió a diferentes concentraciones, tomando como referencia inicial la que resultó más efectiva en los estudios realizados sobre células de rhabdomyosarcoma, y que es muy próxima a las concentraciones farmacológicas en suero de animales tratados con este fármaco (1 μM).

Como es habitual en este tipo de ensayos, se incluyeron concentraciones por encima y por debajo de la esperada como óptima: 0,5 μM , 1 μM y 2 μM . El recuento celular se llevó a cabo mediante Hemocitómetro, y los resultados se muestran en la figura 53.

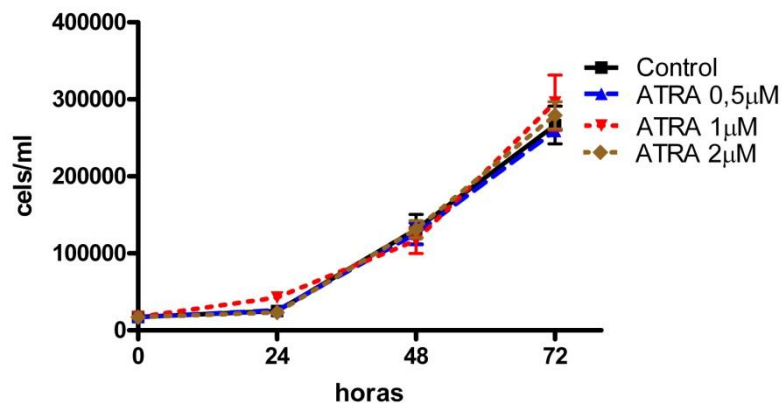


Figura 53. Proliferación celular (SRN 5%): ATRA 0,5 µM, 1 µM y 2 µM

Tal y como se aprecia fácilmente en la figura 53, ninguna de las concentraciones ensayadas de ATRA produjo efecto significativo alguno sobre el cultivo celular (ANOVA $p = 0,7083$); si bien, a muy bajas concentraciones, parecía mostrar un efecto estimulador (tabla 47).

Tabla 47. Número de células por concentración de ATRA y tiempo.

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
Control	17.333	25.185	131.296	266.667
ATRA (0,5µM)	17.333	25.778	125.370	258.667
ATRA (1µM)	17.333	42.370	116.667	295.778
ATRA (2µM)	17.333	23.259	131.296	279.111

Ante esta falta de efecto del fármaco en el rango de las concentraciones útiles en cultivos de rhabdomyosarcoma, optamos por realizar un nuevo experimento en el que ver si utilizando concentraciones netamente superiores de ATRA podía lograrse un efecto bloqueante de la proliferación celular. Así se utilizaron concentraciones de 10 µM, 50 µM y 100 µM, buscando una capaz de reducir la proliferación celular aproximadamente a la mitad respecto a los controles.

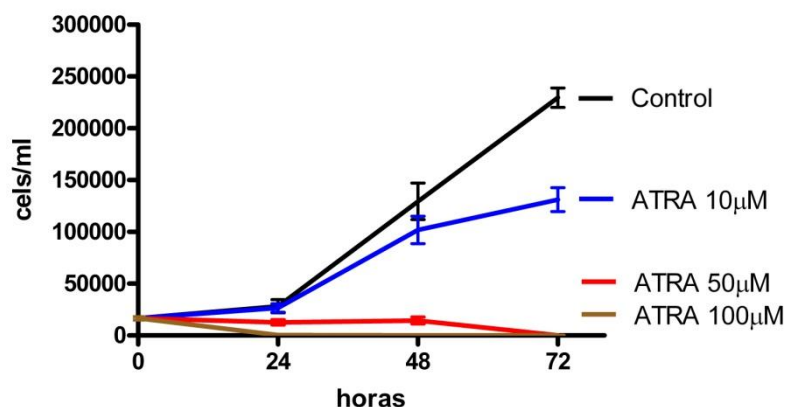


Figura 54. Efecto del ATRA 10 μM , 50 μM y 100 μM sobre la proliferación celular (SRN 5%).

De las tres concentraciones ensayadas, la más baja mostró un efecto en el rango de lo buscado, mientras que las otras dos prácticamente eliminaron las células de los cultivos. Cuando en vez de proliferación se observa crecimiento negativo, debe concluirse que se trata de un efecto letal sobre las células, y no de una interferencia en su capacidad de proliferación.

Centrándonos en las células cultivadas en presencia de ATRA 10 μM , se puede apreciar un claro efecto frenador de la proliferación, especialmente manifiesto en el tercer día de la experiencia; momento en el cual el número de células en los cultivos se redujo en un 46% respecto al control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Tabla 48. Número de células por concentración de ATRA y tiempo.

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
Control	16.556	28.148	129.444	229.556
ATRA (10μM)	16.556	26.519	101.852	131.111
ATRA (50μM)	16.556	12.741	14.444	222
ATRA (100μM)	16.556	296	0	0

Comprobado que las células ACC-531 muestran sensibilidad al ATRA 10 μM , se repitió el estudio utilizando también la mitad de la concentración demostrada útil, y conservando el 1 μM como patrón comparativo. Para dotar de más sensibilidad al experimento se realizó sobre placas de 96 pocillos utilizando para el recuento la técnica de MTT.

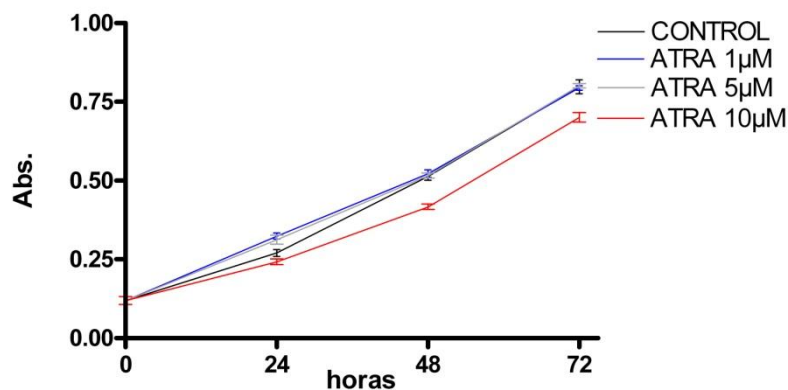


Figura 55. Proliferación celular (SRN 5%): ATRA 1, 5 y 10 μM .

Los resultados de este experimento corroboraron el efecto antiproliferativo del ATRA 10 μM , y la falta de eficacia de concentraciones menores ($p > 0.05$, Newman-Keuls Multiple Comparison Test; Tabla 49).

Resultó llamativo observar que las concentraciones bajas de ATRA provocaron una proliferación más rápida de las células durante las primeras 24 horas ($p < 0,05$); si bien dicho efecto ya no se observa en los días posteriores.

Tabla 49. Absorbancia de la proliferación celular: ATRA 1, 5 y 10 μM .

SUERO	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,119	0,270	0,513	0,799
ATRA 1 μM	0,119	0,324	0,522	0,794
ATRA 5 μM	0,119	0,312	0,516	0,801
ATRA 10 μM	0,119	0,242	0,417	0,701
<i>P (ctrl vs ATRA 10 μM)</i>	-----	$P > 0.05$	$P < 0.001$	$P < 0.001$

Efecto del ATRA al reducir la concentración de SRN en los cultivos

Dado que la adición de factores de crecimiento a los cultivos sólo manifiesta su efecto al reducir la concentración de suero hasta 0,5%, se realizaron unas experiencias en las que se valoró la respuesta de los cultivos al ATRA con concentraciones decrecientes de SRN. Todas ellas se realizaron en placas de 96 pocillos y medición mediante técnica de MTT.

En la figura 56 se muestra la proliferación celular de cultivos complementados con SRN 2,5% y el efecto del ATRA a las concentraciones de 5 μM y 10 μM .

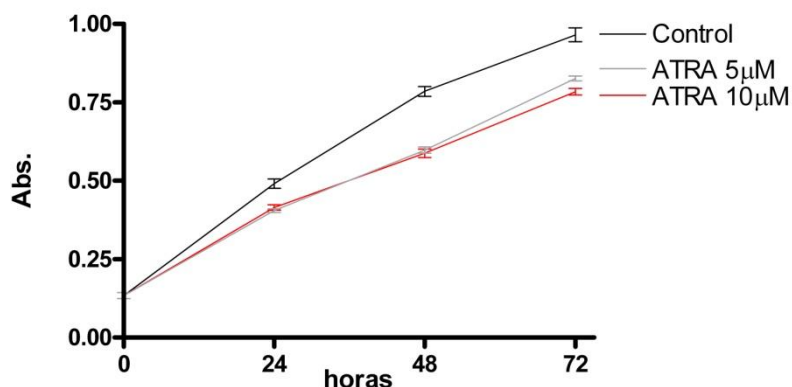


Figura 56. Proliferación celular (SRN 2,5%): ATRA 5 y 10 μM.

La reducción a la mitad del suplemento de SRN en el cultivo no modificó sensiblemente el efecto del ATRA 10 μM, que redujo significativamente el recuento celular al final del experimento. Sin embargo, conviene destacar que en esta experiencia el efecto antiproliferativo del ATRA 10 μM se puso de manifiesto desde las primeras 24 horas, siendo la reducción estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Por otra parte, la adición de ATRA 5 μM dio lugar a un efecto antiproliferativo que no se había puesto de manifiesto en los cultivos suplementados con SRN 5%. De hecho, la gráfica prácticamente se superpone a la de ATRA 10 μM durante las primeras 48 horas del experimento. Al final del mismo, el recuento celular es ligeramente superior con la concentración menor de ATRA, si bien la diferencia no alcanza significación estadística.

Tabla 50. Proliferación celular (SRN 2,5%): ATRA 5 y 10 μM

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,134	0,491	0,785	0,965
ATRA 10 μM	0,134	0,415	0,588	0,784
ATRA 5 μM	0,134	0,405	0,598	0,826

El siguiente paso fue estudiar los efectos del ATRA reduciendo la concentración de SRN hasta el 1% (fig. 57). La gráfica muestra la respuesta celular al ATRA 5 μM y 10 μM.

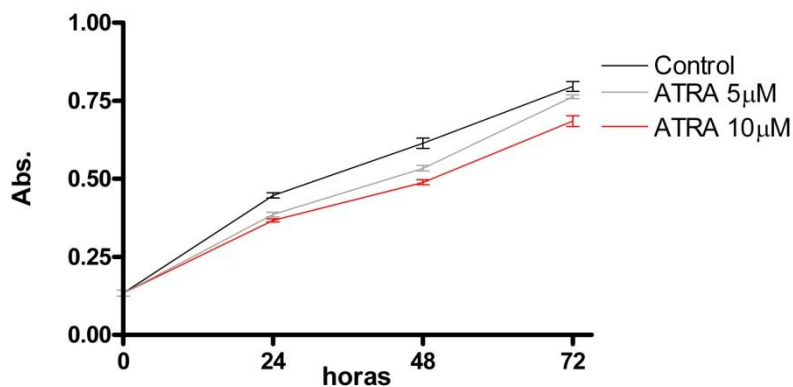


Figura 57. Proliferación celular (SRN 1%): ATRA 5 y 10 μM

Al igual que sucedía con la concentración de SRN 2,5%, ambas concentraciones de ATRA reducen la proliferación celular con respecto al control durante las primeras 48 horas ($p < 0,001$); en cambio, a las 72 horas los cultivos realizados con ATRA 5 μM no reducen el recuento celular ($p > 0,05$) (Tabla 51.).

Tabla 51. Proliferación celular (SRN 1%): ATRA 5 y 10 μM

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,134	0,447	0,614	0,796
ATRA 10 μM	0,134	0,367	0,489	0,685
ATRA 5 μM	0,134	0,386	0,534	0,763

Por último, se estudió el comportamiento de los cultivos suplementados con SRN 0,5% al añadirles ATRA.

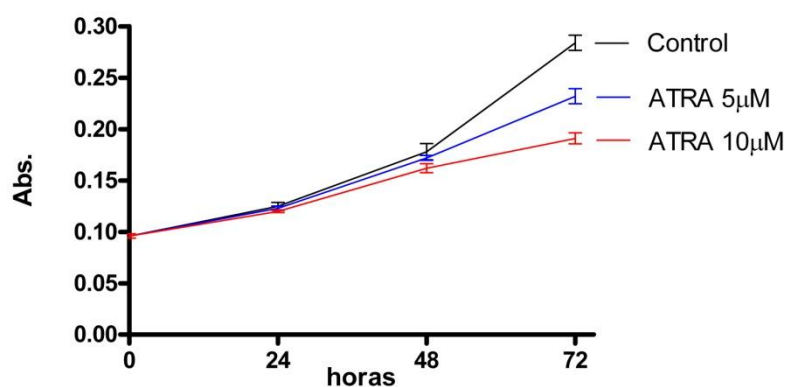


Figura 58. Efecto del ATRA sobre los cultivos celulares suplementados con SRN 0,5%.

En este experimento se repiten las observaciones de los anteriores, con la importante diferencia de que el efecto antiproliferativo resultó muy superior para ambas concentraciones de ATRA ($p < 0,001$). El ATRA 5 μM produjo una reducción del 25%, y el ATRA 10 μM del 50%.

Tabla 52. Proliferación celular (SRN 0,5%): ATRA 5 y 10 μM

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
CONTROL	0,096	0,125	0,178	0,284
ATRA 5 μM	0,096	0,123	0,172	0,240
ATRA 10 μM	0,096	0,120	0,162	0,191

Como conclusión, la progresiva reducción del SRN en el cultivo se acompañó de un incremento progresivo en la sensibilidad frente al ATRA de las células.

Experimentos en cultivos suplementados con SRN 0,5%

Dado que los experimentos más relevantes del trabajo se debían realizar en cultivos celulares llevados a cabo con bajas concentraciones de suero, se realizaron nuevas experiencias contemplando todo el espectro posible de concentraciones de ATRA: desde la centésima parte de la concentración farmacológica hasta concentraciones tóxicas del fármaco. Además, todo ello se valoró utilizando las dos técnicas de recuento: el recuento celular directo mediante hemocitómetro y la estimación automatizada mediante técnica de MTT.

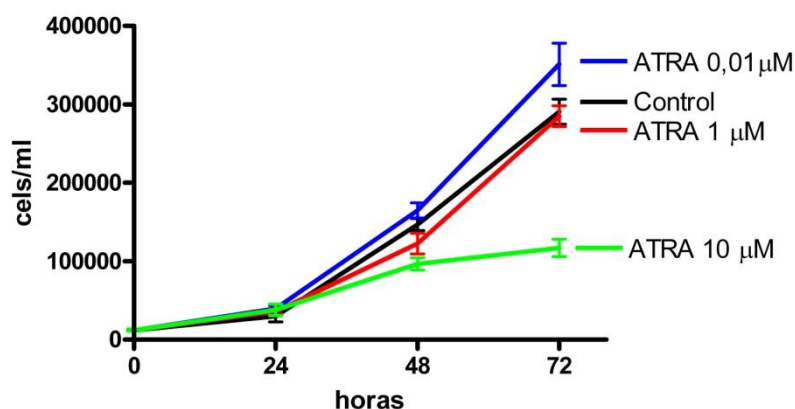


Figura 59. Efecto del ATRA 0,001, 1 y 10 μM sobre la proliferación celular (SRN 0,5%).

En el experimento valorado con Hemocitómetro no se pudieron incluir tantas variantes de concentración. De nuevo se constató que a concentraciones de 10 μM el ATRA produjo una significativa reducción del recuento celular, manifiesta ya a las 48 horas ($p < 0,01$) y extraordinariamente intensa en el tercer día ($p < 0,001$), cuando no alcanzó el 38% del control.

Por otra parte, de nuevo la concentración de 1 μM no produce cambios significativos con respecto al control a lo largo de toda la curva ($p > 0.05$, Newman-Keuls Multiple Comparison Test).

En cambio, se observó otra vez el efecto paradójico señalado en las primeras experiencias: con bajas concentraciones de ATRA se produce una estimulación de la proliferación con respecto al control a ($p < 0.05$).

Tabla 53. Número de células por concentración de ATRA y tiempo (SRN 0,5%).

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
Control	12.333	30.074	146.852	290.667
ATRA 0,01 μM	12.333	39.704	164.815	351.111
ATRA 1 μM	12.333	35.852	122.593	284.889
ATRA 10 μM	12.333	38.074	96.667	117.111

Con el fin de valorar la observación del efecto de dosis bajas de ATRA sobre los cultivos, y disponer de una secuencia más amplia de concentraciones de ATRA, se realizaron dos nuevas experiencias con placas de 96 pocillos, que se cuantificaron mediante la técnica de MTT.

En primer lugar, para corroborar el efecto proliferativo de concentraciones bajas de ATRA, se realizó una experiencia que incluyó desde 0,005 μM hasta 5 μM (fig.60).

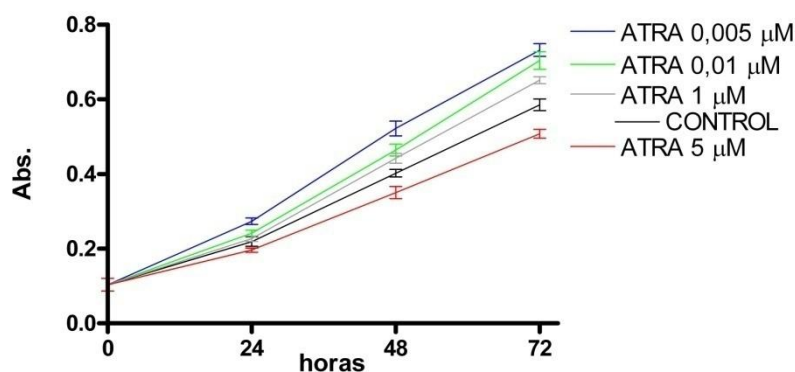


Figura 60. Efecto del ATRA 0,005, 0,01, 1 y 5 μM sobre los cultivos celulares (SRN 0,5%).

En este experimento, se observan diferencias desde las primeras 24 horas de exposición al fármaco. Con dosis muy bajas de ATRA se confirma que se estimula la proliferación celular (Tabla 54).

En las primeras 24 horas las concentraciones de ATRA inferiores a 5 μM muestran una mayor proliferación que el control, si bien sólo la concentración de ATRA 0,005 μM alcanza significación estadística ($p < 0.001$).

A las 48 horas, continúa el efecto proliferativo del ATRA (ATRA 0,005 μM , $p < 0.001$ y ATRA 0,01 μM , $p < 0.05$) aunque en la concentración 1 μM no alcanza significación estadística ($p > 0.05$). Finalmente, a las 72 horas las tres concentraciones más bajas de ATRA muestran una clara estimulación de la proliferación celular frente al control ($p < 0.001$), con incrementos del 13%, 24% y 30%.

Atendiendo a la concentración de ATRA 5 μM , la proliferación celular es inferior a la del control desde las primeras 24 horas, siendo la reducción más notable a las 48 horas ($p < 0.05$) y 72 horas ($p < 0.01$).

Tabla 54. Absorbancia de los pocillos por concentración de ATRA 0,005, 0,01, 1 y 5 μM y tiempo. (SRN 0,5%)

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,103	0,219	0,402	0,586
ATRA 0,005 μM	0,103	0,274	0,522	0,733
ATRA 0,01 μM	0,103	0,242	0,464	0,704
ATRA 1 μM	0,103	0,227	0,442	0,652
ATRA 5 μM	0,103	0,196	0,351	0,508

En una nueva experiencia, se sometieron los cultivos celulares a concentraciones altas de ATRA (5, 7,5, 15 y 20 μM), tal y como queda reflejado en la figura 61. El recuento de la proliferación celular se realizó mediante la técnica de MTT.

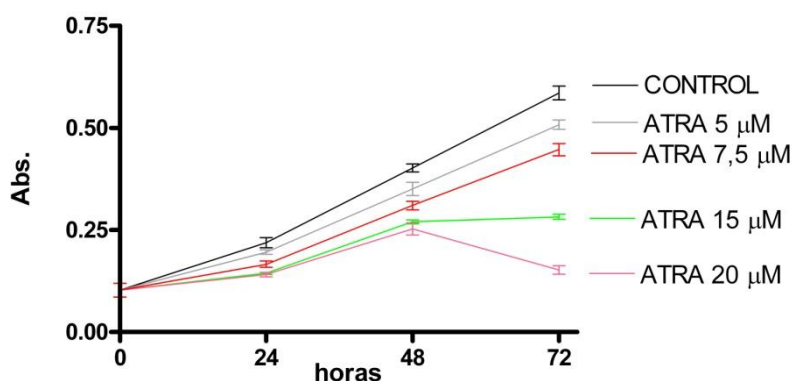


Figura 61. Efecto del ATRA 5, 7,5, 15 y 20 μM sobre los cultivos celulares (SRN 0,5%).

A lo largo de toda la curva de proliferación cultivos tratados con ATRA quedan por debajo de los controles (ANOVA $p < 0.0001$). A las 72 horas el efecto más manifiesto tienen lugar en los cultivos con concentraciones de 15 μM y 20 μM ($p < 0.001$, Newman-Keuls Multiple Comparison Test). En el primer caso se produce una meseta (crecimiento nulo), mientras que en el segundo la proliferación celular decae bruscamente (Tabla 55).

Tabla 55. Absorbancia de los pocillos por concentración de ATRA 5, 7,5, 15 y 20 μM y tiempo. (SRN 0,5%)

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,103	0,219	0,402	0,586
ATRA 5 μM	0,103	0,196	0,351	0,508
ATRA 7,5 μM	0,103	0,166	0,310	0,447
ATRA 15 μM	0,103	0,144	0,270	0,282
ATRA 20 μM	0,103	0,141	0,253	0,152

b) Efecto del ATRA sobre cultivos celulares enriquecidos con suero de rata hepatectomizada

En este apartado se incluyen las experiencias encaminadas a probar si el ATRA es capaz de revertir el efecto potenciador de la proliferación de las células ACC-531 que la hepatectomía parcial confiere al suero de la rata.

Dado que la primera concentración a la que se encontraron diferencias entre el SRN y el SRH fue de 2,5%, se realizaron ensayos con concentraciones decrecientes de SRH valorando la respuesta de esos cultivos a la adición de ATRA.

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el SRH 2,5%

En la figura 62 se representan los resultados obtenidos al valorar mediante la técnica de MTT el efecto que la adición al medio de bajas y altas concentraciones de ATRA (10 μM , 5 μM y 1 μM) produce sobre la proliferación celular.

Al igual que sucedía con el suero de rata normal, las dos concentraciones más altas de ATRA producen un claro efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células ACC-531. Por otra parte, la concentración de ATRA 1 μM muestra el efecto proliferativo observado anteriormente con el SRN, si bien se produce únicamente en las últimas 24 horas del crecimiento.

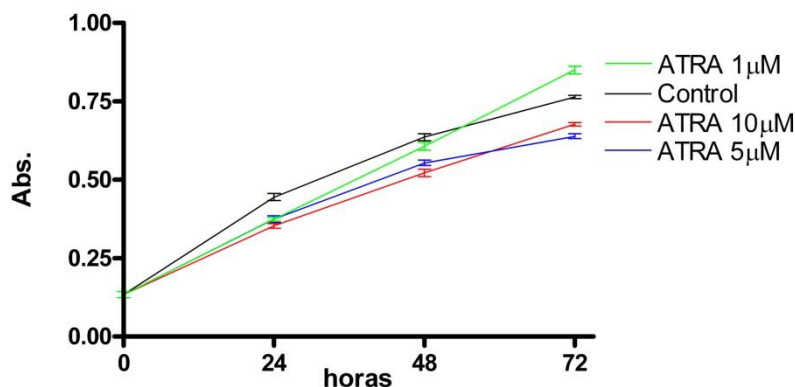


Figura 62. Efecto del ATRA 1, 5 y 10 µM sobre los cultivos celulares (SRH 2,5%).

En las primeras 24 horas de exposición al fármaco, los cultivos con ATRA mostraron una disminución de la proliferación con respecto al control ($p < 0.001$, Newman-Keuls Multiple Comparison Test) mientras que a las 48 horas sólo los cultivos con ATRA 5 y 10 µM continuaron manifestando dicho efecto ($p < 0.001$). La proliferación de las células cultivadas con ATRA 1 µM no muestra diferencias significativas a las 48 horas ($p > 0.05$); sin embargo, a las 72 horas se aprecia un incremento de la proliferación ($p < 0.001$) que no se produce con las otras concentraciones de 10 µM y 5 µM que producen una inhibición de la proliferación ($p < 0.001$) (Tabla 56).

Por otra parte, las concentraciones de ATRA 5 y 10 µM se mostraron similares en su compartamiento, sin diferencias significativas entre ellas salvo a las 72 horas ($p < 0.01$).

Tabla 56. Absorbancia de los pocillos según concentración de ATRA y tiempo. (SRH 2,5%)

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,134	0,445	0,636	0,764
ATRA 10 µM	0,134	0,353	0,522	0,677
ATRA 5 µM	0,134	0,375	0,554	0,639
ATRA 1 µM	0,134	0,374	0,607	0,850

Posteriormente, para corroborar los datos anteriores obtenidos mediante MTT, se repitió la experiencia con ATRA 10 µM y 5 µM pero cuantificando la proliferación mediante NucleoCounter (fig.63).

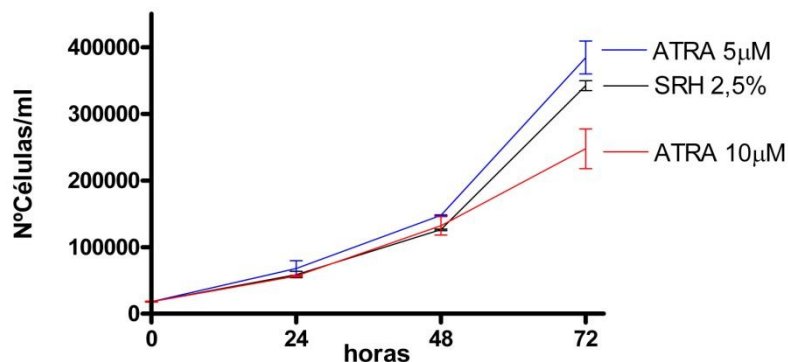


Figura 63. Efecto del ATRA 5 y 10 µM sobre la proliferación celular (SRH 2,5%).

En esta ocasión, la concentración de ATRA 5 µM no produce el efecto inhibitorio de la proliferación celular visto anteriormente. La concentración de ATRA 10 µM produce una disminución de la proliferación evidente a las 72 horas, aunque carece de significación estadística (ANOVA, $p=0,0502$).

Tabla 57. Nº de células/ml en función de la concentración de ATRA y tiempo (SRH 2,5%).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	18.225	58.725	126.000	342.375
SRH 2,5% + ATRA 10µM	18.225	56.700	132.000	247.500
SRH 2,5% + ATRA 5µM	18.225	68.175	147.750	384.450

Para corroborar los resultados del experimento anterior se optó por realizar una nueva experiencia con la concentración más alta de ATRA (10 µM) y SRH 2,5%, utilizando como controles cultivos tanto con SRH 2,5% como SRN 2,5%. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 64.

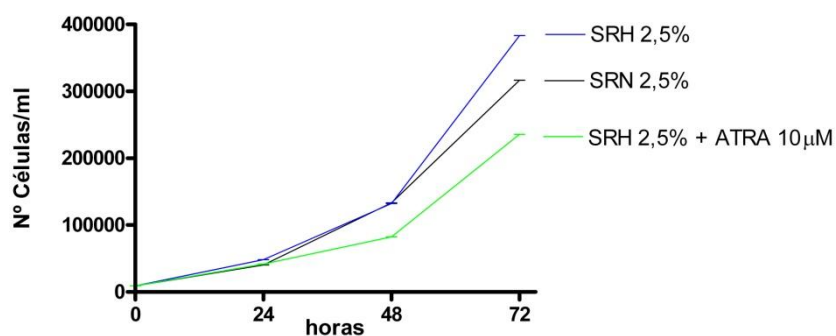


Figura 64. Efecto del ATRA 10 µM sobre la proliferación celular. (SRH 2,5%)

Se comprobó como la adición del ATRA al medio estimulado con SRH disminuye la proliferación celular incluso por debajo de la proliferación correspondiente al cultivo sin ATRA pero complementado con SRN.

Tabla 58. Número de células/ml en función del medio y el tiempo.

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN 2,5%	9.000	40.500	133.650	316.800
SRH 2,5%	9.000	48.600	132.300	383.400
SRH 2,5% + ATRA (10μM)	9.000	41.850	82.350	235.800

En último lugar, para confirmar los resultados logrados anteriormente, se realizó una nueva experiencia con ATRA 10 μ M leyendo en esta ocasión los valores mediante el lector de placas xCELLigence (fig. 65).

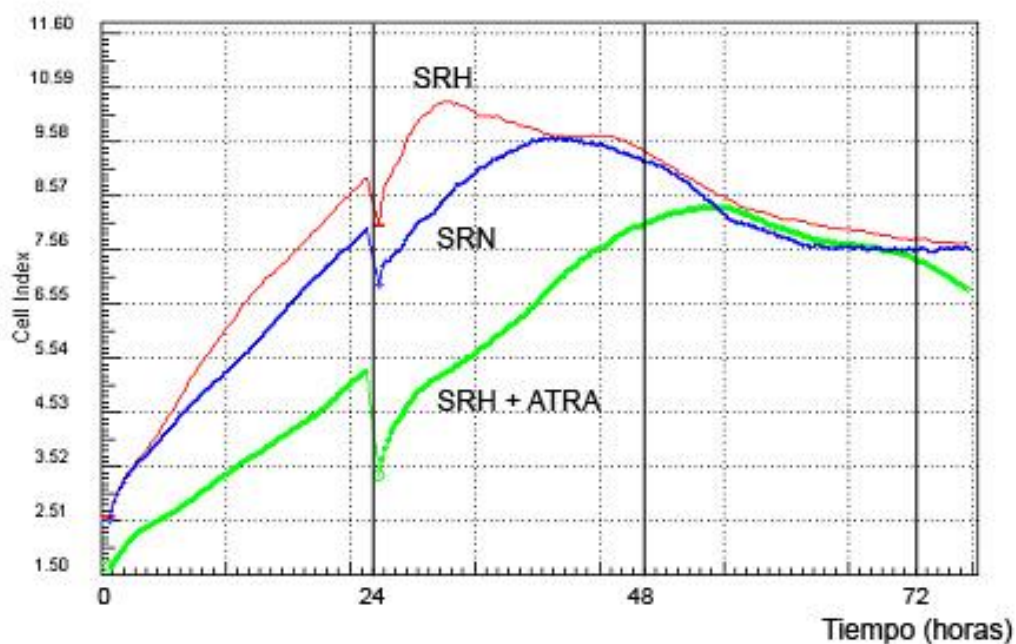


Figura 65. Efecto del ATRA 10 μ M sobre la proliferación celular. (SRH y SRN al 2,5%)

Como se había observado mediante la técnica de MTT y NucleoCounter, el ATRA 10 μ M reduce la proliferación celular, incluso a niveles por debajo de los cultivos con medio complementado con SRN/H 2,5% sin ATRA.

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el SRH 1%

Se procedió a continuación a estudiar los efectos del ATRA 5 y 10 μM en los cultivos celulares con medios enriquecidos con SRH al 1% (fig. 66).

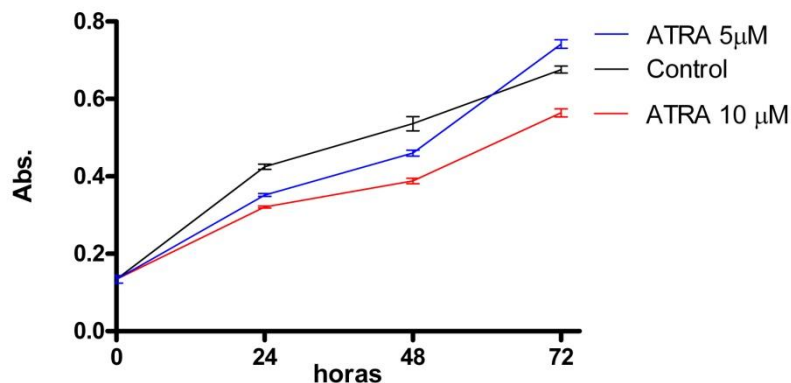


Figura 66. Efecto del ATRA 10 y 5 μM sobre la proliferación celular (SRH 1%).

En esta ocasión, las dos concentraciones de ATRA quedan por debajo de la curva de crecimiento de los controles a lo largo de las primeras 48 horas (ANOVA $p < 0.0001$). Sin embargo, a las 72 horas, la concentración de ATRA 5 μM supera al control mientras que la concentración de ATRA 10 μM continúa por debajo del control ($p < 0.05$, Newman-Keuls Multiple Comparison Test). Los datos de las Absorbancia de los pocillos se muestran en la tabla 59.

Tabla 59. Absorbancia de los pocillos por concentración de ATRA 5 y 10 μM y tiempo. (SRH 1%)

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,134	0,425	0,536	0,676
ATRA 10 μM	0,134	0,321	0,388	0,564
ATRA 5 μM	0,134	0,352	0,460	0,742

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el SRH 0,5%

Dado que para poder valorar un posible efecto de los Factores de Crecimiento sobre los cultivos resulta necesario reducir la concentración de suero añadido a los cultivos hasta un 0,5%, se estudió el efecto del ATRA sobre cultivos con concentraciones de SRH al 0,5%. En la figura 67 se muestran las curvas de proliferación celular de ACC-531 al complementar el medio con SRH al 0,5% y añadir ATRA a las concentraciones de 0,05, 5 y 10 μM . Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos, midiendo una mitad de la placa con la técnica de MTT (fig. 67) y la otra mitad con el lector NucleoCounter (fig.68).

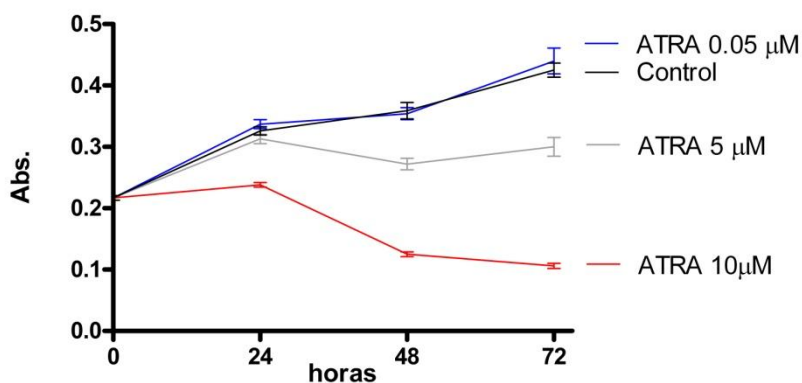


Figura 67. Efecto del ATRA 0,05, 5 y 10 μM sobre la proliferación celular (MTT; SRH 0,5%).

En esta ocasión el ATRA 0,05 μM no produjo diferencias significativas con respecto al control en ningún momento de la curva de crecimiento ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test", $p > 0,05$). Sin embargo, las concentraciones de ATRA 5 y 10 μM redujeron significativamente la proliferación celular con respecto al control, con una significación a las 72 horas de $p < 0,001$ (Tabla 60).

Tabla 60. Absorbancia de los pocillos por concentración de ATRA 0,05, 5 y 10 μM y tiempo. (SRH 0,5%)

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,170	0,279	0,311	0,378
ATRA 0,05 μM	0,170	0,290	0,306	0,393
ATRA 5 μM	0,170	0,266	0,224	0,253
ATRA 10 μM	0,170	0,191	0,077	0,059

La proliferación celular de la misma placa también se cuantificó por medio del lector NucleoCounter (fig. 68).

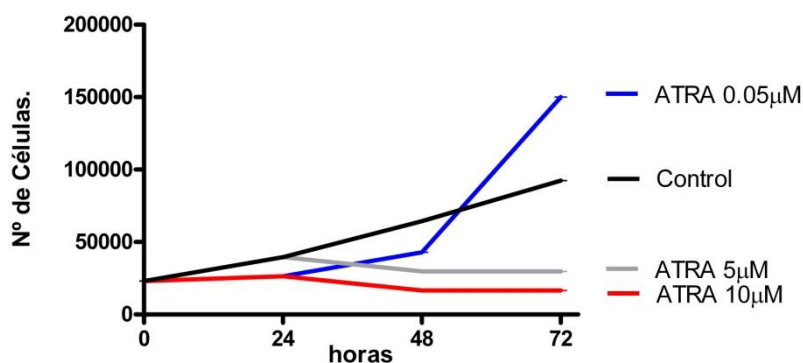


Figura 68. Efecto del ATRA 0,05, 5 y 10 µM sobre la proliferación celular (NucleoCounter; SRH 0,5%).

En la figura 68 podemos observar como el ATRA 5 y 10 µM frenan la proliferación celular del cultivo de ACC-531, viéndose este efecto más acentuado con la concentración de ATRA mayor. Por el contrario a lo visto con el MTT, la concentración de ATRA 0,05 µM frena la proliferación celular durante las primeras 48 horas para, en las últimas 24 horas, mostrar un estímulo proliferativo mayor que el control (Tabla 61).

Tabla 61. Número de células por concentración de ATRA 0,05, 5 y 10µM y tiempo. (SRH 0,5%)

	Nº de Células			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	23.100	39.600	64.350	92.400
ATRA 0,05 µM	23.100	26.400	42.900	150.150
ATRA 5 µM	23.100	39.600	29.700	29.700
ATRA 10 µM	23.100	26.400	< 16.500	< 16.500

En una última experiencia con SRH al 0,5%, se utilizó la concentración de ATRA 5 µM y se recurrió a la técnica del lector de placas xCELLigence, como se muestra en la figura 69.

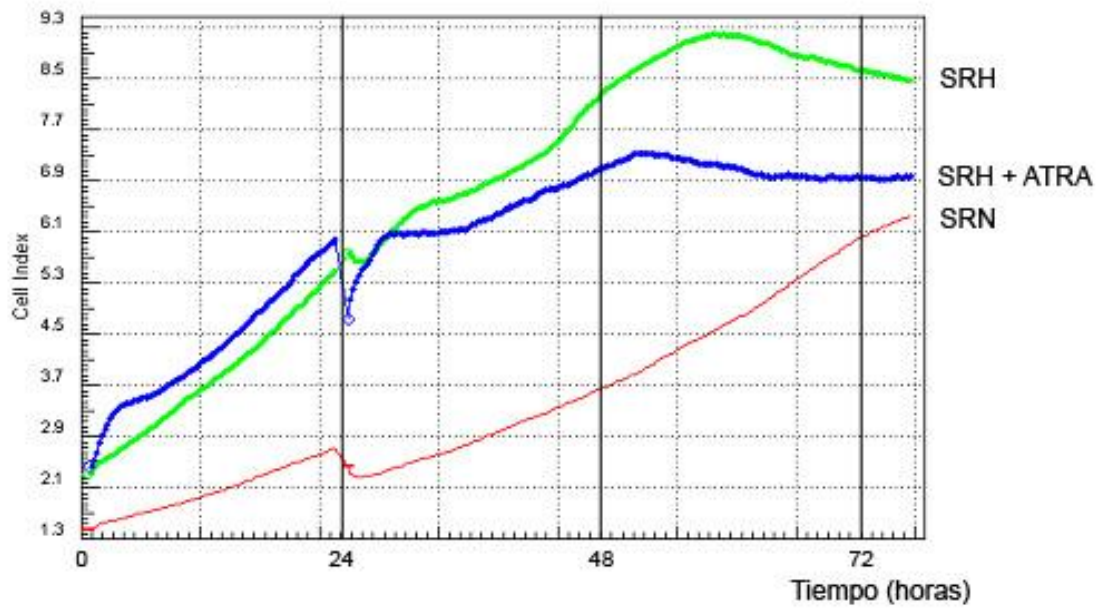


Figura 69. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular (SRH y SRN al 0,5%).

En esta ocasión, se produce nuevamente un efecto inhibitorio de la proliferación celular por parte del ATRA 5 μ M si bien, en las primeras horas de exposición, parece estimular el crecimiento celular. El cultivo con SRN 0,5% prolifera en menor medida que los dos anteriores a lo largo de toda la curva.

c) Efecto del ATRA sobre cultivos enriquecidos con Factores de Crecimiento

Para observar más claramente el efecto de los factores de crecimiento sobre la proliferación del cultivo, bajamos la concentración del SRN al 0,5% y utilizamos las concentraciones óptimas de los FC ya calculadas anteriormente. La concentración utilizada de ATRA es 5 µM, concentración a la que el cultivo celular control (con suero al 0,5%) muestra una inhibición del crecimiento de aproximadamente la mitad.

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF)

Se realizó una experiencia por duplicado utilizando cultivos celulares enriquecidos con SRN 0,5% y HGF al 7,5ngr/ml como control y se evaluó el efecto del ATRA 5µM sobre ellos (fig. 70).

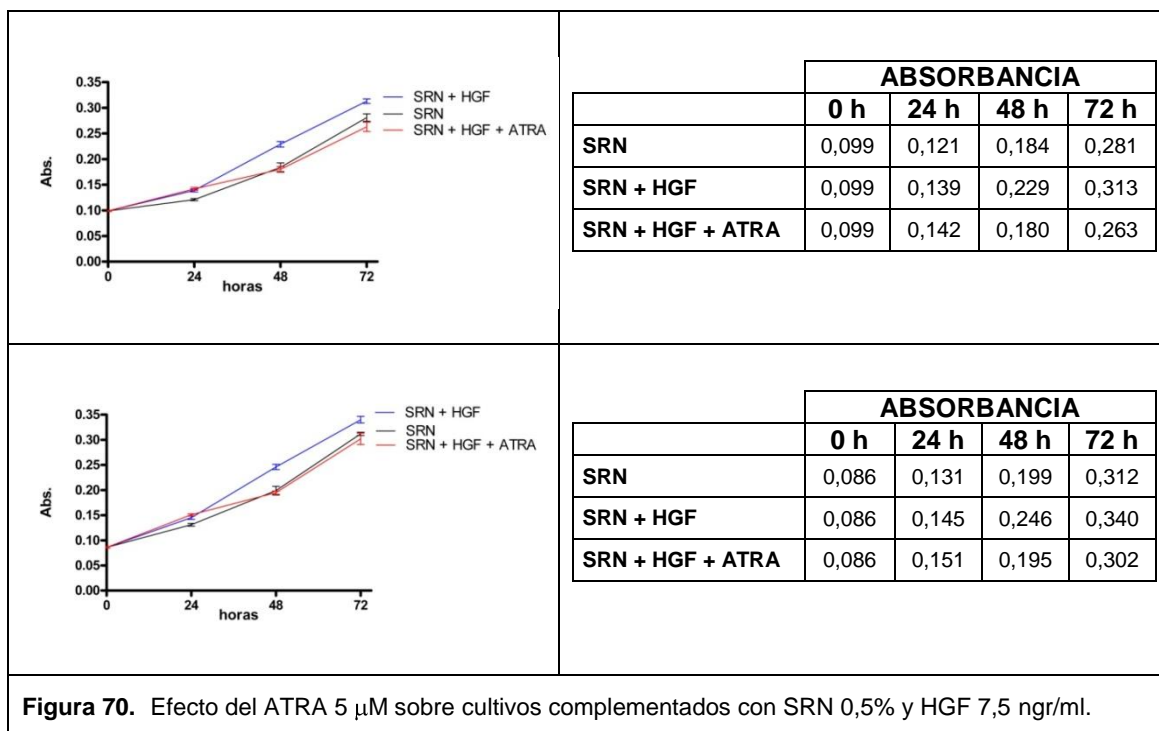


Figura 70. Efecto del ATRA 5 µM sobre cultivos complementados con SRN 0,5% y HGF 7,5 ngr/ml.

Ambas experiencias mostraron el mismo efecto. Como se demostró anteriormente, el cultivo celular estimulado con HGF 7,5 ngr/ml prolifera en mayor medida que el cultivo sin factor de crecimiento en medio (A las 72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; p<0,01 y p<0,05).

Al estudiar el efecto inhibitorio del ATRA, se observó que la adición conjunta de HGF y ATRA en medio produce una reducción de la proliferación celular incluso a valores ligeramente

inferiores al cultivo sin tratar con el factor (72 HORAS, SRN+HGF vs. SRN+HGF+ATRA: $p < 0,001$ y $p < 0,05$).

Se repitió la experiencia midiendo en esta ocasión los resultados obtenidos mediante el lector NucleoCounter (fig. 71).

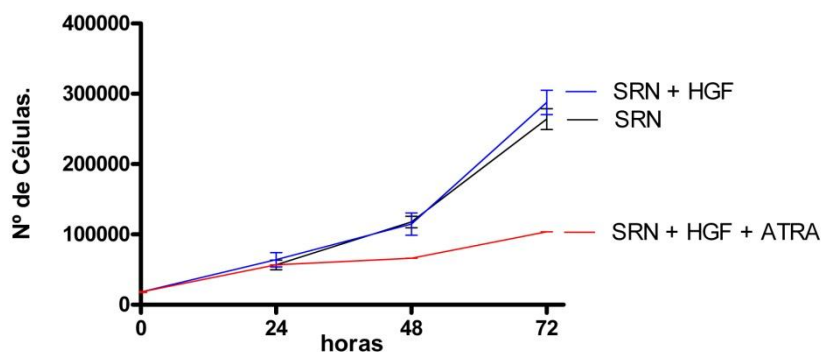


Figura 71. Efecto del ATRA 5 μM sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y HGF 7,5 ngr/ml (NucleoCounter).

Como muestra la figura 71 en esta ocasión el HGF estimula la proliferación si bien no se observa dicho efecto hasta las 72 horas de crecimiento. La adición conjunta de HGF y ATRA produce una reducción del crecimiento celular patente desde las primeras 24 horas (Tabla 62).

Tabla 62. Nº de células en función del medio (SRN 0,5%, HGF 7,5 ngr/ml, ATRA 5 μM) y tiempo.

	Nº de células			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	18.225	56.700	117.750	264.000
SRN + HGF	18.225	64.125	114.750	287.925
SRN + HGF + ATRA	18.225	56.700	66.000	103.950

A continuación se utilizó el lector de placas xCELLigence para corroborar los resultados obtenidos mediante la técnica de MTT. La figura 72 muestra el efecto que el ATRA 5 μM produce en células cultivadas con el Factor de Crecimiento Hepatocitario (7,5 ngr/ml) utilizando como control células cultivadas en medio complementado con SRN 0,5%.

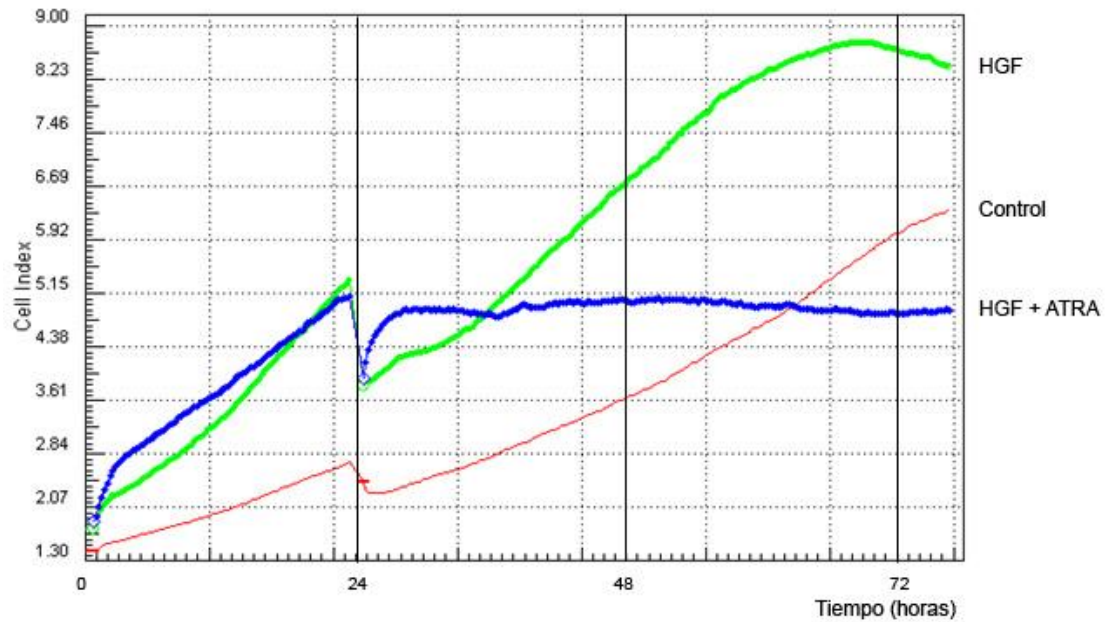


Figura 72. Efecto del ATRA 5 μM sobre la proliferación celular estimulada mediante HGF 7,5 ngr/ml (SRN 0,5%).

La figura 72 muestra claramente el efecto estimulante del HGF sobre los cultivos celulares así como el efecto inhibitor del ATRA en comparación al cultivo control (SRN 0,5%).

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

El siguiente Factor a estudio fue el EGF. Se utilizó a la concentración de 10 ngr/ml y se adicionó al medio complementado con SRN 0,5% con y sin ATRA 5 μM . Los resultados quedan reflejados en la figura 73.

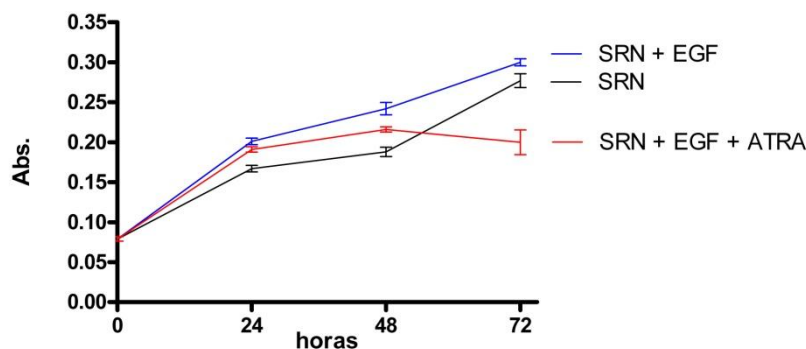


Figura 73. Efecto del ATRA 5 μM sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y EGF 10 ngr/ml. (MTT)

El estimulado con EGF muestra un mayor ritmo proliferativo con respecto al control (SRN 0,5%) a lo largo de toda la curva ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$), si bien no alcanza significación estadística a las 72 horas. Sin embargo, dicho efecto proliferativo del EGF queda disminuido al añadir al medio ATRA 5 μM llegando incluso a valores de absorbancia inferiores al control a las 72 horas (SRN + EGF + ATRA vs SRN + EGF; $p < 0,001$). En la tabla 63 se muestran los valores de las absorbancias de la figura 73.

Tabla 63. Absorbancia de los pocillos en función del medio (SRN 0,5%, ATRA 5 μM , EGF 10 ngr/ml) y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	0,079	0,167	0,188	0,277
SRN + EGF	0,079	0,201	0,242	0,300
SRN + EGF + ATRA	0,079	0,191	0,216	0,200

Para confirmar los datos obtenidos se repitió la experiencia anterior cuantificando la proliferación celular mediante el lector xCELLigence. Las células fueron estimuladas mediante EGF 5 ngr/ml y 10 ngr/ml. La concentración de ATRA utilizada fue de 5 μM , siendo el control las células creciendo en medio complementado con SRN 0,5%. Los resultados se muestran en la figura 74.

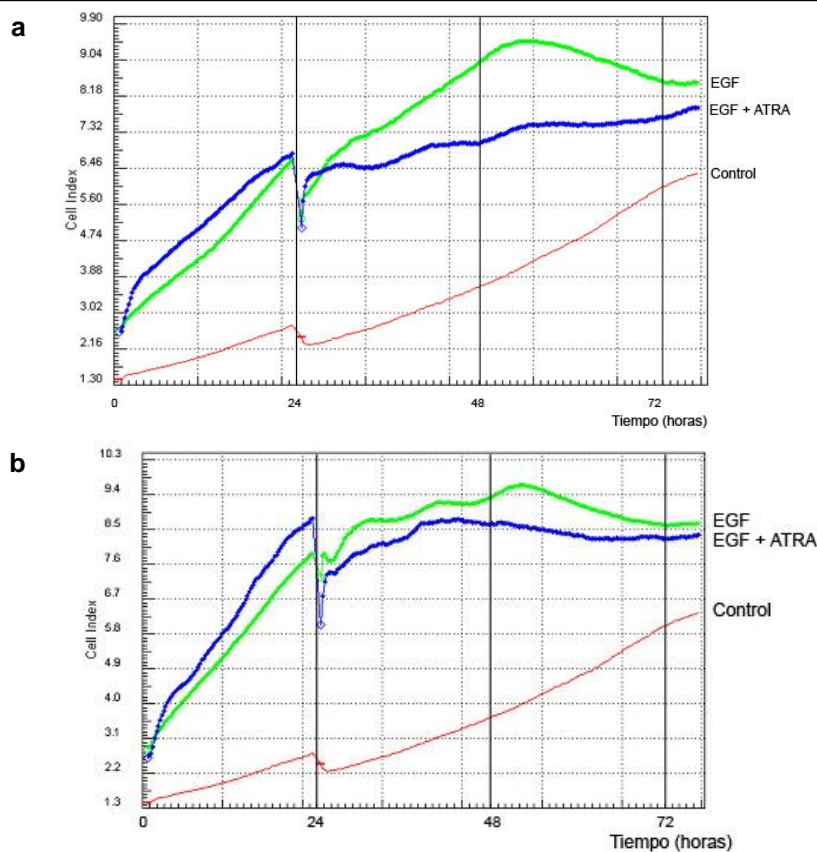


Figura 74. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular estimulada mediante EGF 5 ngr/ml (a) y 10 ngr/ml (b). Control: SRN 0,5%.

En ambas figuras (a y b) se muestra como el Factor de Crecimiento EGF produce un efecto estimulante sobre las células mientras que el ATRA reduce la proliferación de las mismas.

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)

El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) se ensayó en medio complementado con SRN 0,5% en presencia y ausencia de ATRA 5 μ M. Las concentraciones de PDGF utilizadas fueron 5 y 10 ngr/ml.

En la figura 75 se muestra los efectos de la dosis de PDGF más baja, 5 ngr/ml.

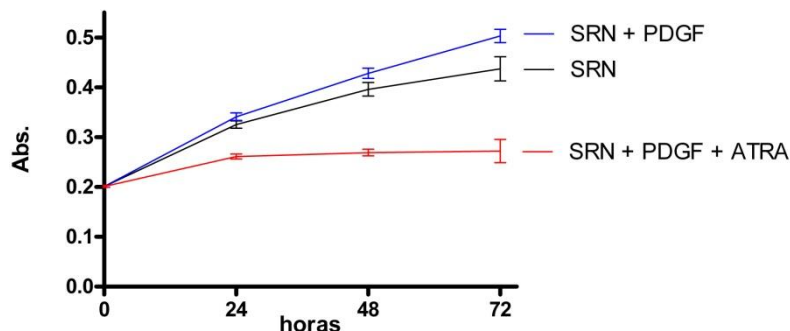


Figura 75. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y PDGF 5 ngr/ml. (MTT)

Nuevamente se observa un claro estímulo proliferativo por parte del Factor de Crecimiento a lo largo de toda la curva, siendo a las 48 y 72 horas de manera más evidente ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,05$).

Por otra parte, la adición de ATRA al medio frena de manera drástica la acción del PDGF con respecto a la proliferación celular. Este efecto inhibitorio del ATRA es visible desde las primeras 24 horas de su adición al medio, llegando a aplanar la curva en su totalidad ($p < 0,001$). En la tabla 64 se detallan los valores de Absorbancia.

Tabla 64. Absorbancia de los pocillos en función del medio (SRN 0,5%, ATRA 5 μ M, PDGF 5 ngr/ml) y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	0,201	0,325	0,396	0,437
SRN + PDGF	0,201	0,341	0,428	0,503
SRN + PDGF + ATRA	0,201	0,261	0,269	0,272

Se repitió la experiencia una vez más (fig. 76) obteniéndose idénticos resultados.

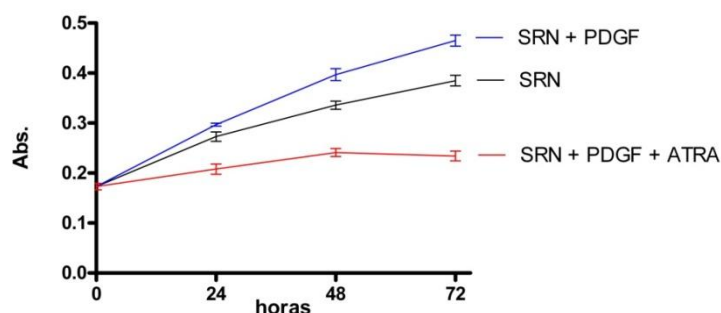


Figura 76. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y PDGF 5 ngr/ml. (MTT)

Los resultados obtenidos resultan muy similares a los anteriores, apreciándose el efecto proliferativo del Factor de Crecimiento (PDGF) y su completa inhibición al sumarle el efecto del ATRA en el medio de cultivo.

Desde las primeras 24 horas de crecimiento, el PDGF estimula el crecimiento de las células ACC-531 con respecto a las sin tratar y este efecto se prolonga en el tiempo durante toda la curva (A las 48 y 72 horas, $p < 0,001$).

El medio que contiene ATRA produce una drástica inhibición de la proliferación llegando a aplanar la curva (72 horas, SRN vs. SRN + PDGF; $p < 0,001$). Los datos obtenidos se muestran en la tabla 65.

Tabla 65. Absorbancia de los pocillos en función del medio (SRN 0,5%, ATRA 5 μ M, PDGF 5 ngr/ml) y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	0,173	0,273	0,336	0,385
SRN + PDGF	0,173	0,297	0,397	0,465
SRN + PDGF + ATRA	0,173	0,208	0,241	0,234

Se estudió también la concentración de PDGF 10 ngr/ml, como queda reflejado en la figura 77.

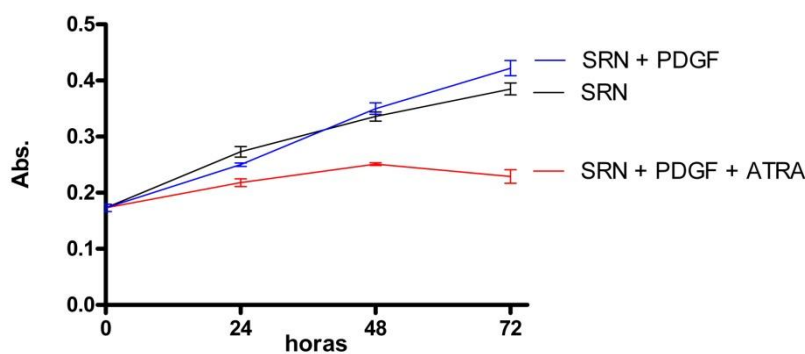


Figura 77. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y PDGF 10 ngr/ml. (MTT)

En esta ocasión, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (10 ngr/ml) sólo induce una mayor proliferación celular a partir de las 48 horas de su exposición ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,05$).

La adición de ATRA 5 μM al medio induce nuevamente una inhibición de la proliferación desde las primeras 24 horas de crecimiento ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$). Los datos mencionados se exponen en la tabla 66.

Tabla 66. Absorbancia de los pocillos en función del medio (SRN 0,5%, ATRA 5 μM , PDGF 10 ngr/ml) y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	0,173	0,273	0,336	0,385
SRN + PDGF	0,173	0,250	0,350	0,422
SRN + PDGF + ATRA	0,173	0,218	0,251	0,229

En último lugar, se utilizó el lector de placas xCELLigence para estudiar los efectos del ATRA 5 μM y del Factor PDGF a la concentración de 10 ngr/ml (fig. 78).

Se puede observar cómo, durante toda la curva de proliferación, los cultivos con el Factor de Crecimiento en el medio proliferan a mayor velocidad de la que lo hace el control. Por otra parte, los cultivos a los que se les había añadido ATRA al medio, el crecimiento celular se ve disminuido con respecto a los cultivos a los que no se les añadió ATRA.

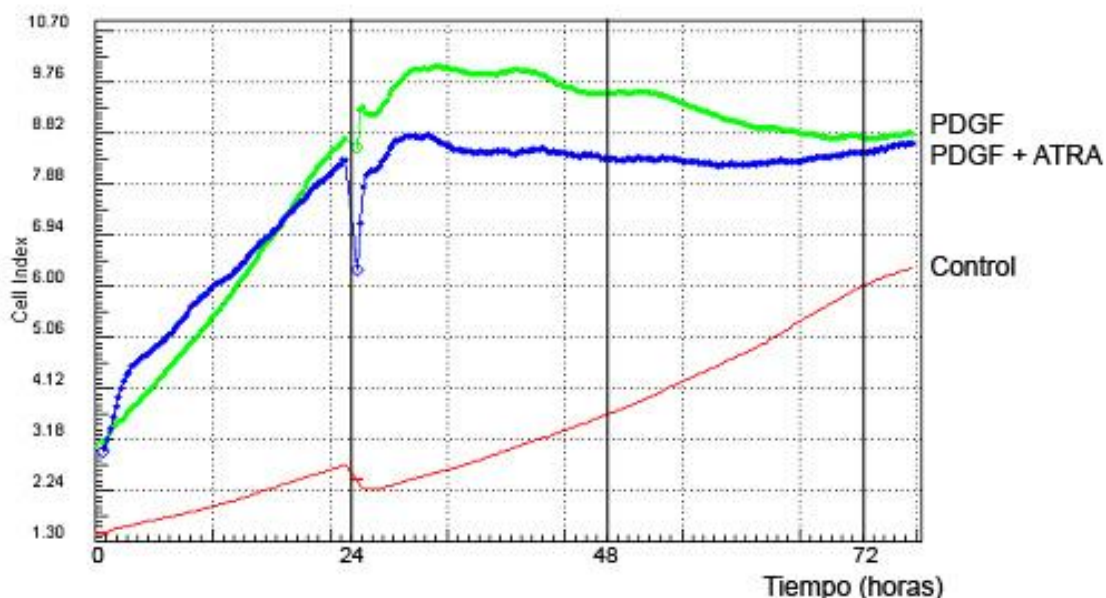


Figura 78. Efecto del ATRA 5 μM sobre la proliferación celular estimulada mediante PDGF 10 ngr/ml (Control: SRN 0,5%).

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb)

El siguiente Factor de Crecimiento a estudio fue el FGFb. Para ello se utilizaron las concentraciones de 2,5 ngr/ml, 5 ngr/ml y 10 ngr/ml que habían mostrado un mayor estímulo de la proliferación en las experiencias anteriores.

En primer lugar, se estudió el efecto del FGFb 2,5 ngr/ml con y sin ATRA 5 μ M mediante el uso del lector xCELLigence (fig. 79). El medio se complementó con SRN al 0,5%.

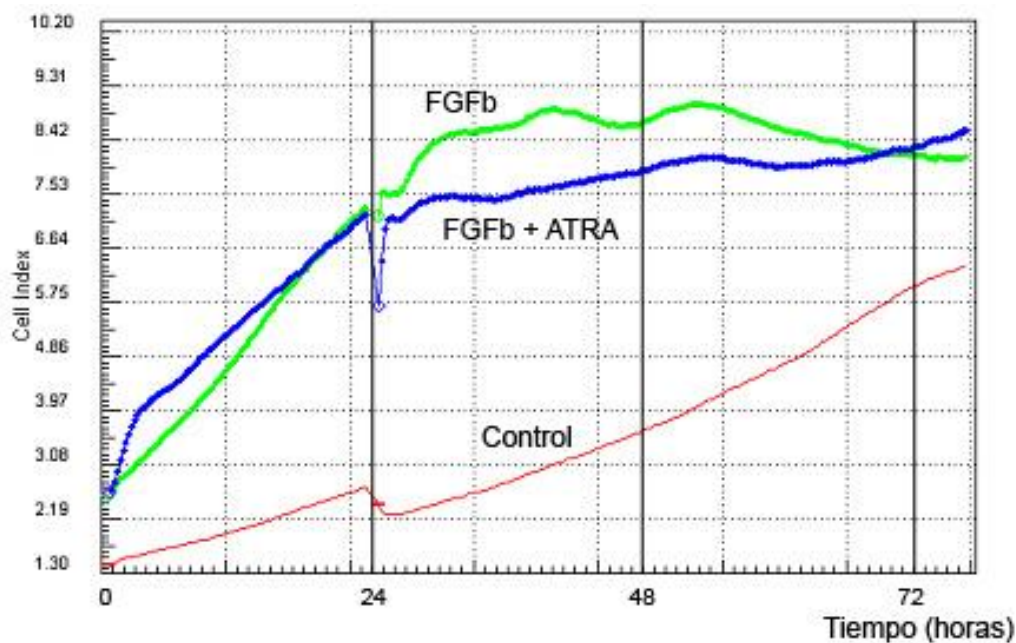


Figura 79. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular estimulada mediante FGFb 2,5 ngr/ml (Control: SRN 0,5%).

Nuevamente, los cultivos estimulados con el Factor de Crecimiento proliferan a un ritmo superior al control (SRN 0,5%) mientras que la adición conjunta del Factor de Crecimiento y ATRA reducen la proliferación del cultivo con respecto al no tratado con ATRA.

A continuación, se estudió el efecto producido por el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico a la concentración de 5 ngr/ml. En la figura 80 se muestra, mediante la técnica de MTT, el efecto combinado del FGFb 5 ngr/ml y el ATRA 5 μ M en medio complementado con SRN 0,5%.

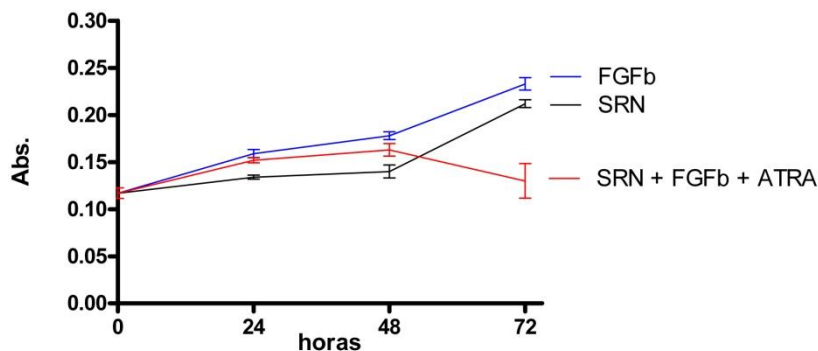


Figura 80. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y FGFb 5 ngr/ml. (MTT).

El Factor de Crecimiento FGFb estimula la proliferación de las células ACC-531 a lo largo de toda la curva, si bien no muestra significación estadística a las 72 horas (A las 24 y 48 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$ y $p < 0,01$ respectivamente). Por otra parte, la adición del fármaco retinoico redujo la proliferación celular llegando a valores inferiores al control a las 72 horas (ANOVA de 1 vía, $p < 0,0001$) (Tabla 67).

Tabla 67. Absorbancia de los pocillos en función del medio (SRN 0,5%, ATRA 5 μ M, FGFb 5 ngr/ml) y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	0,117	0,134	0,140	0,212
SRN + FGFb	0,117	0,159	0,178	0,233
SRN + FGFb + ATRA	0,117	0,152	0,163	0,130

Estos resultados se corroboraron mediante el uso del lector xCELLigence como muestra la figura 81.

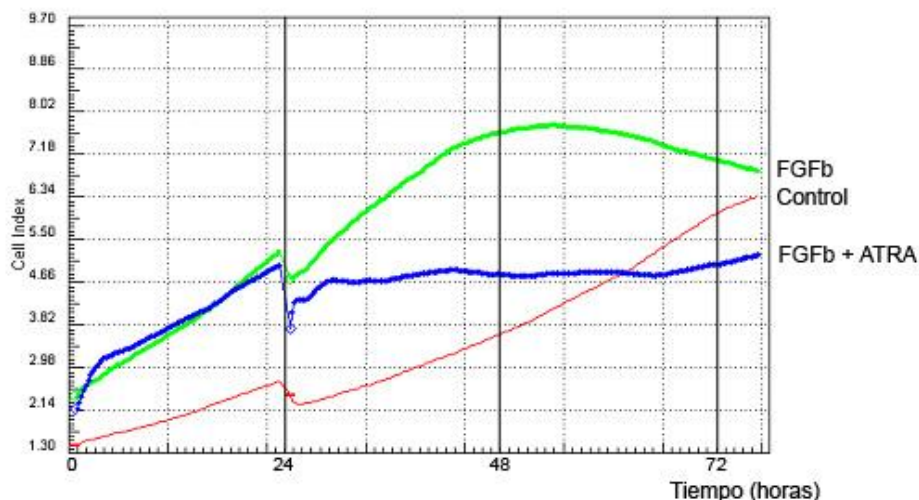


Figura 81. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular estimulada mediante FGFb 5 ngr/ml (Control: SRN 0,5%).

Se aprecia de manera notable el efecto esimulante del FGFb en los cultivos así como la inhibición producida por el fármaco ATRA a lo largo de toda la curva de crecimiento celular.

En último lugar se estudió la cocncetración más alta de FGFb: 10 ngr/ml (fig. 82).

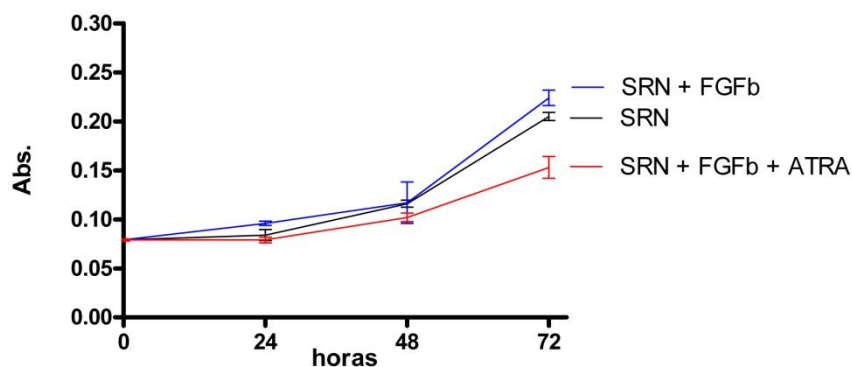


Figura 82. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y FGFb 10 ngr/ml. (MTT)

En la figura 82 podemos observar el efecto producido por el FGFb 10 ngr/ml sobre la proliferación celular de ACC-531 al adicionarlo al medio. El Factor de Crecimiento produce la estimulación del crecimiento celular si bien sólo alcanza significación a las 24 horas de su exposición ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,05$).

Sin embargo la adición de ATRA al medio con FGFb produce una inhibición del crecimiento celular por debajo incluso del control SRN 0,5% (A las 72 horas, Newman-Keuls Multiple Comparison Test; $p < 0,001$).

Tabla 68. Absorbancia de los pocillos en función del medio (SRN 0,5%, ATRA 5 μ M, FGFb 10 ngr/ml) y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	0,079	0,084	0,116	0,205
SRN + FGFb	0,079	0,096	0,117	0,224
SRN + FGFb + ATRA	0,079	0,079	0,102	0,153

Efecto del ATRA sobre el estímulo proporcionado por el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF)

Finalmente, se experimentó con el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF). Para este fin, se utilizó su óptima concentración (7,5 ngr/ml) en un medio complementado con SRN al 0,5% con y sin ATRA 5 μ M (fig. 83).

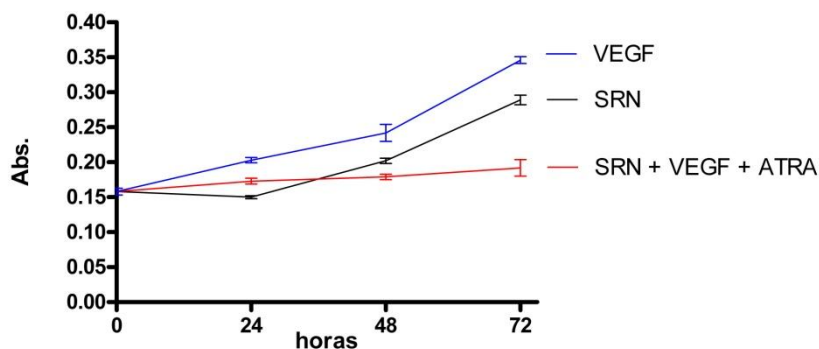


Figura 83. Efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular en medio complementado con SRN 0,5% y VEGF 7,5 ngr/ml. (MTT)

El Factor de Crecimiento VEGF estimula el crecimiento de las células ACC-531 desde las primeras 24 horas de exposición, en comparación a las células sin estímulo ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$). Sin embargo, la adición del ATRA a estos cultivos produce una inhibición de la proliferación celular lo que conlleva a un aplanamiento de la curva (A las 72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$) (tabla 69).

Tabla 69. Absorbancia de los pocillos en función del medio (SRN 0,5%, ATRA 5 μ M, VEGF 7,5 ngr/ml) y tiempo.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRN	0,158	0,150	0,202	0,289
SRN + VEGF	0,158	0,203	0,242	0,346
SRN + VEGF + ATRA	0,158	0,173	0,179	0,192

Estos resultados se colaboraron mediante el lector xCELLigence como muestra la figura 84.

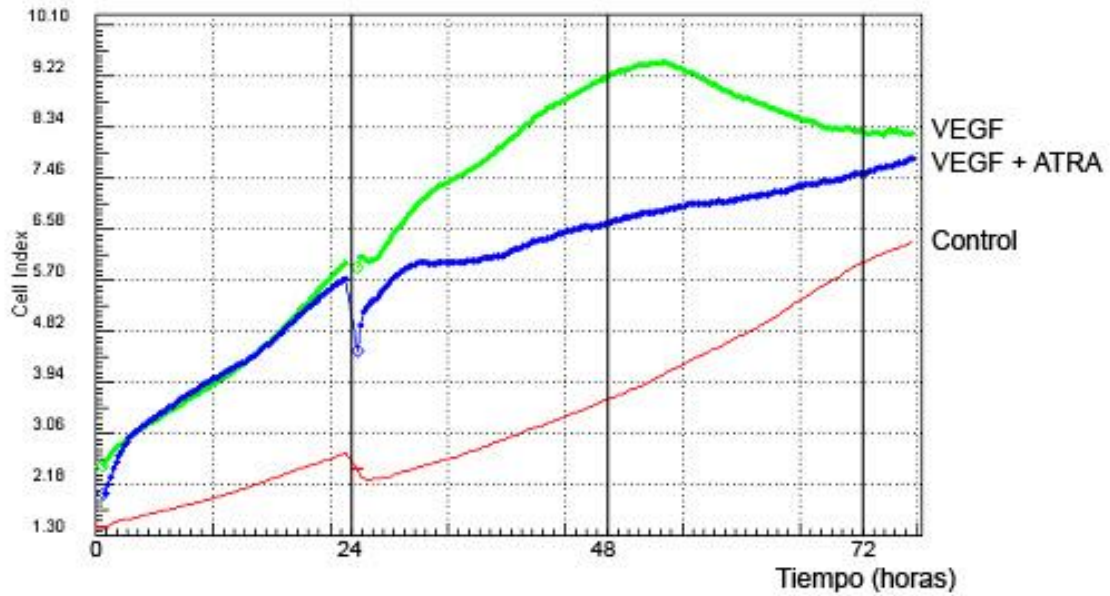


Figura 84. Efecto del ATRA 5 μM sobre la proliferación celular estimulada mediante VEGF 7,5 ngr/ml (Control: SRN 0,5%).

La lectura de los pocillos mediante el lector xCELLigence corrobora los resultados obtenidos anteriormente mediante la lectura por MTT. El factor produce un estímulo proliferativo que se continúa durante toda la curva mientras que la adición al mismo de ATRA 5 μM inhibe la proliferación, si bien no llega a los valores del control.

1.3.2. Comportamiento del cultivo tras exposiciones repetidas al fármaco

Un problema habitual en los tratamientos antiproliferativos es la inducción de resistencias. Por otra parte, al tratarse de un fármaco promotor de la diferenciación celular, cabe preguntarse si el efecto antiproliferativo inducido por dicha vía es o no duradero.

Por este motivo, diseñamos una serie de experiencias para estudiar los efectos que se manifestarían en las células tras exposiciones repetidas al ATRA.

Se contemplan dos series de experiencias. En la primera pre-tratamos a las células con ATRA durante tres días y a continuación se realizaron los estudios habituales de proliferación. En la segunda aumentamos el período de pre-tratamiento a seis días.

a) Curvas de crecimiento tras pre-tratamiento durante 3 días

Primeramente, pre-tratamos durante tres días las células en crecimiento en frascos T-75 con diferentes dosis de ATRA: 0,005 μM , 10 μM y 15 μM . Todas ellas con SFB 10%, siendo el control las células crecidas sin ATRA.

A los tres días de pre-tratamiento, las células se levantaron y se sembraron en cuatro placas de 96 pocillos y se dejaron 24 horas con medio RPMI + SFB 10% en ausencia de ATRA. Tras las 24 horas, a cada grupo de células pre-tratadas se les volvió a cambiar el medio por uno con SRN 0,5% sin ATRA o con ATRA 0,005 μM , 10 μM o 15 μM .

En la figura 85 se observa el resultado de cultivar las células con SRN 0,5% tras haber sido pre-cultivadas en medios con distintas concentraciones de ATRA.

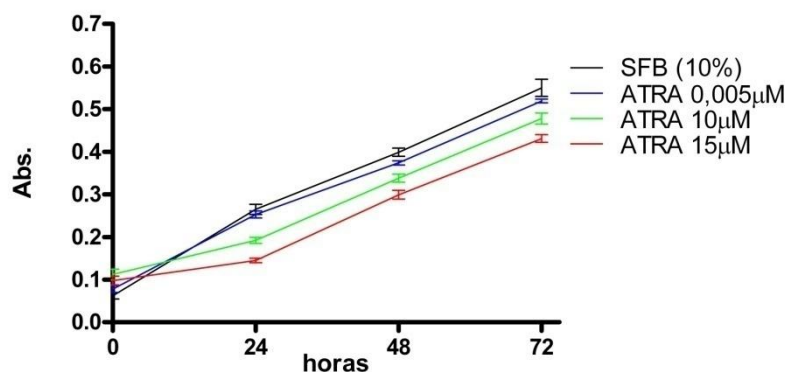


Figura 85. Crecimiento en SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA.

Los valores de las Absorbancia de la figura 85 se muestran en la tabla 70.

Tabla 70. Crecimiento en SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos con ATRA 0,005 μM , 10 μM o 15 μM . Control: SFB 10%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,062	0,265	0,399	0,550
ATRA 0,005 μM	0,078	0,253	0,374	0,519
ATRA 10 μM	0,112	0,192	0,338	0,478
ATRA 15 μM	0,098	0,145	0,299	0,431

Se observó como las células de adenocarcinoma de colon pre-tratadas con las concentraciones de ATRA sufrieron un retardo en su proliferación con respecto a las no pre-tratadas tras las primeras 24 horas (fig. 86 y 87) (ANOVA $p < 0.0001$).

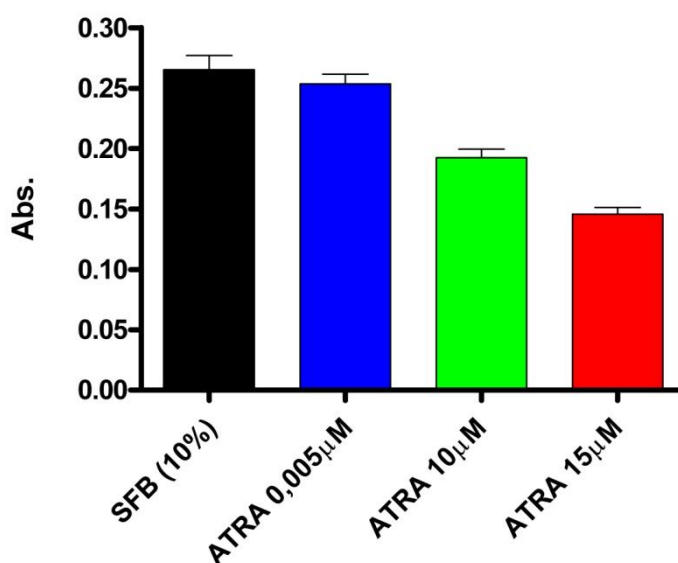


Figura 86. Crecimiento en SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 24 horas.

La concentración de ATRA 0,005 μM no mostró diferencias significativas con respecto al control ($p > 0.05$, Newman-Keuls Multiple Comparison Test) mientras que el resto de las concentraciones de ATRA disminuyeron la proliferación con respecto al control ($p < 0.001$).

En la figura 87 se representan los Índices de Proliferación de los cultivos a las 24 horas de crecimiento.

I.P. = Abs. a las n horas / Abs. a las n-24 horas

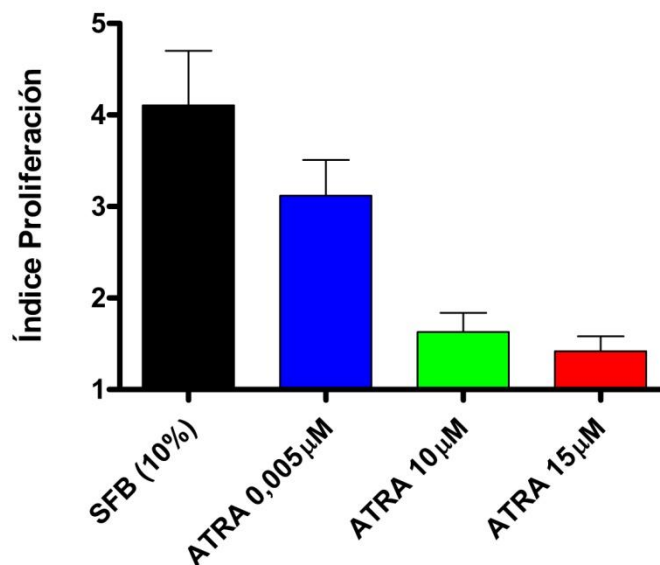


Figura 87. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos con ATRA a las 24 horas.

La ANOVA de 1 vía no muestra diferencias significativas entre el I.P. del control y del cultivo pre-tratado con ATRA 0.005 μM ($p > 0.05$) pero sí entre el cultivo control y los pre-tratados con ATRA 10 μM y 15 μM ($p < 0.001$). Los Índices de Proliferación de la figura 87 se detallan en la tabla 71.

Tabla 71. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 24 horas.

	Índice de Proliferación	D.S.
SFB (10%)	4,103	1,468
ATRA 0,005 μM	3,120	0,949
ATRA 10 μM	1,628	0,518
ATRA 15 μM	1,419	0,401

Sin embargo, a las 48 horas las células de adenocarcinoma de colon pre-tratadas con las concentraciones de ATRA mostraron un incremento en su proliferación superior al control (fig. 88).

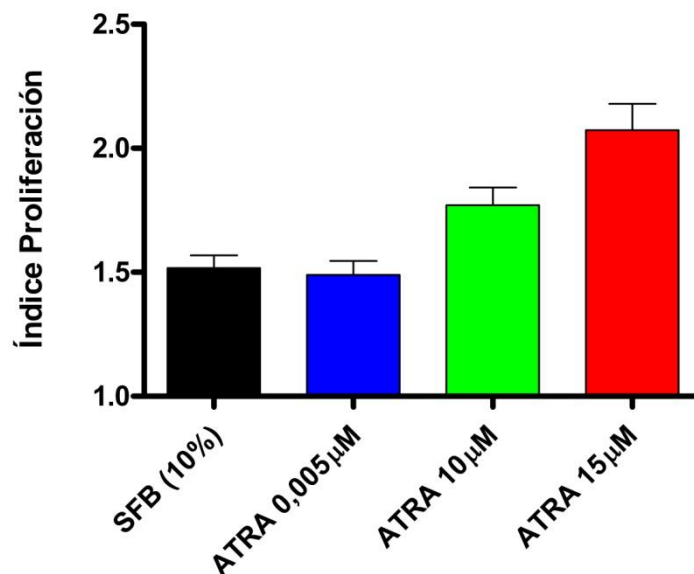


Figura 88. Índice de Proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 48 horas.

La ANOVA de una vía no muestra diferencias significativas entre el control y el cultivo con ATRA 0,005 µM (Newman-Keuls Multiple Comparison Test; $p > 0.05$) pero sí entre el control y los cultivos con ATRA 10 µM y 15 µM (Newman-Keuls Multiple Comparison Test; $p < 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente).

Tabla 72. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 48 horas.

	Índice de Prolifación	D.S.
SFB (10%)	1,517	0,126
ATRA 0,005 µM	1,489	0,138
ATRA 10 µM	1,771	0,173
ATRA 15 µM	2,073	0,262

Tal y como se muestra en la figura 89, a las 72 horas las células de adenocarcinoma de colon pre-tratadas con las concentraciones de ATRA mostraron una proliferación similar al control (ANOVA, $p = 0,5879$).

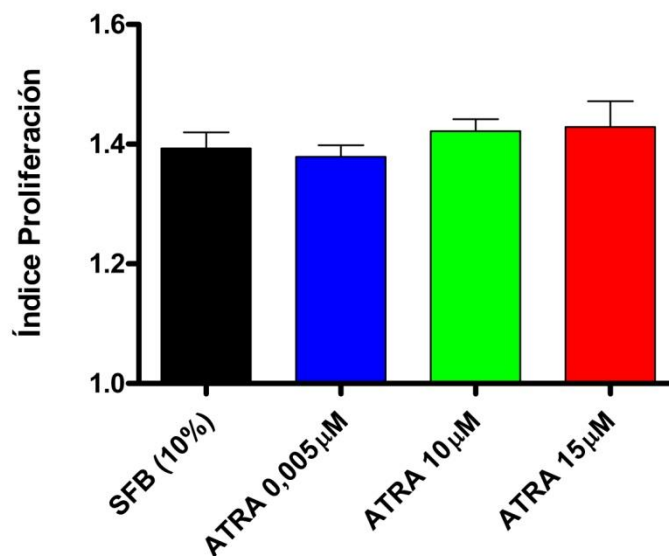


Figura 89. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 72 horas.

Ninguno de los cultivos de ACC-531 pre-cultivados con ATRA mostró diferencias significativas en su Índice de Proliferación con respecto al cultivo control ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p > 0,05$). Los valores de los índices de Proliferación a las 72 horas se muestran en la tabla 73.

Tabla 73. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 72 horas.

	Índice de Proliferación	D.S.
SFB (10%)	1,393	0,059
ATRA 0,005 μM	1,379	0,044
ATRA 10 μM	1,422	0,045
ATRA 15 μM	1,429	0,097

El tratamiento en placa de los cultivos con ATRA 0,005 μM no produjo un cambio significativo con respecto a lo visto anteriormente con el cultivo sin ATRA (fig. 90).

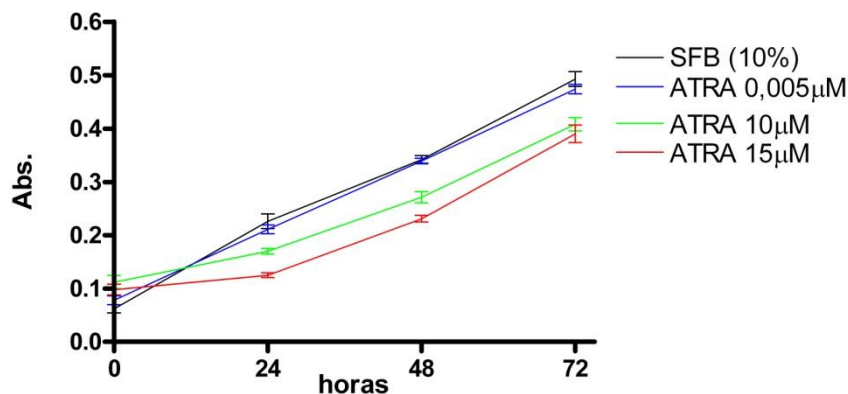


Figura 90. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 0,005 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA.

En la tabla 74 se muestran los valores de las Absorbancia de la figura 90.

Tabla 74. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 0,005 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,062	0,226	0,342	0,493
ATRA 0,005 μM	0,078	0,211	0,339	0,474
ATRA 10 μM	0,112	0,170	0,271	0,408
ATRA 15 μM	0,098	0,125	0,231	0,390

Sin embargo, la adición a los cultivos celulares de ATRA 10 μM al medio produce una disminución de la velocidad de proliferación de las células ACC-531 llegando incluso a mermar los cultivos a las 72 horas (fig. 91), si bien con las células pre-tratadas con ATRA 10 μM y 15 μM la caída es más pronunciada.

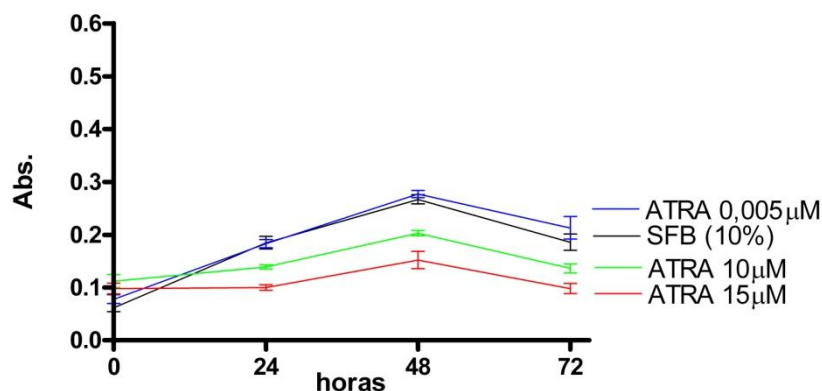


Figura 91. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 10 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA.

En la tabla 76 se muestran los valores de las Absorbancia correspondientes a la figura 91. Los valores decrecen a las 72 horas manteniéndose por encima del control los cultivos con ATRA 0,005 μM mientras que los tratados con ATRA 10 μM y 15 μM quedan por debajo ($p < 0,001$).

Tabla 75. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 10 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,062	0,185	0,267	0,186
ATRA 0,005 μM	0,078	0,183	0,277	0,213
ATRA 10 μM	0,112	0,139	0,203	0,136
ATRA 15 μM	0,098	0,100	0,152	0,098

En último lugar, en la figura 92 se muestra el efecto de cultivar las células control y pre-tratadas con medio al que se le añade ATRA 15 μM .

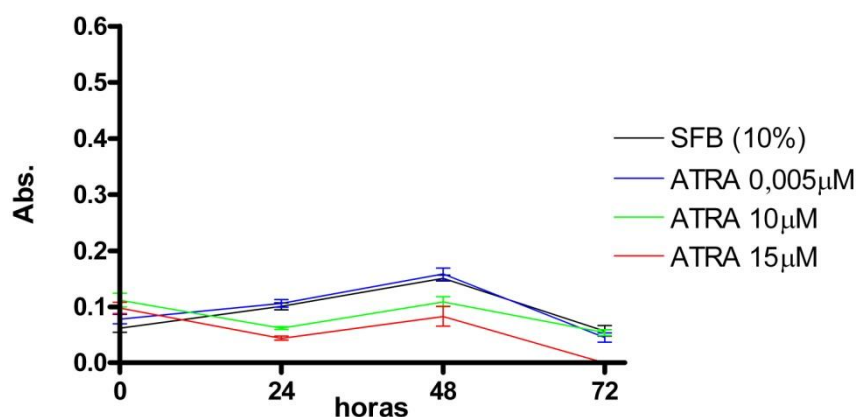


Figura 92. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 15 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA.

La inhibición del crecimiento resulta total llegando incluso a ser nocivo para las células pre-tratadas con ATRA 15 μM (tabla 76).

Tabla 76. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 15 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,062	0,101	0,151	0,057
ATRA 0,005 μM	0,078	0,106	0,158	0,045
ATRA 10 μM	0,112	0,062	0,109	0,054
ATRA 15 μM	0,098	0,044	0,083	-0,001

b) Curvas de crecimiento tras pre-tratamiento durante 6 días

Se decidió aumentar el tiempo de exposición al ATRA de las células en frasco hasta el sexto día. Las concentraciones del fármaco utilizadas fueron 0,05, 10 y 15 μM . Los resultados de su posterior crecimiento en medio complementado con SRN 0,5% (sin ATRA) se muestran en la figura 93.

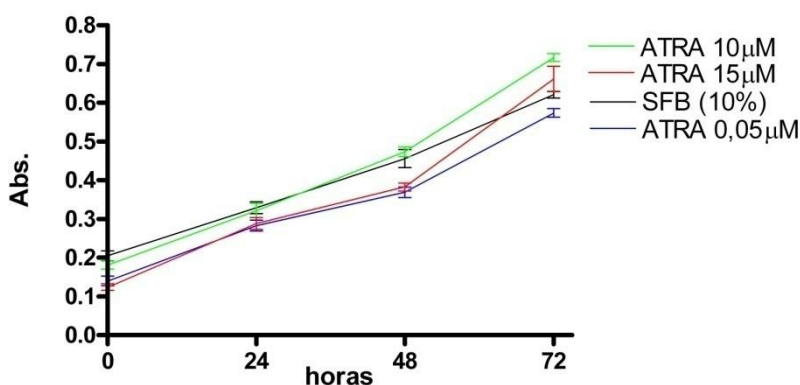


Figura 93. Crecimiento en SRN 0,5% tras pre-tratamientos de ATRA 0,05 μM , 10 μM y 15 μM .

Tabla 77. Crecimiento en SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA durante 6 días.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,205	0,329	0,456	0,621
ATRA 0,05 μM	0,140	0,283	0,369	0,574
ATRA 10 μM	0,181	0,322	0,474	0,717
ATRA 15 μM	0,124	0,288	0,383	0,662

Tras las 24 primeras horas, no observamos el efecto visto anteriormente (con pre-tratamiento de 3 días). Al aumentar el tiempo de pre-tratamiento con ATRA de 3 a 6 días, la proliferación celular es similar entre el control y los pre-tratados con ATRA. (fig. 94).

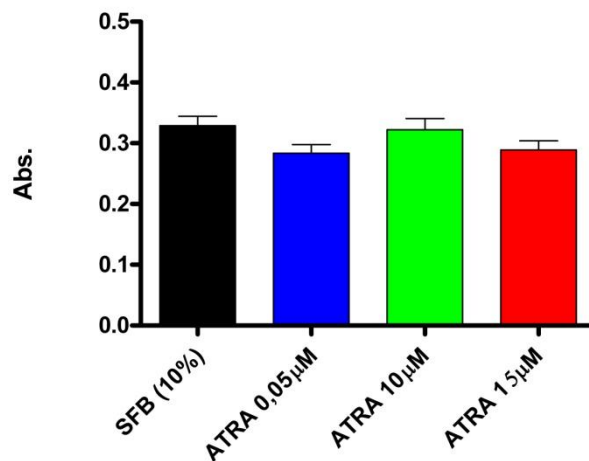


Figura 94. Crecimiento en SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 24 horas.

Como se observa en la figura 94, no hay diferencias significativas entre los cultivos durante las primeras 24 horas de crecimiento en placa (ANOVA, $p=0,1287$).

A las 48 horas de crecimiento continúan sin producirse diferencias entre los distintos cultivos celulares. Atendiendo al Índice de Proliferación, como se muestra en la figura 95, la ANOVA de 1 vía da un valor de $p=0,4223$ (Tabla 78).

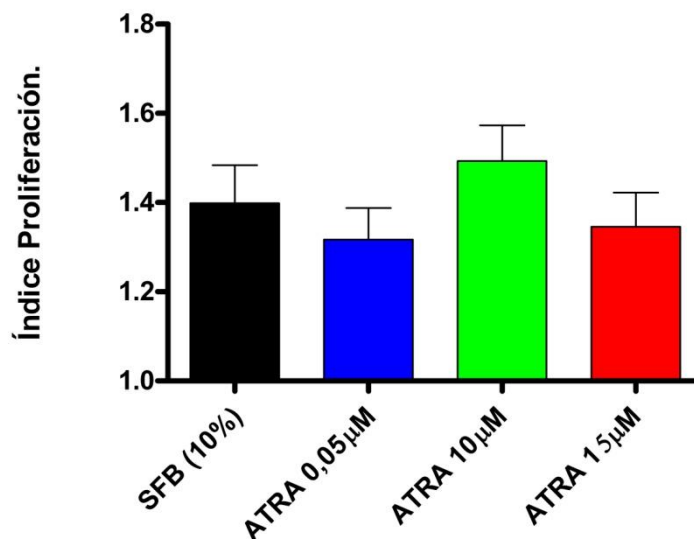
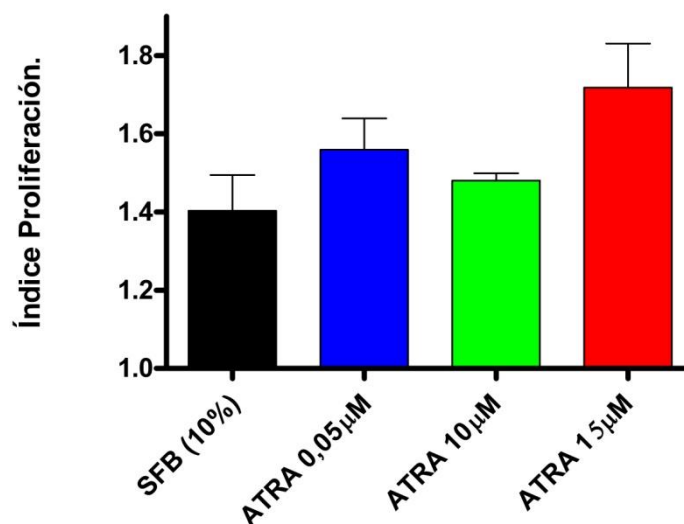


Figura 95. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 48 horas.

Tabla 78. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA durante 6 días a las 48 horas.

	Índice de Prolifارación	D.S.
SFB (10%)	1,398	0,208
ATRA 0,05 μM	1,317	0,173
ATRA 10 μM	1,493	0,195
ATRA 15 μM	1,345	0,189

Es a partir de las 72 horas de crecimiento en placa cuando se observan diferencias entre los distintos cultivos celulares. Como se puede apreciar en la figura 96 se produce nuevamente un aumento del Índice de Prolifارación de las células pre-tratadas con respecto al control si bien, no alcanza significación estadística (ANOVA, $p=0,0883$).

**Figura 96.** Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 72 horas.**Tabla 79.** Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% tras diversos pre-tratamientos de ATRA durante 6 días a las 72 horas.

	Índice de Prolifارación	D.S.
SFB (10%)	1,403	0,204
ATRA 0,05 μM	1,559	0,179
ATRA 10 μM	1,480	0,043
ATRA 15 μM	1,718	0,253

La adición al medio de los cultivos de ATRA 0,05 μ M no produjo un cambio significativo en el comportamiento de las células como queda reflejado en la figura 97 (tabla 80).

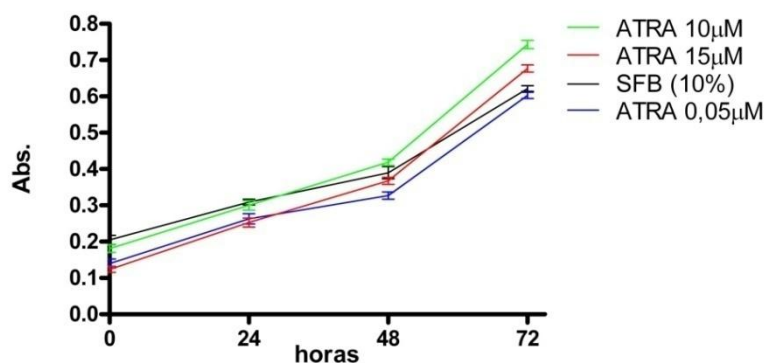


Figura 97. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 0,05 μ M tras pre-tratamientos de ATRA.

Tabla 80. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 0,005 μ M tras diversos pre-tratamientos de ATRA durante 6 días.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,205	0,309	0,390	0,622
ATRA 0,05 μM	0,140	0,263	0,327	0,603
ATRA 10 μM	0,181	0,300	0,419	0,743
ATRA 15 μM	0,124	0,253	0,368	0,677

No obstante, como queda reflejado en la figura 98, al centrarnos en el Índice de Proliferación a las 72 horas se observa un mayor crecimiento de las células tratadas con ATRA con respecto al control SFB 10% (ANOVA de 1 vía; $p=0,0114$).

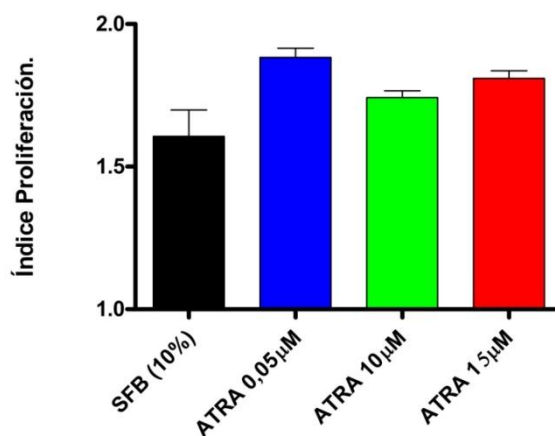


Figura 98. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% + ATRA 0,05 μ M tras diversos pre-tratamientos de ATRA a las 72 horas.

Los valores de las Absorbancia de la figura 98 se muestran en la tabla 81.

Tabla 81. Índice de proliferación celular en medio con SRN 0,5% + ATRA 0,05 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA durante 6 días a las 72 horas.

	Índice de Proliferación	D.S.
SFB (10%)	1,606	0,206
ATRA 0,05 μM	1,883	0,073
ATRA 10 μM	1,742	0,054
ATRA 15 μM	1,810	0,058

Aumentando la concentración del fármaco ATRA a 10 μM , se observa como las curvas de crecimiento celular se aplanan llegando incluso a caer a las 72 horas (fig. 99; tabla 83), sin diferencias significativas entre ellas ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,05$).

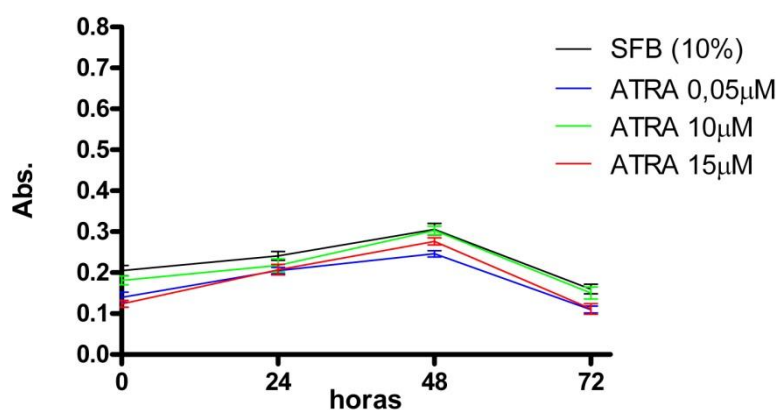


Figura 99. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 10 μM tras pre-tratamientos de ATRA 0,05 μM , 10 μM y 15 μM .

Tabla 82. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 10 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA durante 6 días.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,205	0,241	0,306	0,160
ATRA 0,05 μM	0,140	0,205	0,246	0,110
ATRA 10 μM	0,181	0,218	0,303	0,150
ATRA 15 μM	0,124	0,207	0,276	0,112

Finalmente, se incrementó la concentración de ATRA hasta 15 μM . (fig. 100). Se observa como la concentración de ATRA 15 μM resulta nociva de manera drástica para las células ACC-531, independientemente del pre-tratamiento que hayan llevado (tabla 83).

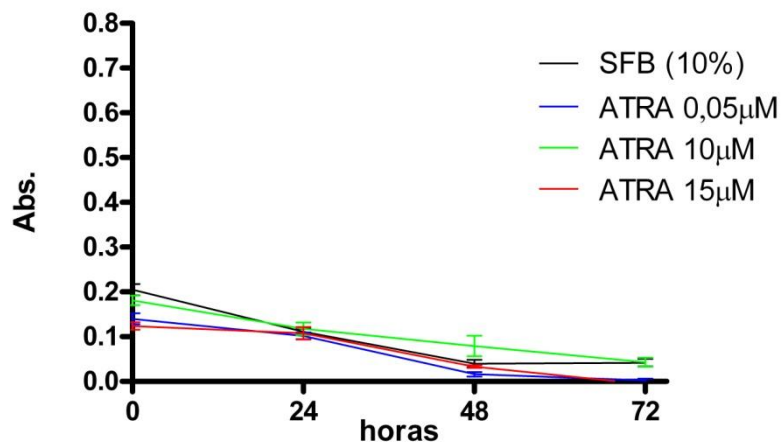


Figura 100. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 15 μM tras pre-tratamientos de ATRA 0,05 μM , 10 μM y 15 μM .

Tabla 83. Crecimiento en SRN 0,5% + ATRA 15 μM tras diversos pre-tratamientos de ATRA durante 6 días.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SFB (10%)	0,205	0,111	0,040	0,042
ATRA 0,05 μM	0,140	0,102	0,016	0,002
ATRA 10 μM	0,181	0,118	0,079	0,043
ATRA 15 μM	0,124	0,108	0,033	0,000

1.4. Efecto del 5-FU sobre cultivos de ACC-531

Como hemos señalado previamente, en este apartado se presentan sucesivamente los ensayos sobre el comportamiento de nuestra línea celular ante la presencia de 5-FU en dosis terapéuticas dentro del cultivo en diferentes situaciones:

- Cultivos estándar: al medio de cultivo se le añade un porcentaje de suero que aporta moléculas imprescindibles para el desarrollo de las células. Se distinguen dos situaciones:
 - Suero bobino-fetal: es el estándar para cultivos celulares (SBF)
 - Suero obtenido de ratas no tratadas (SRN)
- Cultivos estimulados
 - Suero obtenido de ratas sometidas a hepatectomía del 40 % (SRH)
 - Factores de Crecimiento

1.4.1. Efecto del 5-FU sobre cultivos suplementados con SFB

En un primer paso, se buscó la concentración de 5-FU a la que se reduce la proliferación celular del control a la mitad. Para ello, se ensayaron las concentraciones de 5-FU de 0,5, 5 y 50 $\mu\text{gr/ml}$ en medio complementado con SFB 20% (recomendado por la casa comercial) y medido mediante hemocitómetro. Los resultados se muestran en la figura 101.

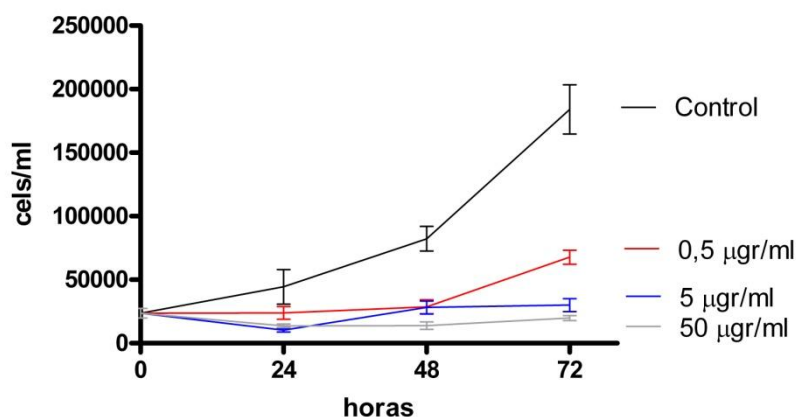


Figura 101. Efecto del 5-FU 0,5, 5 y 50 $\mu\text{gr/ml}$ en cultivos complementados con SFB 20% (cuantificado con hemocitómetro).

A las 24 horas, los cultivos con 0,5 $\mu\text{gr/ml}$, no muestran diferencias significativas con respecto al control; no obstante, a las 48 horas y 72 horas el 5-FU frena la proliferación celular quedando ésta reducida al 27,52% de la del control (tabla 85).

Por su parte, las concentraciones de 5 $\mu\text{gr/ml}$ y 50 $\mu\text{gr/ml}$ llegan a aplanar casi por completo las curvas proliferativas de los cultivos (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test" ; $p < 0,001$).

Tabla 84. Número de células por ml en función de la concentración de 5-FU en el medio de cultivo, en cultivos complementados con SFB 20%.

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
Control	23.611	44.444	82.222	184.074
5-FU 0,5 $\mu\text{gr/ml}$	23.611	23.889	28.704	67.778
5-FU 5 $\mu\text{gr/ml}$	23.611	10.370	28.148	30.000
5-FU 50 $\mu\text{gr/ml}$	23.611	13.704	13.889	19.815

A la vista de estos resultados, se optó por repetir la experiencia pero con concentraciones menores de 5-FU: 0,25, 0,5 y 1 $\mu\text{gr/ml}$ (fig. 102).

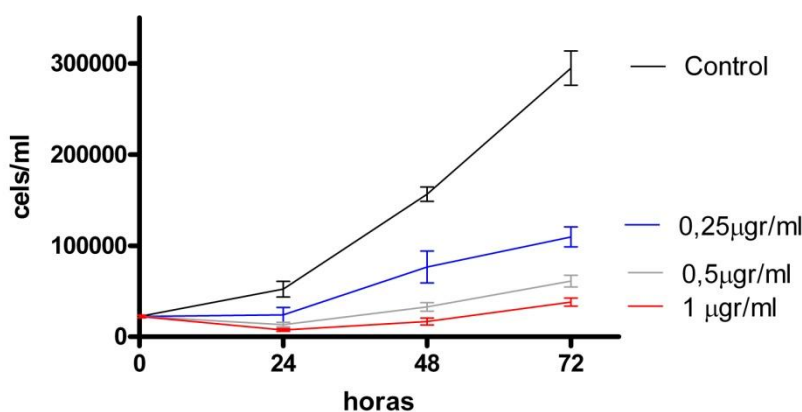


Figura 102. Efecto de bajas concentraciones de (5-FU 0,25, 0,5 y 1 $\mu\text{gr/ml}$) en cultivos suplementados con SFB 20% (cuantificado mediante hemocitómetro).

De manera similar a como ocurrió en la experiencia anterior, la proliferación celular se haya disminuida a lo largo de toda la curva con las tres concentraciones de 5-FU estudiadas (ANOVA a las 72 horas $P < 0,0001$).

Tal y como puede apreciarse en la figura 102, el efecto antiproliferativo del 5-FU en nuestros cultivos ha resultado ser dosis-dependiente.

Con la menor de las concentraciones estudiadas se logra reducir en más de un 50% (67,95%) el recuento celular al final de la experiencia (72 horas), pero sin que se anule por completo la proliferación celular.

En cambio, con las otras dos concentraciones ensayadas se obtienen gráficas casi planas, bloqueando de manera casi absoluta la división celular en nuestros cultivos (tabla 85).

Tabla 85. Número de células por ml en función de la concentración de 5-FU en el medio de cultivo, en cultivos suplementados con SFB 20%.

	TIEMPO (Horas)			
	0	24	48	72
Control	22.292	52.222	156.481	294.815
5-FU 0,25 μgr/ml	22.292	24.074	76.481	109.630
5-FU 0,5 μgr/ml	22.292	13.333	32.778	61.111
5-FU 1 μgr/ml	22.292	7.407	16.667	37.963

1.4.2. Efecto del 5-FU sobre cultivos suplementados con SRN

En un siguiente paso, se estudió el efecto del 5-FU sobre cultivos enriquecidos con suero de rata normal.

Se utilizaron las concentraciones de SRN 2,5% y 0,5% ya que fueron las dos concentraciones en las que, sin llegar a saturar los pocillos, las células mostraron mayor proliferación con SRH que con SRN. Por otra parte, la concentración de SRN 0,5% es la empleada con los Factores de Crecimiento. Mediante la adición del 5-FU se pretende anular la estimulación de la proliferación celular en cultivos enriquecidos con SRH o con los Factores de Crecimiento, por lo que, previamente, se estudiarán los efectos de su adición a las células sin estímulos proliferativos.

De manera similar a lo realizado en el apartado anterior, se he estudiado el comportamiento de nuestra línea celular ante diversas concentraciones de 5-FU (0,3, 0,4 y 0,5 μ gr/ml) en el cultivo enriquecido con SRN 2,5%. El recuento celular a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas se realizó mediante la técnica de MTT (fig. 103).

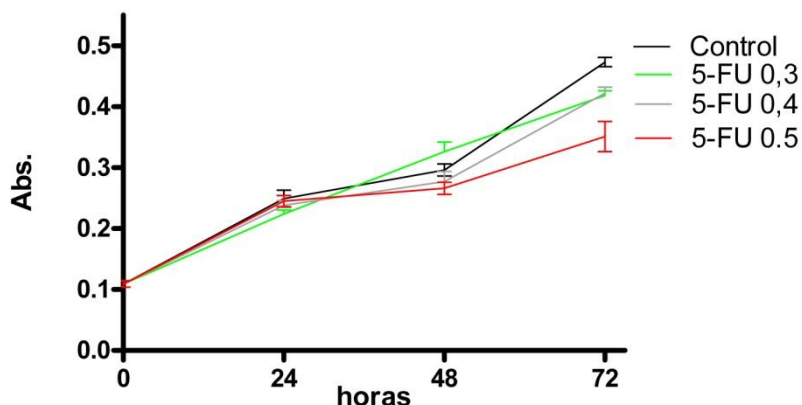


Figura 103. Efecto de concentraciones bajas de 5-FU (0,3, 0,4 y 0,5 µg/ml) en cultivos suplementados con SRN 2,5% (cuantificado mediante MTT).

En esta ocasión, al sustituir el SFB de los cultivos por SRN el 5-FU parece mostrar una menor capacidad de inhibición de la proliferación celular.

No se observan grandes diferencias entre los cultivos hasta las 72 horas de proliferación en las que se da un efecto dosis-dependiente del 5-FU, siendo la dosis más alta de 5-FU la que mayor inhibición de la proliferación celular produce (Tabla 86).

Tabla 86. Efecto de concentraciones bajas de 5-FU en cultivos complementados con SRN 2,5%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,109	0,249	0,296	0,473
5-FU 0,2	0,109	0,242	0,336	0,489
5-FU 0,3	0,109	0,224	0,326	0,418
5-FU 0,4	0,109	0,238	0,277	0,422
5-FU 0,5	0,109	0,245	0,266	0,351

Una vez visto el efecto del 5-FU sobre cultivos estimulados con 2,5% de SRN, pasamos a estudiar el efecto del 5-FU sobre las células cultivadas con tan sólo 0,5% de SRN ya que fue nuestro control en los cultivos con Factores de Crecimiento.

En la figura 104 se muestra el resultado de la adición al medio celular de 5-FU 0,3, 0,4 y 0,5 µg/ml midiendo la proliferación mediante la técnica de MTT.

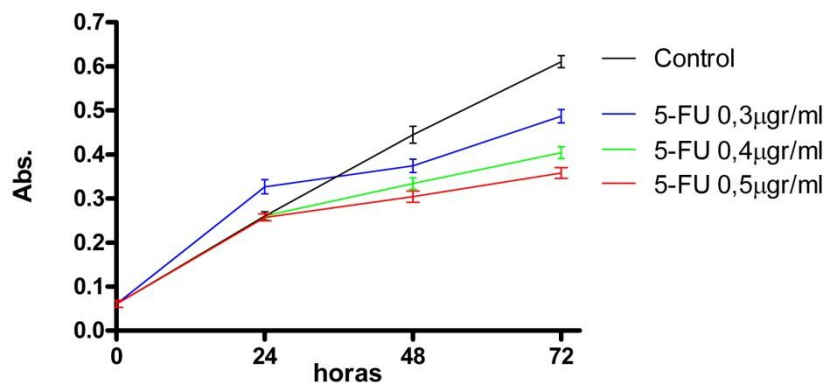


Figura 104. Efecto de concentraciones bajas de 5-FU (0,3, 0,4 y 0,5 µg/ml) en cultivos suplementados con SRN 2,5% (cuantificado mediante MTT).

Como se deduce de la figura 27, las tres concentraciones de 5-FU producen un efecto inhibitorio de la proliferación de las células ACC-531 a las 48 y a las 72 horas, que resulta ser dosis-dependiente (ANOVA de 1 vía, $p < 0,0001$).

La concentración más baja de 5-FU alcanza valores superiores al control a las 24 horas ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,01$) mientras que a las 48 horas y 72 horas la proliferación celular se inhibe.

Las dos concentraciones más altas de 5-FU no muestran diferencias significativas a las 24 horas con respecto al cultivo control ($p > 0,05$) mientras que a las 48 horas y 72 horas se produce una clara inhibición ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$). En la tabla 87 se detallan los valores de las Absorbancia de la figura 104.

Tabla 87. Efecto del 5-FU en cultivos suplementados con SRN 0,5%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,0605	0,260	0,445	0,611
5-FU 0,3	0,0605	0,327	0,374	0,487
5-FU 0,4	0,0605	0,261	0,334	0,404
5-FU 0,5	0,0605	0,257	0,304	0,358

Para corroborar los datos obtenidos, se optó por repetir la experiencia anterior con las dos dosis más altas de 5-FU (0,4 y 0,5 µg/ml) y SRN al 0,5%. Las medidas de proliferación celular se realizaron mediante la técnica de MTT, y los valores obtenidos se representan en la figura 105.

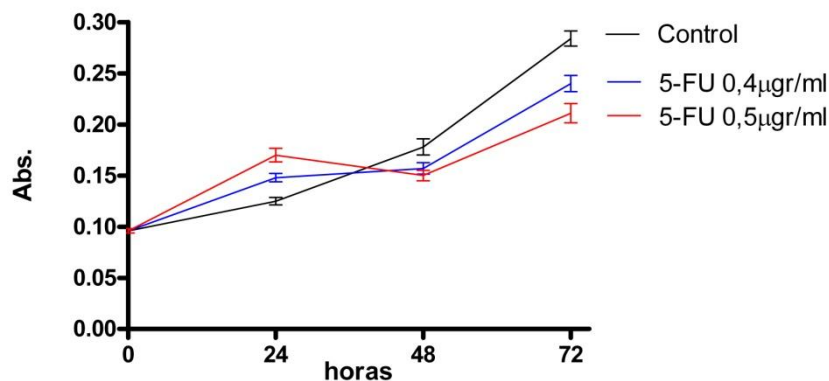


Figura 105. Efecto del 5-FU 0,4 y 0,5µgr/ml en cultivos suplementados con SRN 0,5% (cuantificación realizada mediante MTT).

Se vuelve a observar el efecto inhibitor de la proliferación celular del fármaco a partir de las 24 horas de su exposición.

Tras las primeras 24 horas, los cultivos con el quimioterápico 0,4 µgr/ml y 0,5 µgr/ml proliferan en menor medida que el control llegando a valores inferiores a este (a las 48 horas: $p < 0,05$ y a las 72 horas: $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente). Los valores de las Absorbancia se muestran en la tabla 88.

Tabla 88. Efecto del 5-FU en cultivos suplementados con SRN 0,5%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,096	0,125	0,178	0,284
5-FU 0,4	0,096	0,148	0,157	0,240
5-FU 0,5	0,096	0,170	0,150	0,211

Por otra parte, en las figuras obtenidas anteriormente, a las 24 horas parece darse un efecto estimulante por parte de las dosis más bajas de 5-FU que se contrapone con lo esperado. Con el fin de esclarecerlo, se realizó una experiencia por triplicado en la que se utilizó la concentración de 5-FU 0,4 µgr/ml y SRN al 0,5%. La medida se realizó mediante la técnica de MTT (fig. 106).

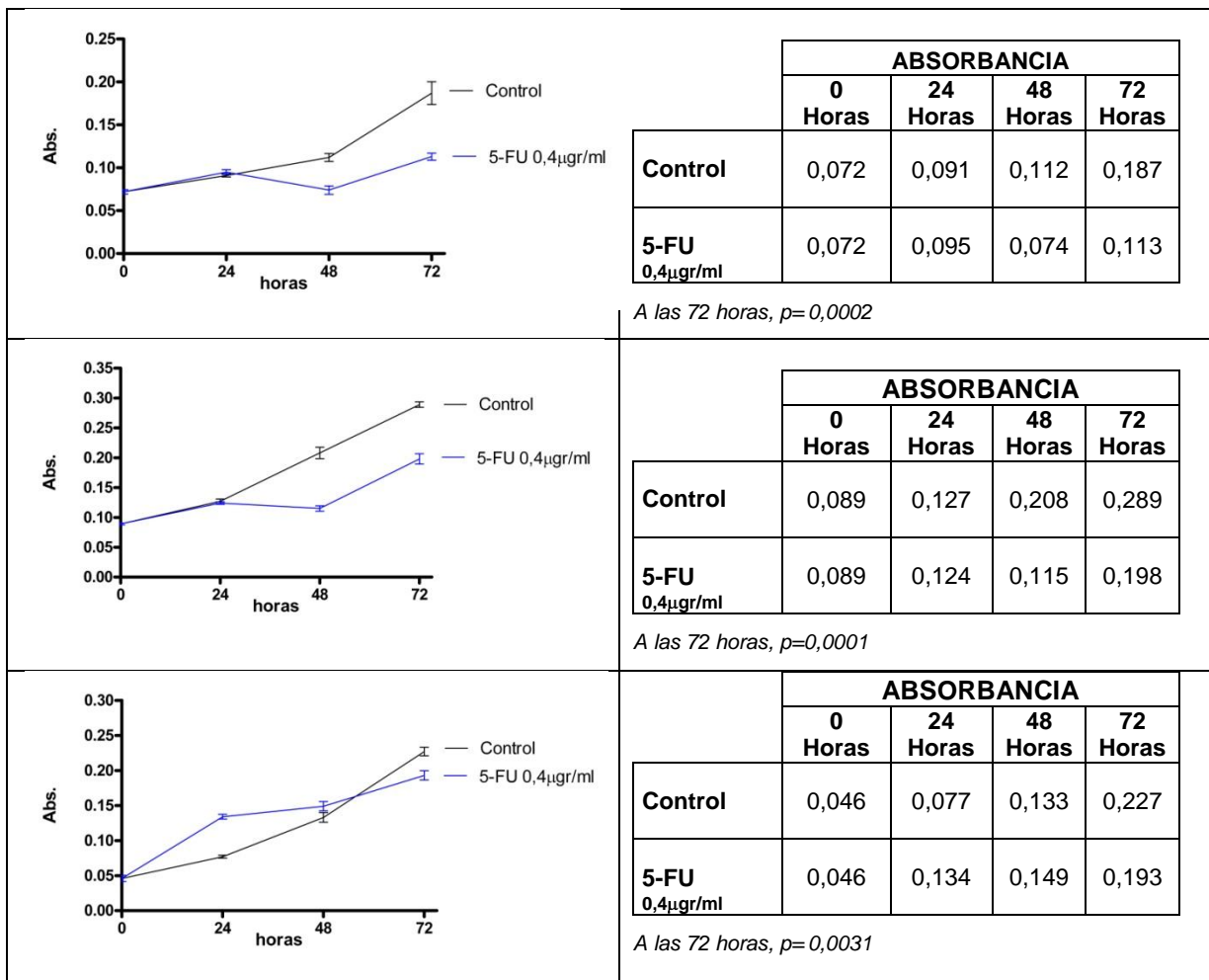


Figura 106. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos complementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

Salvo en la tercera figura, no se repite el efecto del 5-FU mencionado sobre las células ACC.531; si bien, tampoco produce una disminución de la proliferación celular.

A las 72 horas, todos los cultivos se ven afectados por el 5-FU, observándose una disminución de la proliferación con respecto a los cultivos controles (72 horas, 5-FU vs. Control; "Unpaired t test" $p < 0,01$).

Dado que el resultado final de las experiencias es la inhibición de la proliferación celular por parte del 5-FU, no se tomará en cuenta el efecto del fármaco en las primeras 24 horas.

1.4.3. Efecto del 5-FU sobre cultivos complementados con SRH

A continuación se estudió el efecto que tendría el 5-FU sustituyendo el SRN por el SRH. El objetivo es comprobar si el efecto inhibitorio de la proliferación de las células ACC-531 por parte del 5-FU se repite al estimular las células con SRH.

En la figura 107 se observa el efecto de la adición al medio de cultivo de 5-FU 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 $\mu\text{gr/ml}$, complementado con SRH al 2,5% (medición realizada mediante la técnica de MTT).

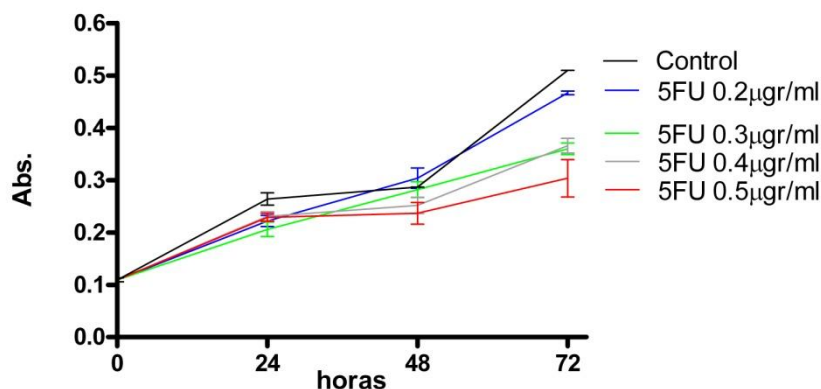


Figura 107. Efecto del 5-FU (0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 $\mu\text{gr/ml}$) en cultivos suplementados con SRH 2,5% (cuantificación realizada mediante MTT).

Desde las primeras 24 horas de exposición al fármaco 5-FU, las células muestran una reducción de la proliferación con respecto al cultivo control que se mantiene durante toda la curva proliferativa (24 horas, ANOVA de 1 vía $p=0,0346$).

Por otra parte, observando los cultivos a las 72 horas, se deduce que el efecto del 5-FU es dosis-dependiente, siendo la concentración más alta la que mayor inhibición del crecimiento celular produce. Los valores de las Absorbancia obtenidos se muestran en la tabla 89.

Tabla 89. Efecto del 5-FU en cultivos complementados con SRH 2,5%.

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,109	0,264	0,287	0,510
5-FU 0,2 $\mu\text{gr/ml}$	0,109	0,222	0,304	0,467
5-FU 0,3 $\mu\text{gr/ml}$	0,109	0,206	0,282	0,360
5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$	0,109	0,231	0,252	0,366
5-FU 0,5 $\mu\text{gr/ml}$	0,109	0,229	0,237	0,304

Dado que 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ en esta experiencia pareció resultar la concentración óptima, repetimos la experiencia cuantificando los recuentos con el NucleoCounter (fig. 108).

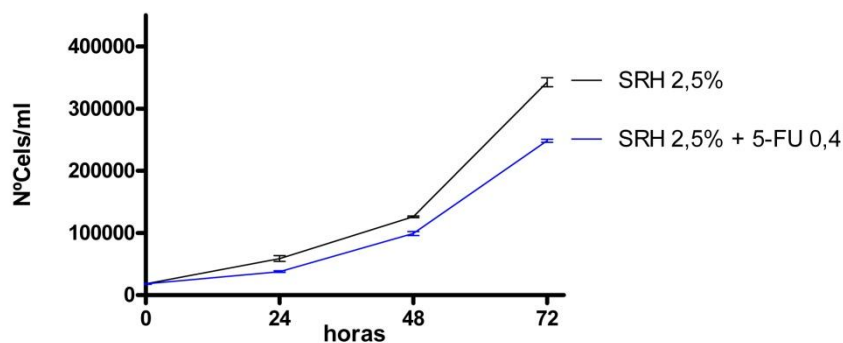


Figura 108. Efecto del 5-FU (0,4 µgr/ml) en cultivos suplementados con SRH 2,5% (cuantificación realizada mediante Nucleocounter).

Resulta evidente el efecto inhibitor de la proliferación celular del 5-FU sobre los cultivos de ACC-531 desde las primeras 24 horas de su exposición (tabla 90).

Tabla 90. Efecto del 5-FU sobre la proliferación celular en cultivos suplementados con SRH 2,5%.

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
SRH 2,5%	18.225	58.725	126.000	342.375
SRH 2,5% + 5-FU 0,4µgr/ml	18.225	37.800	99.000	248.325

Idéntico resultado se obtuvo cuando la medición se realizó con el lector de placas en tiempo real xCELLigence (fig. 109)

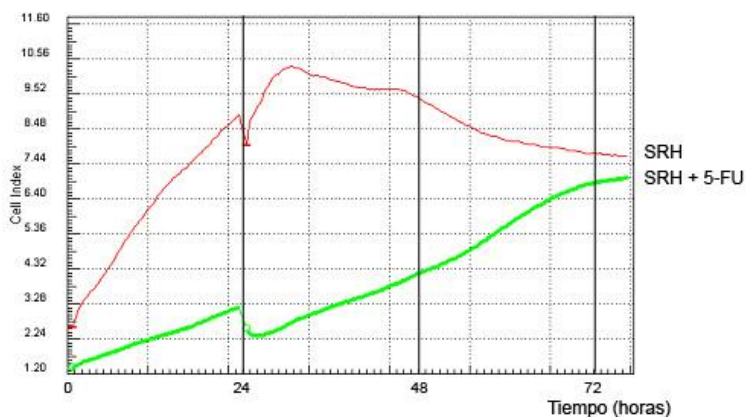


Figura 109. Efecto del 5-FU (0,4 µgr/ml) en cultivos suplementados con SRH 2,5% (valorado mediante el lector xCELLigence).

Nuevamente, los cultivos celulares sometidos al efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml ven reducida su proliferación celular con respecto al control.

Una vez visto el efecto del 5-FU en cultivos estimulados con la dosis alta de SRH (2,5%), pasamos a estudiar los efectos en cultivos suplementados con 0,5%, ya que es la concentración de suero control en los posteriores estudios con Factores de Crecimiento. En la figura 110 se representa el resultado de la adición de 5-FU 0,3, 0,4 y 0,5 $\mu\text{gr/ml}$ al medio de cultivo suplementado con SRH 0,5%, medido mediante la técnica de MTT.

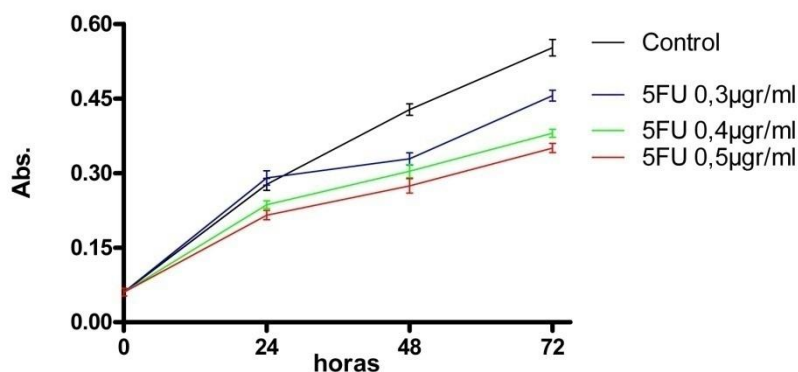


Figura 110. Efecto del 5-FU en cultivos suplementados con SRH 0,5% (cuantificado mediante MTT).

A las 24 horas de su adición al medio, la concentración de 0,3 $\mu\text{gr/ml}$ no produce efecto significativo sobre la proliferación de las células en comparación a los controles ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p > 0,05$). Sin embargo, tanto a las 48 como a las 72 horas, el efecto inhibitor del crecimiento celular se hace notable ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test", $p < 0,001$).

Por su parte, la concentración de 5-FU más alta produce una inhibición celular significativa desde las primeras 24 horas, efecto que se mantiene a lo largo de toda la curva ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test", $p < 0,001$).

Finalmente, la concentración 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ provoca un efecto intermedio en las células. En la tabla 91 se detallan los valores de las Absorbancia de la figura 110.

Tabla 91. Efecto del 5-FU en cultivos suplementados con SRH 0,5% .

	ABSORBANCIA			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control	0,061	0,277	0,428	0,552
5-FU 0,3 $\mu\text{gr/ml}$	0,061	0,290	0,329	0,456
5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$	0,061	0,236	0,304	0,380
5-FU 0,5 $\mu\text{gr/ml}$	0,061	0,215	0,274	0,350

1.4.4 Efecto del 5-FU sobre el HGF

El primer Factor de Crecimiento en ser estudiado fue el Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF). Para ello se realizaron tres experiencias en las que se compararon cultivos enriquecidos con HGF 7,5ng/ml con o sin 5-FU 0,4µg/ml. A modo de referencia se incluyó en todas las experiencias un control (cultivos con SRN 0,5%). La cuantificación de la proliferación celular se realizó mediante la técnica de MTT (fig. 111).

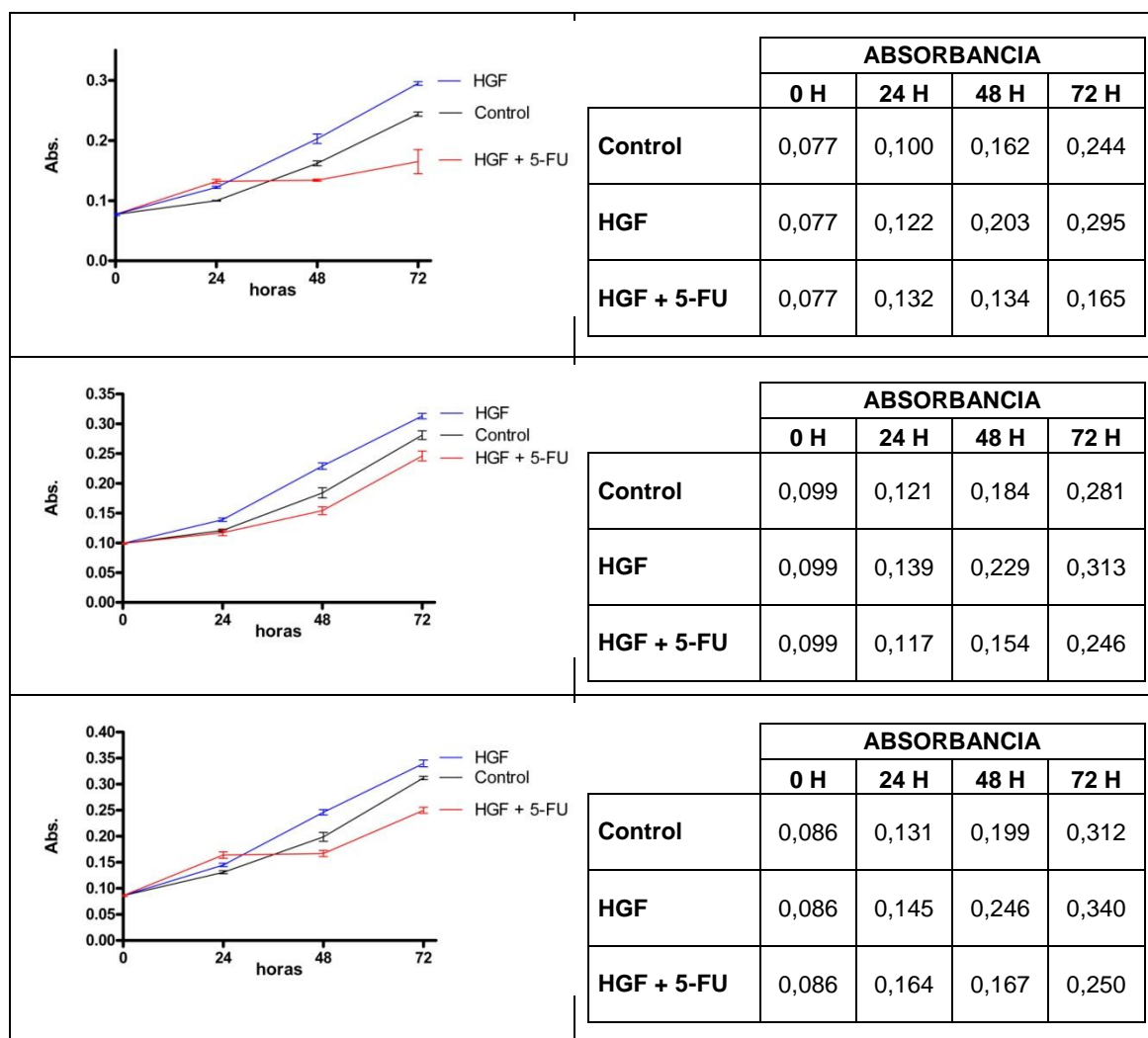


Figura 111. Efecto del 5-FU 0,4µg/ml en cultivos estimulados con HGF 7,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

En todos los casos, el efecto antiproliferativo del 5-FU ha sido evidente y significativo incluso tras sólo 48 horas. De hecho, el 5-FU no sólo ha anulado por completo el estímulo del Factor de Crecimiento, sino que el recuento final queda claramente por debajo de los cultivos controles ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; 72 horas, $p < 0,001$).

Como en otras experiencias, para corroborar los hallazgos, se realizó una nueva experiencia utilizando para su medición el lector NucleoCounter (fig. 112).

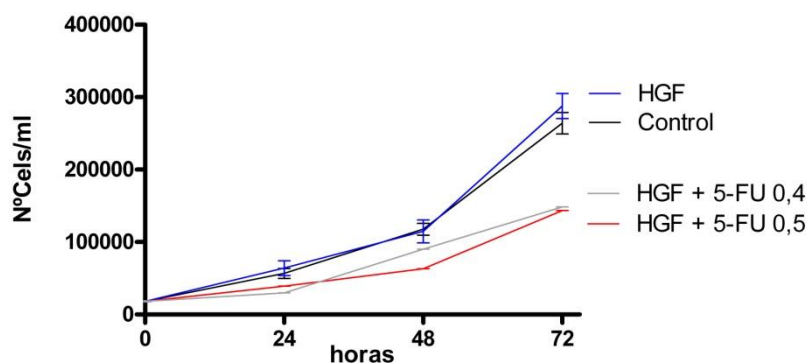


Figura 112. Efecto del 5-FU en cultivos estimulados con HGF 7,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante NucleoCounter).

Ambas concentraciones de 5-FU reducen drásticamente la proliferación de las células ACC-531 llegando incluso a valores de recuento muy por debajo de los cultivos control (SRN 0,5% sin HGF). Los recuentos de las células se muestran en la tabla 92.

Tabla 92. Efecto del 5-FU sobre la estimulación del cultivo con HGF (absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	18.225	56.700	117.750	264.000
HGF	18.225	64.125	114.750	287.925
HGF + 5-FU 0,4µgr/ml	18.225	29.700	90.000	148.500
HGF + 5-FU 0,5µgr/ml	18.225	39.150	63.000	143.550

El efecto inhibitorio del 5-FU 0,4 µgr/ml sobre cultivos estimulados con HGF 7,5 ngr/ml también quedó confirmado mediante el lector de placas xCELLigence, tal y como se muestra en la figura 113.

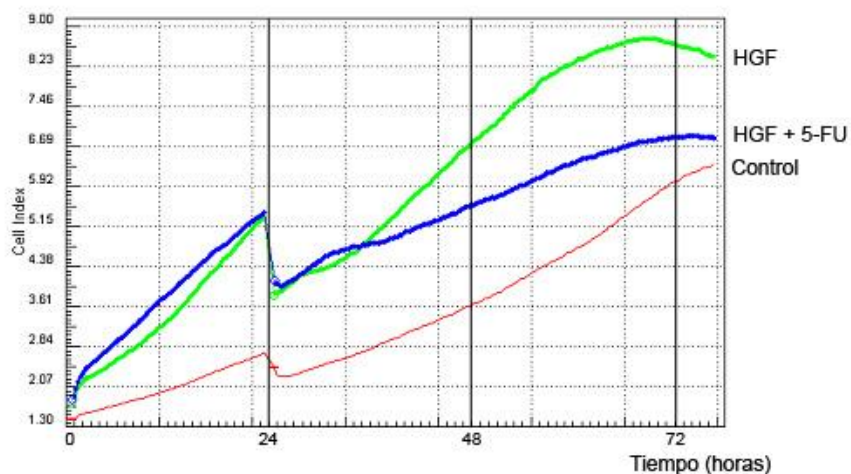


Figura 113. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con HGF 7,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante xCELLigence).

El HGF 7,5 ngr/ml es capaz de estimular la proliferación celular desde las primeras horas de su exposición manteniendo dicho estímulo a lo largo de toda la curva. Por su parte, la adición del quimioterápico inhibe el efecto proliferativo del 5-FU.

A raíz de los resultados obtenidos con el HGF, se optó por utilizar de manera constante la concentración de 0,4 μ gr/ml de 5-FU en las sucesivas experiencias con el resto de los Factores de Crecimiento.

1.4.5. Efecto del 5-FU sobre el EGF

A continuación se estudió el efecto del 5-FU sobre células cultivadas con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Dicho estudio se ha llevado a cabo con las concentraciones del factor con las que mayor proliferación mostraron los cultivos celulares. Como control se incluyeron cultivos complementados con SRN 0,5%.

En la figura 114 se observa la proliferación de las células ACC-531 al ser tratadas con 5-FU 0,4 μ gr/ml y EGF 5 ngr/ml. La técnica empleada en su medición fue MTT.

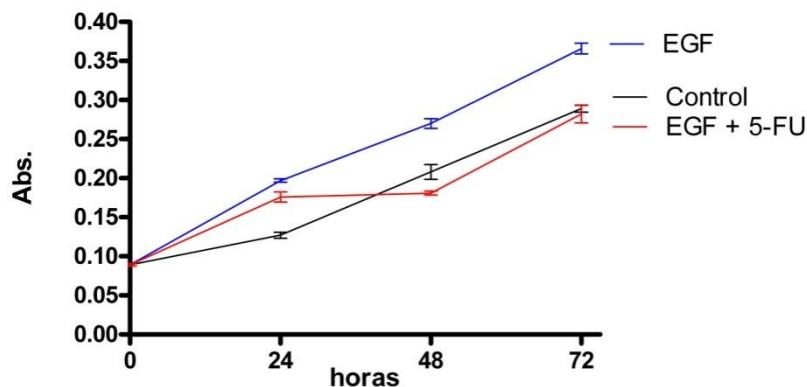


Figura 114. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con EGF 5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

Las células cultivadas con EGF crecieron a un ritmo claramente superior al de los controles desde las primeras 24 horas de su adición al medio y a lo largo de toda la curva ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$).

Al añadirles 5-FU, éste frena el crecimiento de las células estimuladas con EGF desde el inicio (24horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,01$) hasta las últimas 48 horas ($p < 0,001$). En la tabla 93 se detallan los valores de las Absorbancia de la figura 114.

Tabla 93. Efecto del 5-FU sobre cultivos estimulados con EGF (absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,089	0,127	0,208	0,289
EGF 5 ngr/ml	0,089	0,197	0,270	0,366
EGF + 5-FU 0,4 μgr/ml	0,089	0,176	0,181	0,282

Para corroborar los resultados obtenidos, se repitió la experiencia utilizando para su recuento el lector de placas xCELLigence (fig. 115).

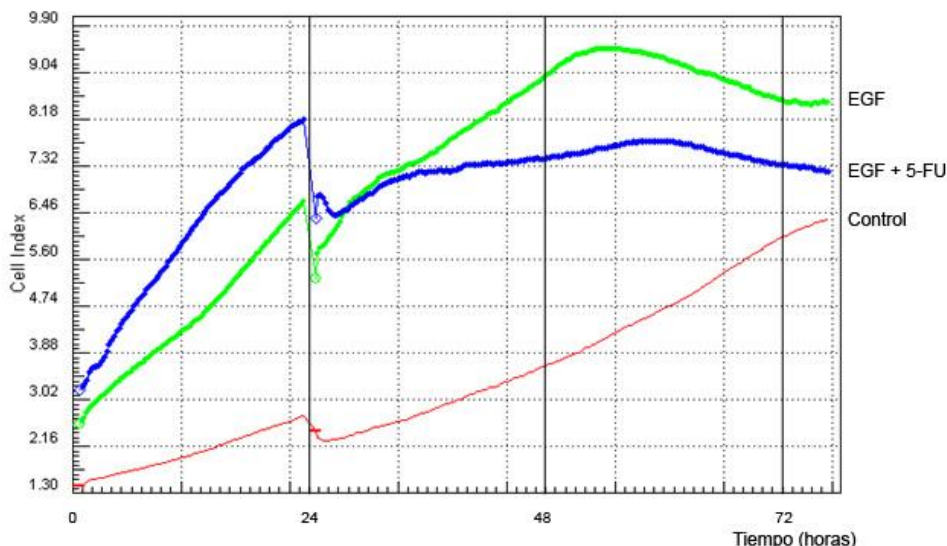


Figura 115. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con EGF 5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante xCELLigence).

Mediante esta técnica también se observa el efecto estimulador de la proliferación celular del EGF, así como su inhibición por parte del 5-FU.

En otra experiencia, se estudió el efecto del 5-FU en cultivos estimulados mediante EGF a la concentración de 10 ngr/ml. Nuevamente, se incluyeron como controles cultivos celulares complementados con SRN 0,5%, cuantificando la proliferación de las células mediante la técnica de MTT (fig. 116).

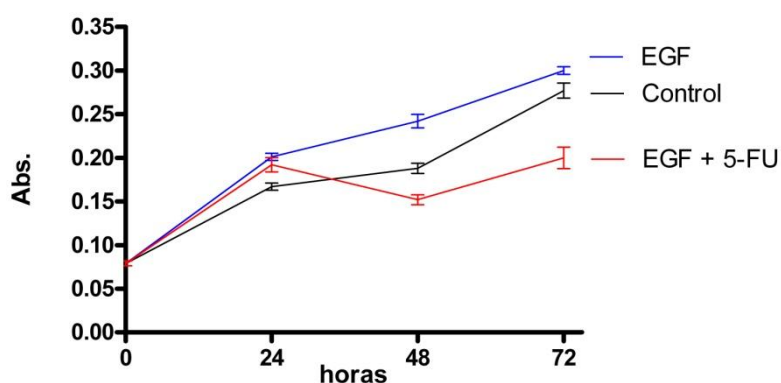


Figura 116. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con EGF 10 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

Los cultivos a los que se les ha añadido el factor al medio ven estimulada su proliferación con respecto a los no tratados a lo largo de toda la curva. Por su parte, la adición al cultivo de 5-FU provoca un freno en su proliferación.

Desde las primeras 24 horas, el EGF 10 ngr/ml estimula el crecimiento celular ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$), efecto que perdura a las 48 horas y 72 horas.

El cultivo celular con 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ ve inhibida su proliferación a partir de las primeras 24 horas de crecimiento, llegando incluso a las 48 horas y 72 horas a valores inferiores a los del control (72 horas; "Newman-Keuls Multiple Comparison Test", $p < 0,001$). Los valores de las Absorbancia se muestran en la tabla 94.

Tabla 94. Efecto del 5-Fu sobre cultivos estimulados con EGF 10 ng/ml (absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,079	0,167	0,188	0,277
EGF 10 ngr/ml	0,079	0,201	0,242	0,300
EGF + 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$	0,079	0,192	0,152	0,200

Al igual que en ocasiones anteriores, los resultados obtenidos se corroboraron utilizando para su medición el lector de placas xCELLigence (fig. 117).

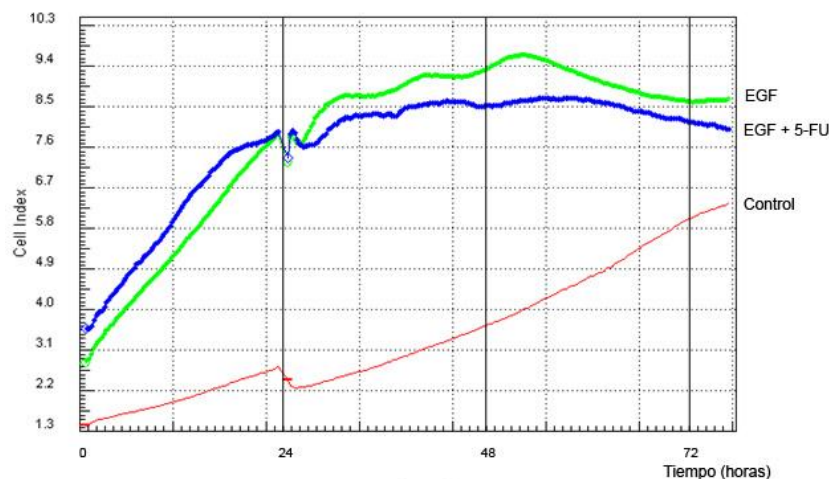


Figura 117. Efecto del 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ en cultivos estimulados con EGF 10 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante xCELLigence).

El Factor de Crecimiento Epidérmico 10 ngr/ml es capaz de estimular el crecimiento de las células ACC-531 a lo largo de toda la curva, mientras que la adición de 5-FU reduce levemente dicho estímulo.

1.4.6. Efecto del 5-FU sobre el PDGF

Posteriormente, estudiamos el efecto del 5-FU sobre células cultivadas con distintas concentraciones de PDGF. Se emplearon aquellas concentraciones de factor que mayor estímulo proliferativo habían supuesto para los cultivos (5, 7,5 y 10 ngr/ml), en un medio complementado con SRN 0,5% con y sin 5-FU 0,4 µgr/ml.

a) Ensayos con PDGF 5 ngr/ml

Se realizó por duplicado la experiencia con la concentración de 5 ngr/ml de PDGF, midiendo la proliferación de las células mediante la técnica de MTT (fig. 118).

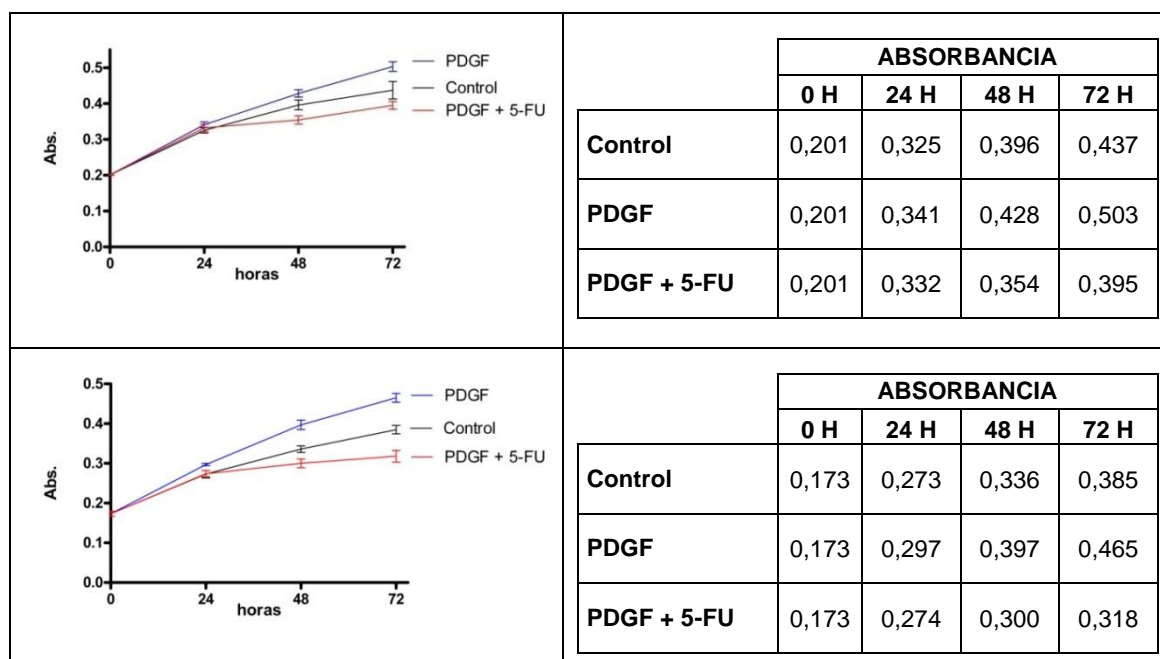


Figura 118. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos estimulados con PDGF 5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

En ambas gráficas se comprueba claramente el efecto estimulante de la proliferación celular del Factor de Crecimiento así como el efecto inhibitorio por parte del 5-FU en aquellas células estimuladas con PDGF.

Los cultivos con PDGF en el medio no muestran diferencias significativas con respecto al cultivo control hasta las 48 horas y 72 horas donde su proliferación resulta mayor ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,05$).

En los cultivos con 5-FU, la proliferación celular se ve disminuida a partir de las 24 horas de su adición al medio, siendo esta disminución estadísticamente significativa ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,01$).

b) Ensayos con PDGF 7,5 ngr/ml

En una nueva experiencia, se utilizó la concentración de PDGF 7,5 ngr/ml y se observó el efecto del 5-FU sobre el crecimiento de las células ACC-531.

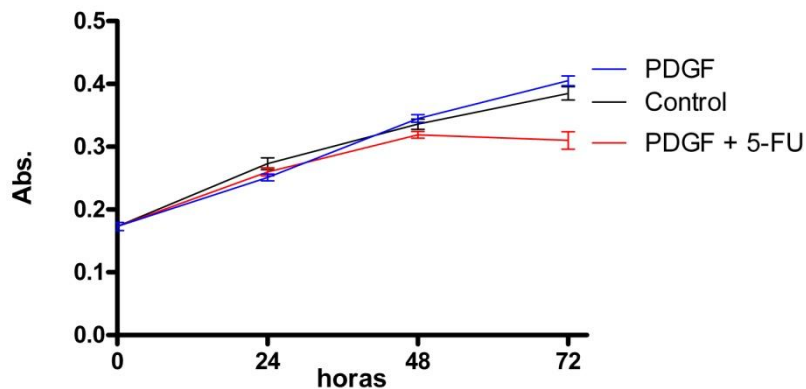


Figura 119. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos estimulados con PDGF 7,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

Tanto el efecto proliferativo del factor PDGF como el inhibitorio del 5-FU resultan patentes en las últimas 24 horas de la curva.

En esta ocasión, el 5-FU sólo muestra actividad inhibitoria a partir de las 48 horas de su exposición con respecto al cultivo no tratado (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test" $p < 0,001$). No obstante, el PDGF 7,5 ngr/ml no mostró una actividad estimuladora hasta las 72 horas, si bien, no alcanzó significación estadística ($p > 0,05$). Los valores de absorbancia se muestran en la tabla 95.

Tabla 95. Efecto del 5-FU sobre el estímulo producido por PDGF en los cultivos (absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,173	0,273	0,336	0,385
PDGF 7,5 ngr/ml	0,173	0,251	0,345	0,405
PDGF + 5-FU 0,4 µgr/ml	0,173	0,260	0,319	0,310

c) Ensayos con PDGF 10 ngr/ml

En último lugar, se evaluó el efecto sobre los cultivos de 5-FU aumentando la concentración de PDGF a 10 ngr/ml. Se añadieron cultivos control en los que el medio enriquecido con SRN 0,5% no contenía 5-FU ni Factor de Crecimiento (fig.120).

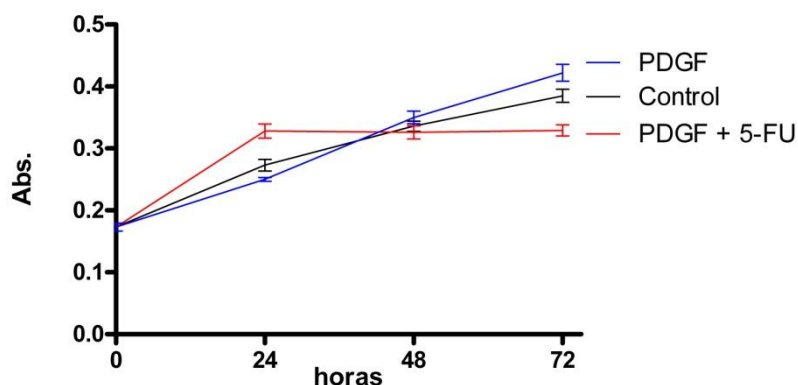


Figura 120. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con PDGF 10 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

El efecto proliferativo del PDGF se observó en las últimas 24 horas de la curva proliferativa, así como la inhibición celular inducida por el 5-FU.

Como se observa en la figura 120 el 5-FU muestra su efecto antiproliferativo a partir de las 48 horas (PDGF vs. PDGF + 5FU; "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$). Por otra parte, los cultivos celulares con PDGF en el medio sólo muestran una mayor capacidad proliferativa que el control en las últimas 24 horas ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,05$). En la tabla 96 se detallan los valores de las Absorbancia.

Tabla 96. Efecto del 5-FU sobre los cultivos estimulados con PDGF (absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,173	0,273	0,336	0,385
PDGF 10ngr/ml	0,173	0,250	0,350	0,422
PDGF + 5-FU 0,4μgr/ml	0,173	0,328	0,326	0,329

Nuevamente, se optó por repetir la experiencia y medir la proliferación celular mediante el lector NucleoCounter para corroborar los resultados obtenidos mediante la técnica de MTT (fig. 121).

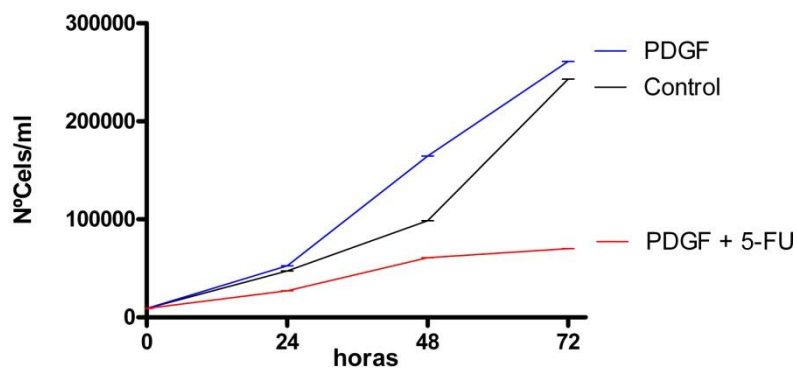


Figura 121. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con PDGF 10 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante NucleoCounter).

En esta ocasión, el PDGF muestra su capacidad estimulante de la proliferación celular a partir de las primeras 24 horas de crecimiento. Por su parte, el 5-FU inhibe la proliferación celular desde el inicio de su exposición al cultivo y mantiene su efecto durante toda la curva (tabla 97).

Tabla 97. Efecto del 5-FU sobre cultivos estimulados con PDGF (células/ml).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	9.000	47.250	98.550	243.000
PDGF 10 ngr/ml	9.000	52.650	164.700	261.000
PDGF + 5-FU 0,4 μgr/ml	9.000	27.000	60.750	70.200

Se realizó una última experiencia con el factor PDGF (10 ngr/ml) para corroborar lo obtenido, utilizando para tal fin el lector de placas xCELLigence tal y como queda reflejado en la figura 122.

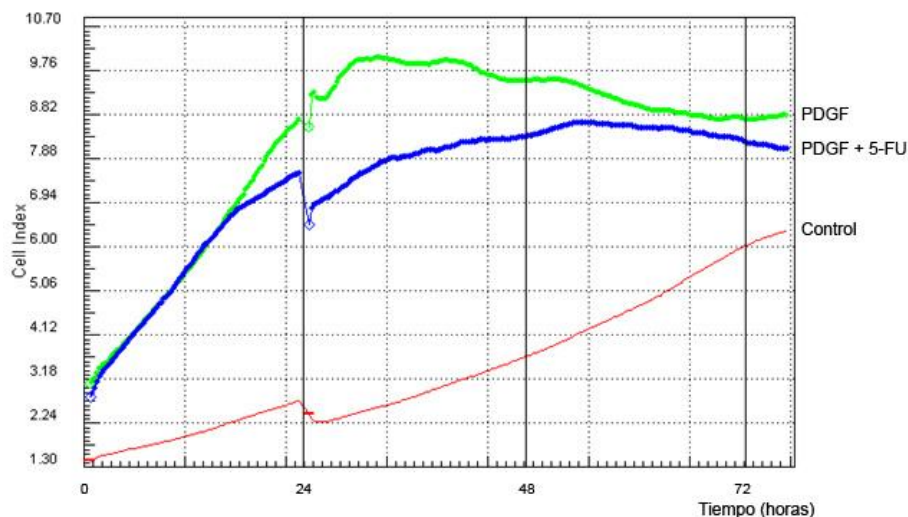


Figura 122. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con PDGF 10 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante xCELLigence).

El PDGF 10 ngr/ml estimula el cultivo a lo largo de toda la curva, reduciéndose el estímulo proliferativo al adicionar el quimioterápico.

1.4.7. Efecto del 5-FU sobre el FGFb

El siguiente Factor de Crecimiento fue el FGFb. En este caso se utilizaron las concentraciones de 2,5, 5 y 10 ngr/ml, concentraciones a las que el FGFb proporcionó mayor estímulo proliferativo al cultivo celular. Se añadieron a la experiencia cultivos control en lo que el medio celular se enriquecía con SRN 0,5%.

a) Ensayos con FGFb 2,5 ngr/ml

En la figura 123 se muestra el efecto de la adición al medio del factor FGFb (2,5 ngr/ml) con y sin 5-FU (0,4 μ gr/ml) en medio complementado con SRN 0,5%. La medida de la proliferación se realizó mediante la técnica del NucleoCounter.

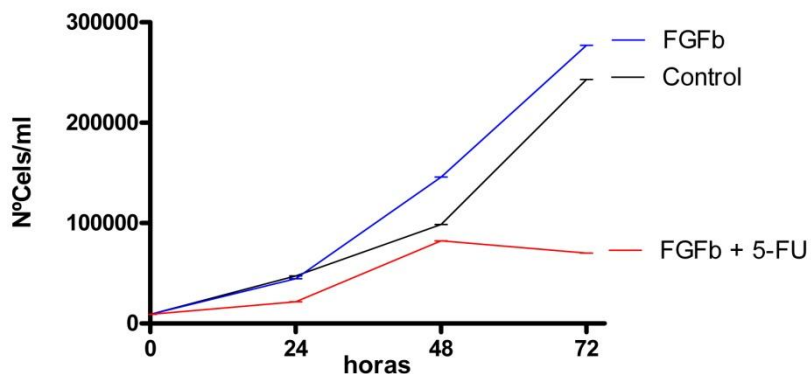


Figura 123. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con FGFb 2,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante NucleoCounter).

El Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico muestra una estimulación de la proliferación celular a partir de las primeras 24 horas de crecimiento que se mantiene a lo largo de toda la curva. Por el contrario, el quimioterápico 5-FU inhibe la proliferación de las células desde el inicio de su adición al medio (tabla 98).

Tabla 98. Efecto del 5-FU sobre los cultivos estimulados con FGFb (células/ml).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	9.000	47.250	98.550	243.000
FGFb 2,5 ngr/ml	9.000	44.550	145.800	277.200
FGFb + 5-FU 0,4 μgr/ml	9.000	21.600	82.350	70.200

Los resultados anteriores quedaron corroborados mediante el lector de placas xCELLigence, tal y como se muestra en la figura 124.

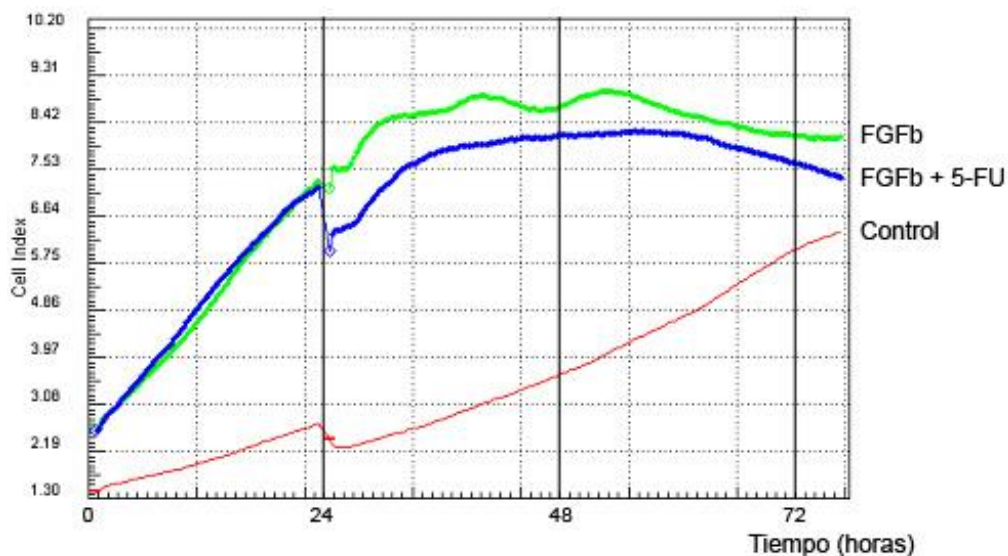


Figura 124. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con FGFb 2,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante xCELLigence).

A lo largo de toda la curva proliferativa, el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico estimula la proliferación de las células del cultivo mientras que la adición al medio de 5-FU reduce el estímulo proporcionado por el Factor.

b) Ensayos con FGFb 5 ngr/ml

A continuación se estudió el efecto del 5-FU sobre los cultivos estimulados con FGFb a 5 ngr/ml, como queda reflejado en la figura 125. Como control se tomaron cultivos con medio libre de factor y 5-FU y suplementado con SRN 0,5%. La proliferación celular se midió mediante la técnica de MTT.

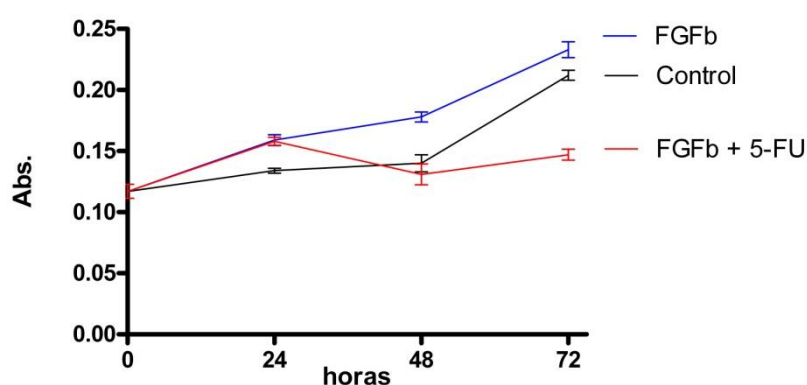


Figura 125. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con FGFb 5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

El Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico estimula la proliferación de las células ACC-531 a lo largo de toda la curva ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; 72 horas: $p < 0,05$).

Por su parte, la adición del 5-FU al medio produce una inhibición del crecimiento celular que se hace presente a partir de las primeras 24 horas de proliferación (48 horas y 72 horas, $p < 0,001$). Los valores de las Absorbancia se muestran en la tabla 99.

Tabla 99. Efecto del 5-FU sobre cultivos estimulados con FGFb (valores de absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,117	0,134	0,140	0,212
FGFb 5 ngr/ml	0,117	0,159	0,178	0,233
FGFb + 5-FU 0,4 µgr/ml	0,117	0,158	0,131	0,147

Nuevamente se optó por repetir la experiencia anterior, para corroborar los resultados obtenidos, midiendo las proliferaciones celulares mediante el lector xCELLigence (fig. 126).

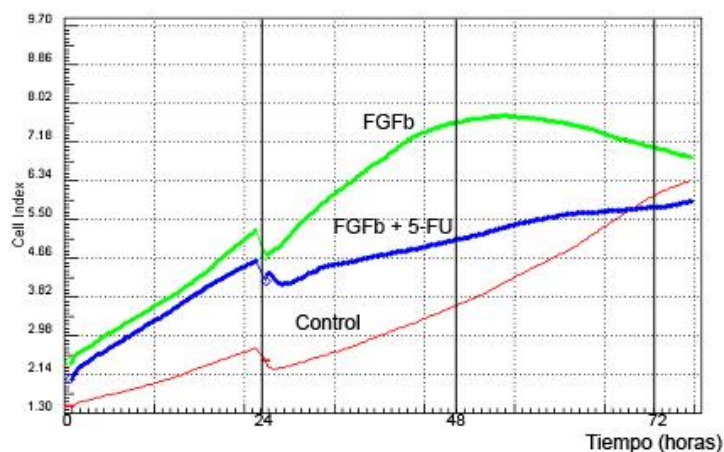


Figura 126. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos estimulados con FGFb 5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante xCELLigence).

Se pudo comprobar el efecto estimulador del factor FGFb con la concentración de 5 ngr/ml así como la inhibición de la proliferación celular por parte del 5-FU.

c) Ensayos con FGFb 10 ngr/ml

En último lugar, se estudió el efecto del 5-FU sobre las células estimuladas con una concentración alta de FGFb (10 ngr/ml). Para ello se emplearon cultivos celulares con y sin 5-FU en medio enriquecido con SRN 0,5%. Los cultivos control fueron aquellos cuyos medios carecían de factor y 5-FU. En la figura 127 se muestra el resultado de dicha experiencia mediante la técnica de MTT.

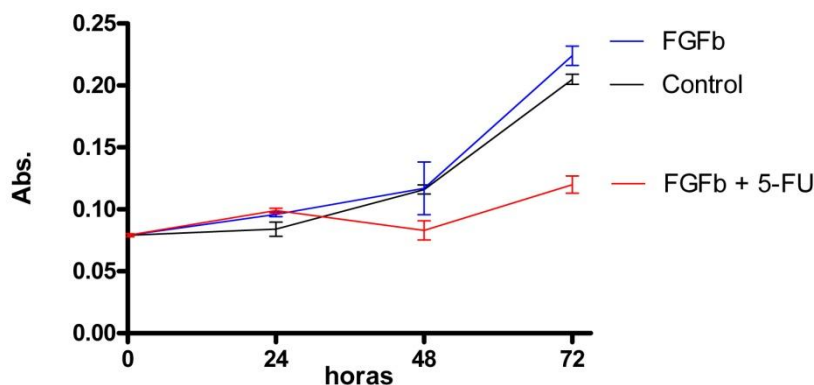


Figura 127. Efecto del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con FGFb 10 ngr/ml y complementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

En esta ocasión, el 5-FU produjo una disminución del crecimiento celular a partir de las 24 horas que se mantuvo hasta el final (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$). Por su parte, el FGFb produjo un estímulo proliferativo sobre las células con respecto al cultivo control (72 horas; $p < 0,001$). Los valores de las Absorbancia se detallan en la tabla 100.

Tabla 100. Efecto del 5-FU sobre cultivos estimulados con FGFb 10 ngr/ml (valores de absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,079	0,084	0,116	0,205
FGFb 10 ngr/ml	0,079	0,096	0,117	0,224
FGFb + 5-FU 0,4μgr/ml	0,079	0,099	0,083	0,120

1.4.7. Efecto del 5-FU sobre el VEGF

El último Factor de Crecimiento con el que se estudió el efecto inhibitorio del 5-FU sobre la proliferación de los cultivos celulares fue el VEGF. Las concentraciones que se emplearon fueron 7,5 ngr/ml y 10 ngr/ml, ya que fueron las que mostraron mayor estímulo proliferativo sobre los cultivos. Se mantuvo como controles a los cultivos con medio enriquecido con SRN 0,5% y libre de 5-FU y Factor.

a) Ensayos con VEGF 7,5 ngr/ml

En la figura 128 se muestra la experiencia realizada por duplicado en la que se estudia el efecto inhibitorio del 5-FU 0,4 μ gr/ml en cultivos estimulados con VEGF 7,5 ngr/ml. La medida de la proliferación se midió mediante la técnica de MTT.

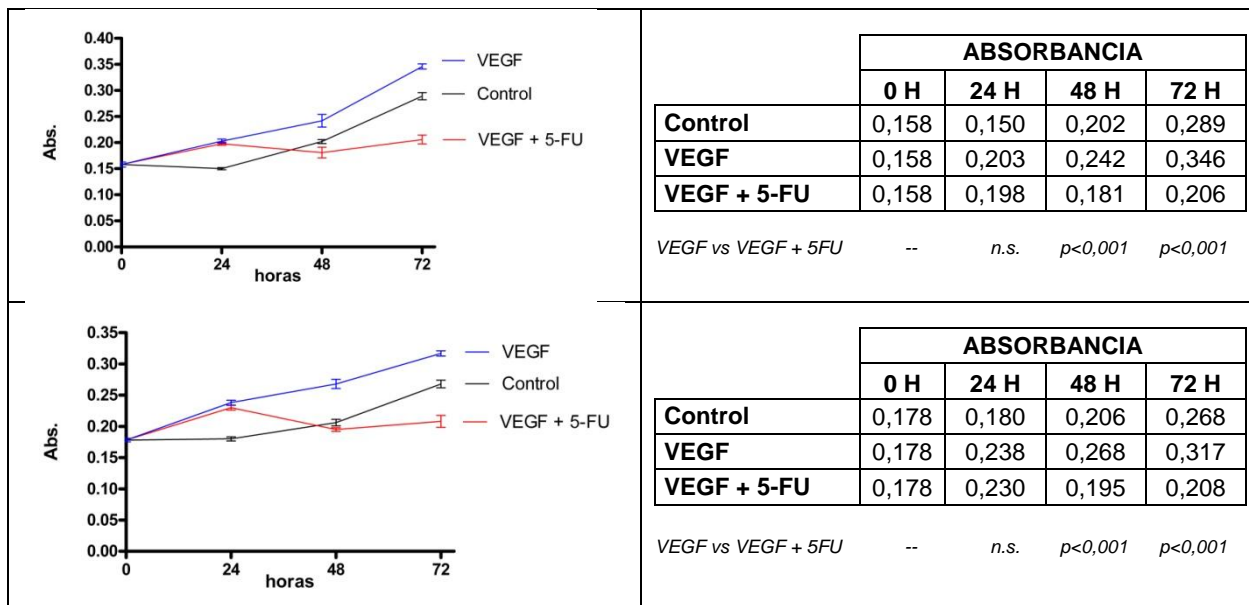


Figura 128. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos estimulados con VEGF 7,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

Ambas experiencias dieron resultados similares en los que el factor VEGF produjo una estimulación del crecimiento celular mientras que el 5-FU produjo el efecto contrario.

El Factor de Crecimiento VEGF mostró un efecto estimulador de la proliferación de las células ACC-531 desde las primeras 24 horas ($p<0,001$) y se mantuvo a las 48 horas ($p<0,01$ y $p<0,001$) y 72 horas ($p<0,001$). La adición de 5-Fluorouracilo al medio de cultivo no produjo cambios significativos en la proliferación celular con respecto al cultivo control durante las primeras 24 horas. En cambio, a las 48 horas la proliferación celular se vió inhibida, llegando a valores próximos al control (sin VEGF). Es a las 72 horas donde el efecto inhibitor del 5-FU resulta más evidente, creciendo a un ritmo inferior al control.

Para corroborar los resultados obtenidos, se optó por repetir la misma experiencia pero utilizando para su medición el lector NucleoCounter y el lector de placas xCELLigence. El resultado obtenido se muestra en las figuras 129 y 130.

En la figura 129 se muestra el efecto sobre las células de la adición al medio de cultivo celular enriquecido con SRN 0,5% y el factor VEGF del quimioterápico 5-FU. El crecimiento celular se cuantificó mediante el lector NucleoCounter.

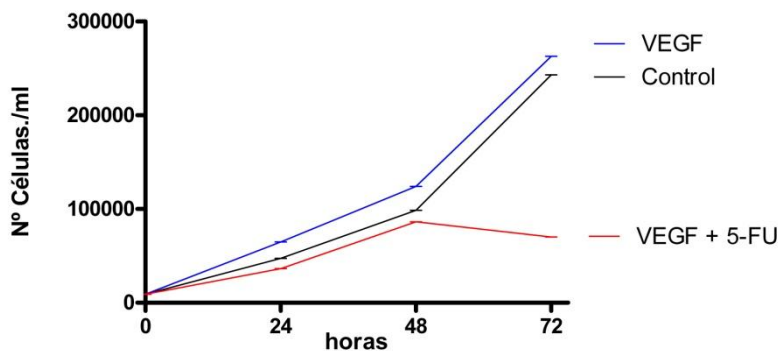


Figura 129. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos estimulados con VEGF 7,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante NucleoCounter).

Tal y como se observa en la figura 130, la adición del 5-FU al medio de cultivo produce una inhibición de la proliferación si bien, ésta resulta más notable a las 72 horas. Por su parte, el VEGF estimula la proliferación de las células ACC-531 a lo largo de toda la curva (tabla 101).

Tabla 101. Efecto del 5-FU sobre cultivos estimulados con VEGF (células/ml).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	9.000	47.250	98.550	243.000
VEGF 7,5 ngr/ml	9.000	64.800	124.200	262.800
VEGF + 5-FU 0,4 µgr/ml	9.000	36.450	86.400	70.200

La misma experiencia medida mediante el lector de placas xCELLigence se muestra en la figura 130.

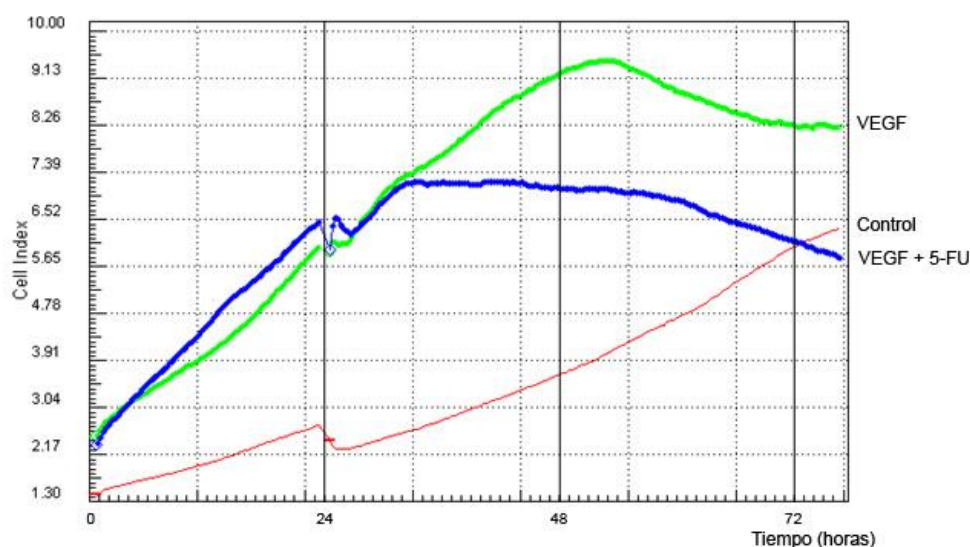


Figura 130. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos estimulados con VEGF 7,5 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante xCELLigence).

Como puede observarse, esta nueva experiencia corroboró los resultados obtenidos mediante el NucleoCounter. El Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular es capaz de estimular el crecimiento de las células ACC-531 mientras que la adición al medio de cultivo del quimioterápico 5-FU frena dicha proliferación.

c) Ensayos con VEGF 10 ngr/ml

A continuación se estudió el efecto del 5-FU sobre los cultivos al aumentar la concentración de VEGF a 10 ngr/ml. Se mantuvo la concentración de 5-FU a 0,4 µgr/ml así como la del SRN a 0,5%. El resultado obtenido medido mediante lector de placas y la técnica de MTT se muestra en la figura 131.

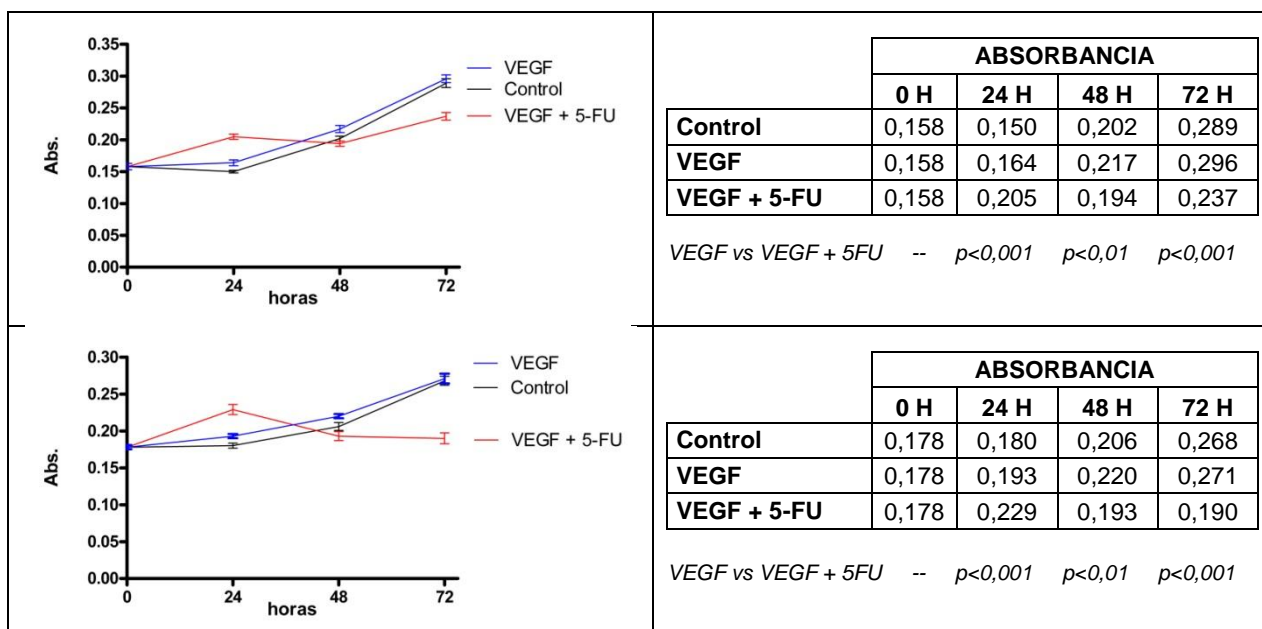


Figura 131. Efecto del 5-FU 0,4 µgr/ml en cultivos estimulados con VEGF 10 ngr/ml y suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

Como queda reflejado en la figura 131, ambas experiencias dieron resultados similares. La concentración de VEGF 10 ngr/ml estimula levemente la proliferación celular a lo largo de toda la curva, si bien la diferencia no alcanza significación estadística.

Por su parte, la adición del 5-FU al medio celular induce una inhibición de la proliferación de las células ACC-531 a las 48 horas y 72 horas (p<0,01).

1.5. Efecto del ATRA sobre cultivos tratados con 5-FU

Finalmente, se diseñaron una serie de experiencias dirigidas a observar el efecto producido por la adición de ATRA en cultivos estimulados con los diversos Factores de Crecimiento e inhibidos en su crecimiento por la adición de 5-FU.

1.5.1. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con SRN y tratados con 5-FU

En este apartado se ensayaron diferentes concentraciones de suero obtenido de rata normal y de ratas parcialmente hepatectomizadas.

a) Ensayos con SRN

En un primer lugar, estudiamos el efecto sobre los cultivos celulares de la adición conjunta de ATRA y 5-FU al medio suplementado con SRN al 0,5%. En un principio, para establecer el comportamiento de las células a la adición de ambos fármacos, no se adicionaron al medio los Factores de Crecimiento. Las concentraciones utilizadas de ATRA fueron 5 y 10 μM y para el 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$.

En la figura 132 se muestra el efecto sobre las células de la adición al medio de cultivo de ATRA (5 μM) y 5-FU (0,4 $\mu\text{gr/ml}$) por separado y combinado, en medio suplementado con SRN 0,5%. La medida de la proliferación se realizó mediante lector de placas y la técnica de MTT.

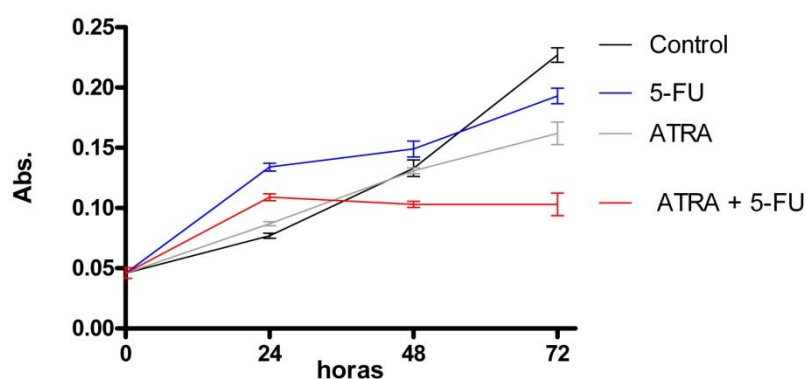


Figura 132. Efecto del ATRA 5 μM y 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ en cultivos suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

A las 72 horas del inicio de la curva de proliferación, es el cultivo control el que mayor proliferación muestra de los cuatro. Los cultivos celulares con 5-FU en el medio de cultivo son los que más proliferan después del control, si bien esto sólo se aprecia al final de la curva (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,01$). A partir de las 48 horas, el ATRA

inhibe la proliferación del cultivo a valores más bajos que los del cultivo con 5-FU (Control vs. ATRA; $p < 0,001$).

Como cabía esperar, la adición al medio de cultivo de ATRA y 5-FU producen mayor inhibición del crecimiento celular que éstos individualmente (72 horas, Control vs. ATRA + 5-FU; "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$). En la tabla 102 se recogen los valores de absorbancia obtenidos.

Tabla 102. Efecto del ATRA 5 μM sobre cultivos normales e inhibidos con 5-FU (valores de absorbancia).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,046	0,077	0,133	0,227
5-FU (0,4 $\mu\text{gr/ml}$)	0,046	0,134	0,149	0,193
ATRA (5 μM)	0,046	0,087	0,131	0,162
ATRA + 5-FU	0,046	0,109	0,103	0,103

A continuación se optó por aumentar la concentración de ATRA a 10 μM , con el fin de estudiar el efecto de la alta concentración de éste sobre las células, manteniendo constantes la concentración de 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ y SRN 0,5% (fig. 133).

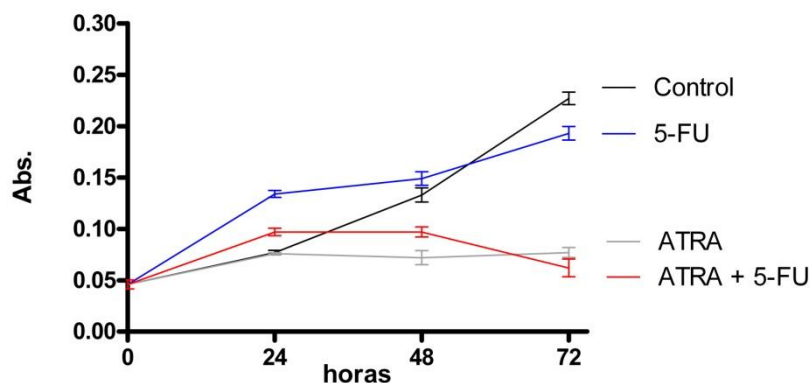


Figura 133. Efecto del ATRA 10 μM y 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ en cultivos suplementados con SRN 0,5% (cuantificado mediante MTT).

Al igual que sucedía en la experiencia anterior, los cultivos con ATRA proliferan mucho menos con los controles o los tratados sólo con 5-FU. El ATRA 10 μM , con o sin 5-FU, produce el aplanamiento total de la curva proliferativa. En la tabla 103 se detallan los valores de absorbancia obtenidos.

Tabla 103. Efecto del ATRA 10 μ M sobre cultivos normales e inhibidos con 5-FU (valores de absorbancia).

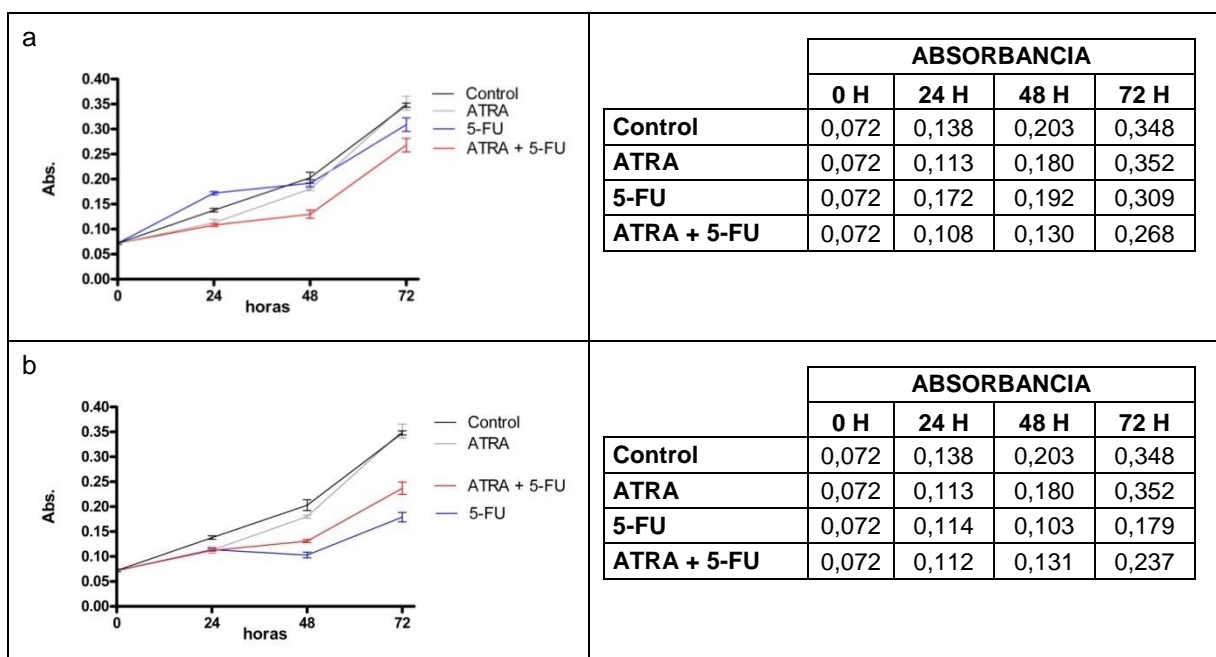
	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRN 0,5%)	0,046	0,077	0,133	0,227
5-FU (0,4 μgr/ml)	0,046	0,134	0,149	0,193
ATRA (10 μM)	0,046	0,076	0,072	0,077
ATRA + 5-FU	0,046	0,097	0,097	0,062

b) Ensayos con SRH

En un siguiente paso, se analizó el efecto de la adición de ATRA sobre las células ACC-531 en medios suplementados con SRH (con y sin 5-FU).

El Suero de Rata Hepatectomizado supone un estímulo proliferativo para las células por lo que se amplió el rango de las concentraciones a utilizar de Suero, ATRA y 5-FU con el fin de aproximar la combinación de concentraciones de fármacos que reduzcan la proliferación del cultivo control a la mitad.

Primeramente, se estudió el efecto del ATRA y 5-FU en los cultivos enriquecidos con SRH a la concentración de 2,5%. En la figura 134 se muestran los resultados de añadir ATRA 10 μ M a cultivos con 5-FU 0,3, 0,4 y 0,5 μ gr/ml. La proliferación de las células se midió mediante el lector de placas y la técnica de MTT.



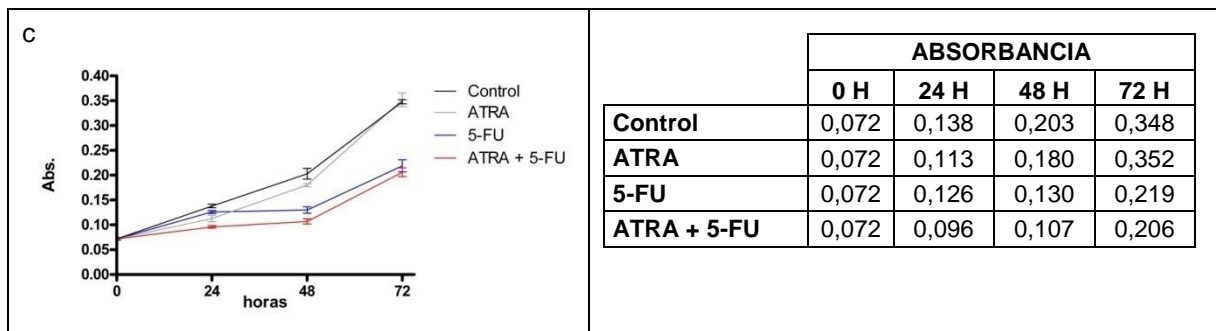


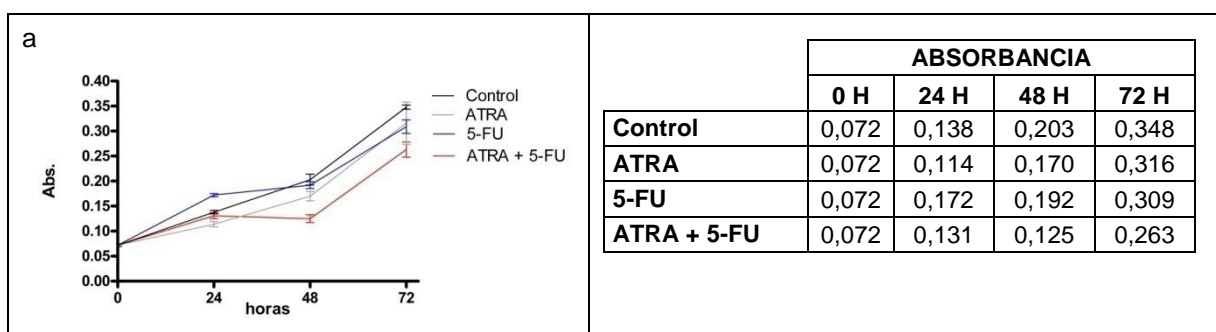
Figura 134. Efecto del ATRA 10 μ M en cultivos complementados con SRH 2,5% y 5-FU 0,3 (a), 0,4 (b) y 0,5 μ gr/ml (c) (cuantificado mediante MTT).

En las tres experiencias realizadas, el cultivo control (sin ATRA y sin 5-FU) es el que muestra mayor proliferación de los cuatro cultivos. Con valores muy próximos al de los controles, proliferan los cultivos con el ATRA en el medio.

Por su parte, los cultivos con 5-FU 0,3 μ gr/ml en el medio, proliferan en menor medida que el control, si bien no alcanzan significación estadística a las 72 horas. Al aumentar la concentración del 5-FU a 0,4 μ gr/ml y 0,5 μ gr/ml, los cultivos celulares ven reducida claramente su proliferación (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$).

Por último, los cultivos con ATRA y 5-FU en el medio celular fueron los que mostraron menor proliferación de los cuatro cultivos a lo largo de toda la curva proliferativa. A las 72 horas, los cultivos con ATRA 10 μ M + 5-FU 0,3 μ gr/ml en el medio disminuyen su crecimiento con respecto al control con una significación estadística de $p < 0,01$; mientras que los cultivos con las concentraciones de 5-FU 0,4 y 0,5 μ gr/ml alcanzan una significación de $p < 0,001$.

El siguiente paso consistió en evaluar el efecto del ATRA 5 μ M sobre la proliferación celular en cultivos tratados con 5-FU 0,3, 0,4 y 0,5 μ gr/ml. El medio se suplementó con SRH al 2,5%, y la proliferación se midió mediante lector de elisa y la técnica de MTT (fig. 135).



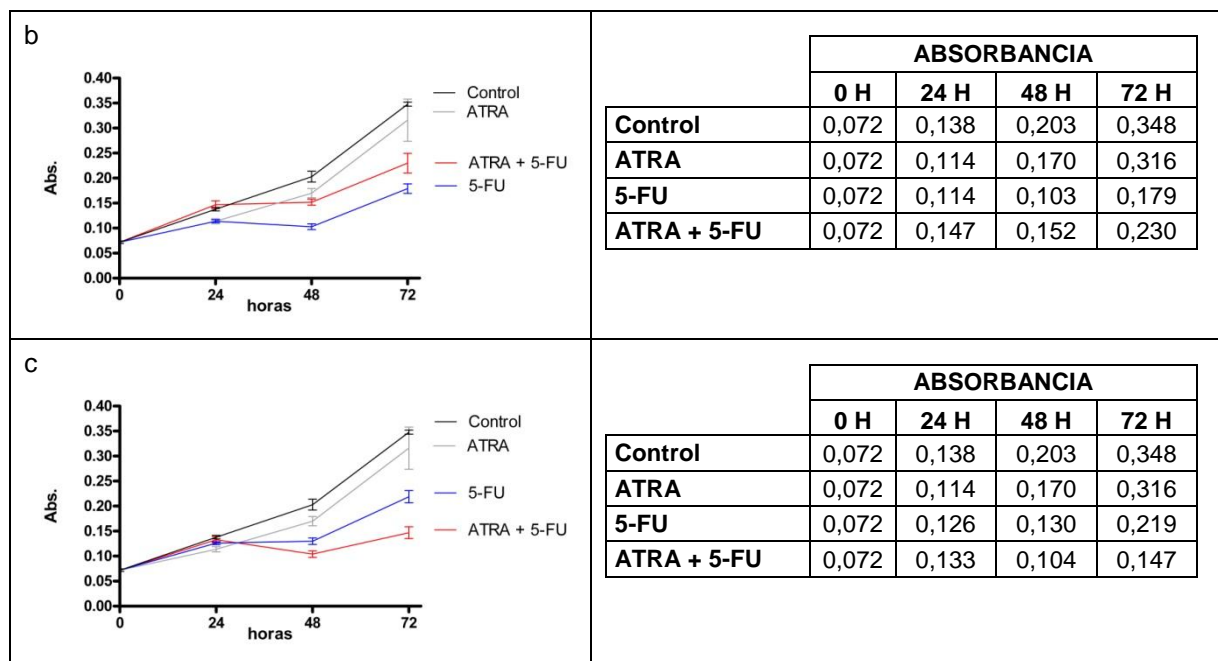


Figura 135. Efecto del ATRA 5 μ M sobre cultivos suplementados con SRH 2,5% y tratados con 5-FU 0,3 (a), 0,4 (b) y 0,5 μ g/ml (c) (cuantificado mediante MTT).

Nuevamente el control fue el cultivo que más proliferó en los tres casos, seguido del cultivo con ATRA 5 μ M en el medio celular.

Los cultivos con 5-FU 0,3 μ g/ml en medio, redujeron la proliferación celular, si bien no alcanzaron significación estadística a las 72 horas ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p > 0,05$). Al aumentar la concentración del quimioterápico a 0,4 μ g/ml y 0,5 μ g/ml los cultivos mostraron una mayor inhibición de su proliferación, alcanzando a las 72 horas una significación estadística de $p < 0,001$.

Por último, los cultivos tratados con ATRA 5 μ M + 5-FU (0,3, 0,4 y 0,5 μ g/ml) proliferaron en menor medida que los cultivos control, y esta disminución resultó proporcional a la concentración de 5-FU (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,05$; $p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente).

No obstante, se volvió a observar en la figura b el efecto paradójico de resultar más crecido el cultivo con ATRA + 5-FU que el cultivo con 5-FU.

Para descartar posibles errores; se diseñó otra experiencia utilizando para la cuantificación de la proliferación celular el nucleocounter. En la figura 136 se observa el efecto de la adición al medio de cultivo de los quimioterápicos ATRA 10 μ M y 5-FU 0,4 μ g/ml en medio suplementado con SRH 2,5%.

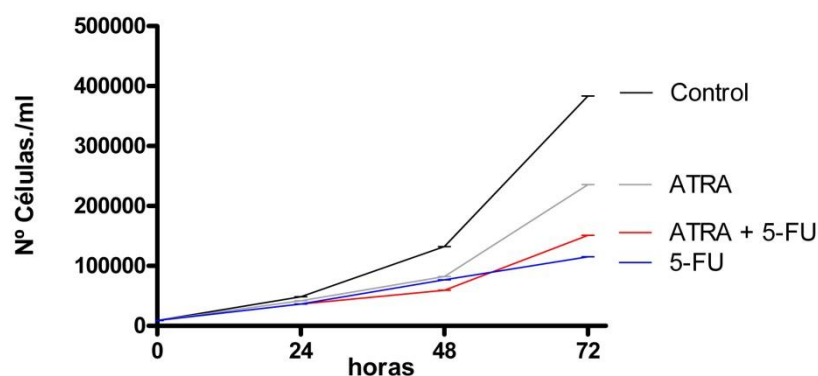


Figura 136. Efecto del ATRA 10 μ M sobre cultivos suplementados con SRH 2,5% y tratados con 5-FU 0,4 μ gr/ml (cuantificado mediante NucleoCounter).

El cultivo control prolifera claramente en mayor medida que los tratados con ATRA y/o 5-FU. El tratamiento con ATRA 5 μ M produce una inhibición de la proliferación, que se acentúa aún más cuando se combina con 5-FU. Sin embargo, nuevamente, la inhibición más potente se produce en los cultivos que reciben únicamente 5-FU. Los recuentos del NucleoCounter se detallan en la tabla 104.

Tabla 104. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con SRH (2,5%) e inhibidos con 5-FU (células por ml).

	Tiempo (Horas)			
	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
Control (SRH 2,5%)	9.000	48.600	132.300	383.400
5-FU (0,4 μgr/ml)	9.000	36.450	76.950	115.200
ATRA (10 μM)	9.000	41.850	82.350	235.800
ATRA + 5-FU	9.000	36.450	59.400	151.200

A continuación se redujo la concentración de SRH hasta un 0,5%, y se midió el efecto del ATRA (5 μ M) y 5-FU (0,4 μ gr/ml) sobre dichos cultivos mediante el lector xCELLigence (fig. 137).

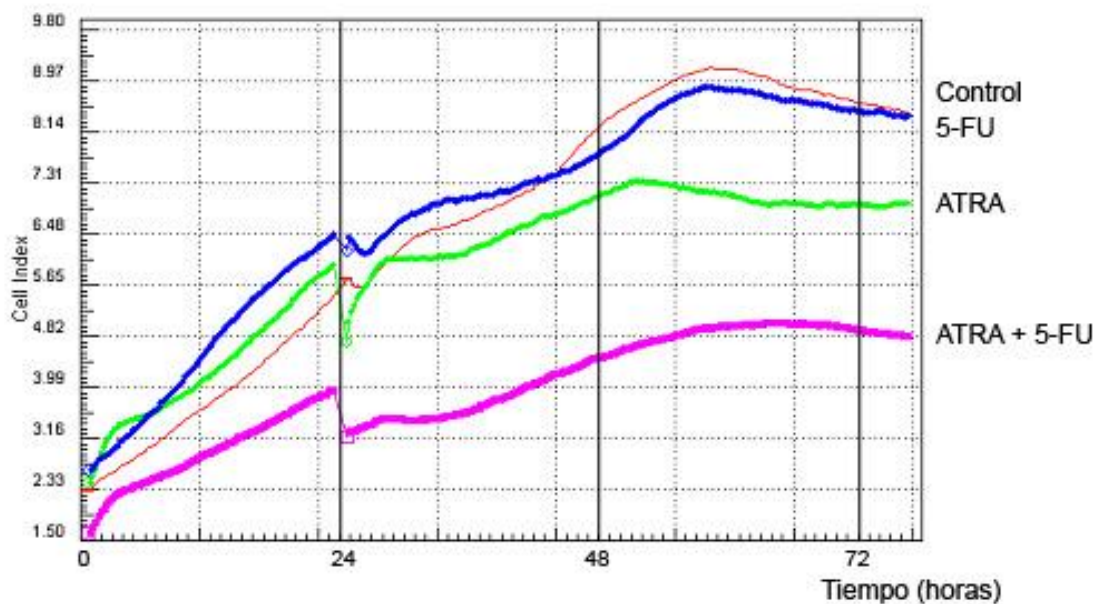


Figura 137. Efecto del ATRA 5 μM sobre cultivos suplementados con SRH 0,5% y tratados con 5-FU (0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (cuantificado mediante xCELLigence).

Nuevamente se comprueba la capacidad inhibitoria de los dos agentes, tanto de manera individual como conjunta. No obstante, no se vuelve a observar el efecto paradójico. En esta ocasión, la suma de ambos fármacos inhibe en mayor medida que cada uno por separado.

En los siguientes apartados se detalla el efecto del ATRA sobre las células estimuladas con Factores de Crecimiento y tratadas o no con 5-FU.

1.5.2. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con HGF e inhibidos con 5-FU

El HGF se ha utilizado a una concentración de 7,5 ngr/ml, ya que fue ésta la que proporcionó mayor estímulo proliferativo a nuestros cultivos. El 5-FU se utilizó a la concentración de 0,4 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y el ATRA a 5 y 10 μM puesto que los mejores resultados fueron obtenidos con esas concentraciones en las experiencias anteriores con medios suplementados con suero al 0,5%.

En la figura 138 se muestran los resultados de dos experiencias realizadas con ATRA 5 μM y 5-FU 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tanto en forma gráfica como la absorbancia media registrada en cada ensayo.

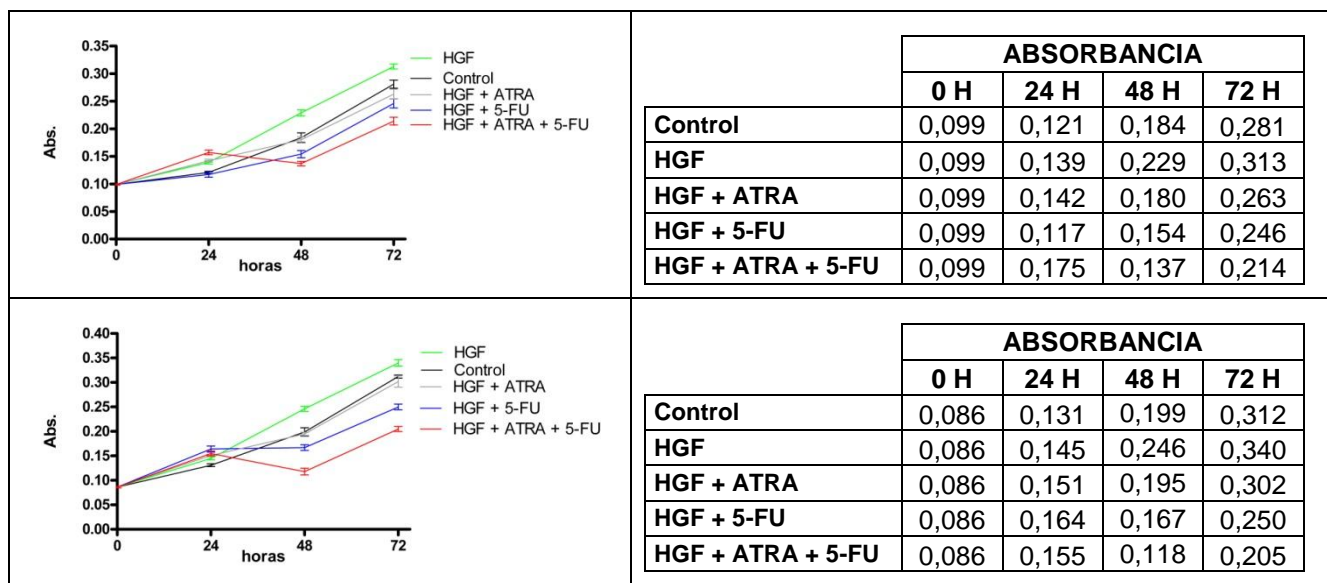


Figura 138. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5% y estimulados con HGF (7,5 ngr/ml), inhibidos o no con y 5-FU (0,4 µgr/ml) (cuantificado mediante MTT).

Como se puede observar en la figura 61, las dos experiencias mostraron resultados prácticamente idénticos. En ambas, el cultivo celular estimulado con HGF proliferó en mayor medida que el resto de los cultivos, lo que fue manifiesto tanto a las 48 como a las 72 horas. El ATRA redujo la proliferación celular a valores inferiores al cultivo estimulado con HGF y al control (sin HGF). Por su parte, el 5-FU produjo una inhibición aún más potente que el ATRA. Por último, los cultivos con ATRA y 5-FU medio fueron los que menos proliferaron, aunque sin que las curvas proliferativas llegaran a aplanarse. La significación estadística de las diferencias observadas entre los distintos grupos de estas experiencias se detalla en tabla 105.

Tabla 105. Análisis estadístico ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test") de los resultados mostrados en la figura 138 (no significativo: ns; p<0,05: *; p<0,01: **; p<0,001:***).

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
HGF vs. Control	-----	** / *	*** / ns	** / **
HGF vs. HGF + ATRA	-----	ns / *	*** / *	*** / ***
HGF vs. HGF + 5-FU	-----	*** / ns	*** / ns	*** / **
HGF vs. HGF + ATRA + 5-FU	-----	** / ns	*** / ***	*** / ***

Para corroborar los resultados obtenidos, se realizaron dos nuevas experiencias midiendo la proliferación celular mediante el lector NucleoCounter (fig. 139) y el lector xCELLigence (fig. 140).

En la figura 139 se observa el efecto del ATRA sobre cultivos celulares estimulados con HGF (inhibidos o no con 5-FU), realizándose el recuento de las células mediante el lector NucleoCounter.

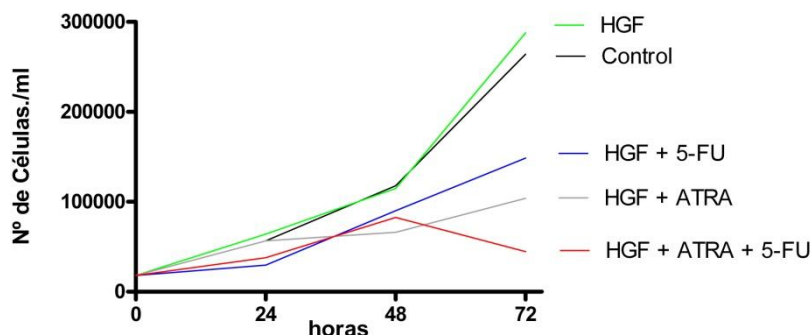


Figura 139. Efecto del ATRA 5 μ M sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con HGF (7,5 ngr/ml), e inhibidos con 5-FU (0,4 μ gr/ml) (cuantificado mediante NucleoCounter).

En esta ocasión, el efecto proliferativo del HGF sólo se observa a las 72 horas de su adición al medio, momento en el cual los cultivos alcanzan recuentos superiores al control.

Por su parte, tanto el 5-FU como el ATRA reducen la proliferación, efecto que es significativo a las 48 y 72 horas de iniciarse el cultivo. Por su parte, la combinación de ambos fármacos no muestra una efectividad superior a cada uno por separado hasta el momento final del ensayo: en la medición realizada a las 72 horas, el recuento de células se ha reducido a valores muy próximos a los de la siembra inicial, siendo muy inferiores a los del resto de grupos de la experiencia (tabla 106).

Tabla 106. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con HGF (7,5 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (células por ml).

	Nº de células por ml			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	18.225	56.700	117.750	264.000
HGF	18.225	64.125	114.750	287.925
HGF + ATRA	18.225	56.700	66.000	103.950
HGF + 5-FU	18.225	29.700	90.000	148.500
HGF + ATRA + 5-FU	18.225	37.800	82.500	44.550

La técnica de lectura en placa mediante el lector xCELLigence mostró resultados similares a los anteriores, tal y como se puede apreciar en la figura 140.

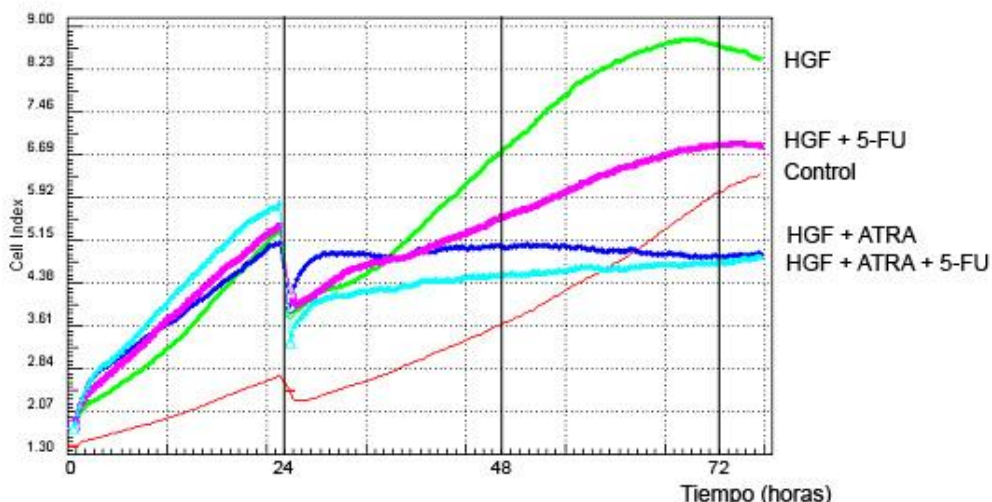


Figura 140. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con HGF (7,5 ngr/ml), e inhibidos o no con 5-FU (0,4 μ gr/ml) (cuantificado mediante xCELLigence).

El Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF) estimula la proliferación de las células ACC-531, mientras que la adición de ATRA o 5-FU inhibe dicho efecto. La adición al medio de ATRA y 5-FU simultáneamente, inhibe la proliferación de las células en mayor medida que ambos por separado.

A continuación se repitió el experimento, pero elevando la concentración de 5-FU hasta 0,5 μ gr/ml, manteniendo sin cambios la concentración de las otras moléculas implicadas. En la figura 141 se muestran los resultados de las dos experiencias realizadas.

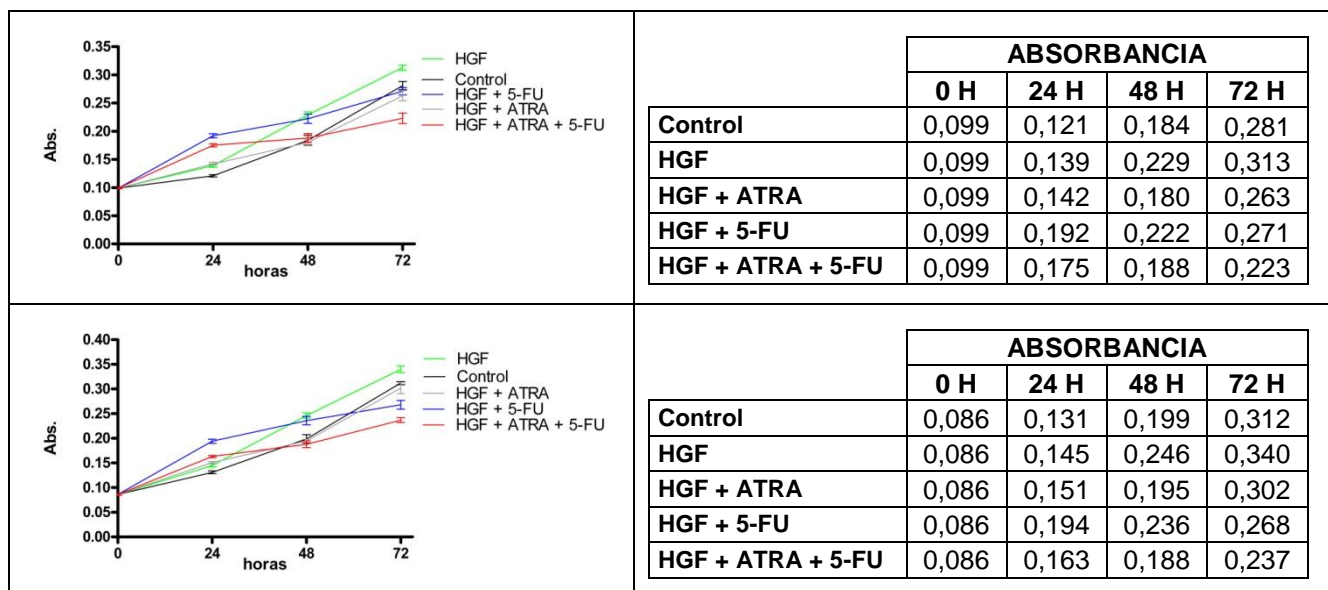


Figura 141. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5% y estimulados con HGF (7,5 ngr/ml), inhibidos o no con y 5-FU (0,5 μ gr/ml) (cuantificado mediante MTT).

El HGF estimula los cultivos en ambas experiencias desde el inicio de su adición al medio (72 horas; HGF vs. Control, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,01$). Dicho estímulo se ve inhibido tanto por el ATRA (72 horas; "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$) como por el 5-FU (72 horas; "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,01$ y $p < 0,001$); si bien el ATRA inhibe la proliferación a partir de las primeras 24 horas y el 5-FU únicamente en las últimas 24 horas. La adición conjunta de ambos fármacos al medio de cultivo inhibe el crecimiento celular en mayor medida que cada uno por separado (72 horas; "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$).

Para corroborar dichos resultados, se repitió la experiencia, pero cuantificando los resultados de proliferación celular mediante NucleoCounter para su medición (fig. 142).

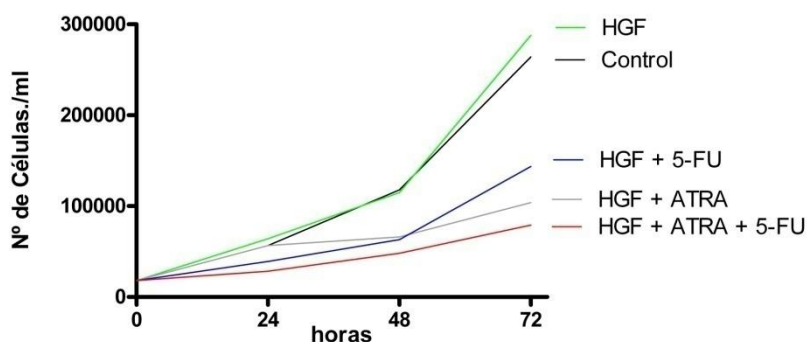


Figura 142. Efecto del ATRA (5 μM) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5% y estimulados con HGF (7,5 ngr/ml), inhibidos o no con y 5-FU (0,5 $\mu\text{gr/ml}$) (cuantificado mediante NucleoCounter).

Tal y como se observa en la figura 142, el efecto estimulador del HGF se pone de manifiesto al finalizar la experiencia (72 horas de cultivo). El 5-FU inhibe el crecimiento celular desde las primeras 24 horas, y dicho efecto se mantiene durante toda la experiencia. El ATRA por su parte también inhibe la proliferación desde las primeras 24 horas, pero su efecto es más importante que el del 5-FU al término del experimento (72 horas). Por último, la combinación de ambos fármacos en el medio a lo largo de toda la experiencia, produce una mayor inhibición de la proliferación celular que cada uno por separado (tabla 107).

Tabla 107. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos estimulados con HGF (7,5 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (0,5 μ gr/ml).

	Nº de células por ml			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	18.225	56.700	117.750	264.000
HGF	18.225	64.125	114.750	287.925
HGF + ATRA	18.225	56.700	66.000	103.950
HGF + 5-FU	18.225	39.150	63.000	143.550
HGF + ATRA + 5-FU	18.225	28.350	48.000	79.200

Una vez completadas las experiencias con concentraciones bajas de ATRA (5 μ M), se repitieron los mismos experimentos pero utilizando una concentración doble de la anterior.

En la figura 143 se muestra el resultado del efecto del ATRA 10 μ M sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con HGF 7,5 ngr/ml, e inhibidos o no con 5-FU 0,4 μ gr/ml.

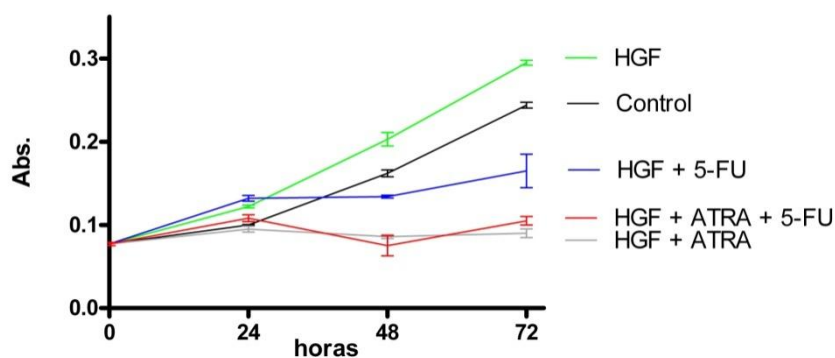


Figura 143. Efecto del ATRA (10 μ M) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5% y estimulados con HGF (7,5 ngr/ml), inhibidos o no con y 5-FU (0,5 μ gr/ml) (cuantificado mediante MTT).

Tal y como muestra la figura 143, el HGF estimula la proliferación de las células a lo largo de toda la curva; y es a partir de las 24 horas cuando se observan los efectos inhibitorios del ATRA y 5-FU. Sin embargo, al haber duplicado la concentración de ATRA en el medio, lo que se produce es un bloqueo absoluto de la proliferación celular, con una curva prácticamente plana (con independencia de que se combine o no con 5-FU) y unos recuentos celulares al finalizar el experimento casi iguales a los de la siembra inicial (tabla 108).

Tabla 108. Efecto del ATRA (10 μ M) sobre cultivos estimulados con HGF (7,5 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (0,5 μ gr/ml).

	ABSORBANCIA			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	0,077	0,100	0,162	0,244
HGF	0,077	0,200	0,203	0,295
HGF + ATRA	0,077	0,177	0,086	0,090
HGF + 5-FU	0,077	0,204	0,134	0,165
HGF + ATRA + 5-FU	0,077	0,182	0,075	0,105

Visto los resultados, se consideró innecesario completar el estudio de los efectos del ATRA a concentraciones 10 μ M. Así pues, en las siguientes experiencias con el resto de Factores de Crecimiento se estudió el efecto de los dos fármacos en sus concentraciones más bajas (ATRA 5 μ M; 5-FU 0,4 μ gr/ml).

1.5.3. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con EGF e inhibidos con 5-FU

El segundo Factor de Crecimiento que se estudió fue el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Las concentración utilizada para los experimentos fue 10 ngr/ml (con la que se había obtenido mejores resultados). En la figura 144 se muestra el efecto producido por el ATRA sobre las células cultivadas en medio suplementado con SRN 0,5% y EGF (10 ngr/ml) y sobre el efecto inhibitorio del 5-FU en el mismo. La medida de la proliferación se llevó a cabo mediante MTT.

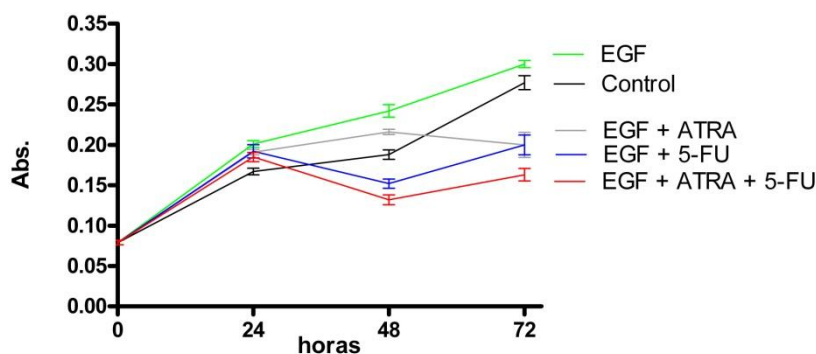


Figura 144. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con EGF (10 ngr/ml), e inhibidos o no con 5-FU (0,4 μ gr/ml) (cuantificado mediante MTT).

La figura muestra claramente el efecto estimulante de la proliferación celular por parte del EGF a lo largo de toda la curva. Por el contrario, la adición al medio de ATRA o 5-FU produce una depresión de la curva a partir de las primeras 24 horas tras su adición al medio, siendo más acentuada la inhibición de la proliferación en aquellos cultivos en los que se hallaban ambos fármacos en el medio de cultivo (tablas 109 y 110).

Tabla 109. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos estimulados con EGF (10 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (0,4 μ gr/ml).

	ABSORBANCIA			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	0,079	0,167	0,188	0,277
EGF	0,079	0,201	0,242	0,300
EGF + ATRA	0,079	0,191	0,216	0,200
EGF + 5-FU	0,079	0,192	0,152	0,200
EGF + ATRA + 5-FU	0,079	0,185	0,132	0,163

Tabla 110. Análisis estadístico ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test") de los resultados mostrados en la figura 144 (no significativo: ns; $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***).

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
EGF vs. Control	-----	**	***	ns
EGF vs. HGF + ATRA	-----	ns	**	***
EGF vs. HGF + 5-FU	-----	ns	***	***
EGF vs. HGF + ATRA + 5-FU	-----	ns	***	***

Para corroborar los resultados obtenidos mediante la técnica de MTT, se optó por repetir la experiencia y medir la proliferación mediante el lector xCELLigence (fig. 145).

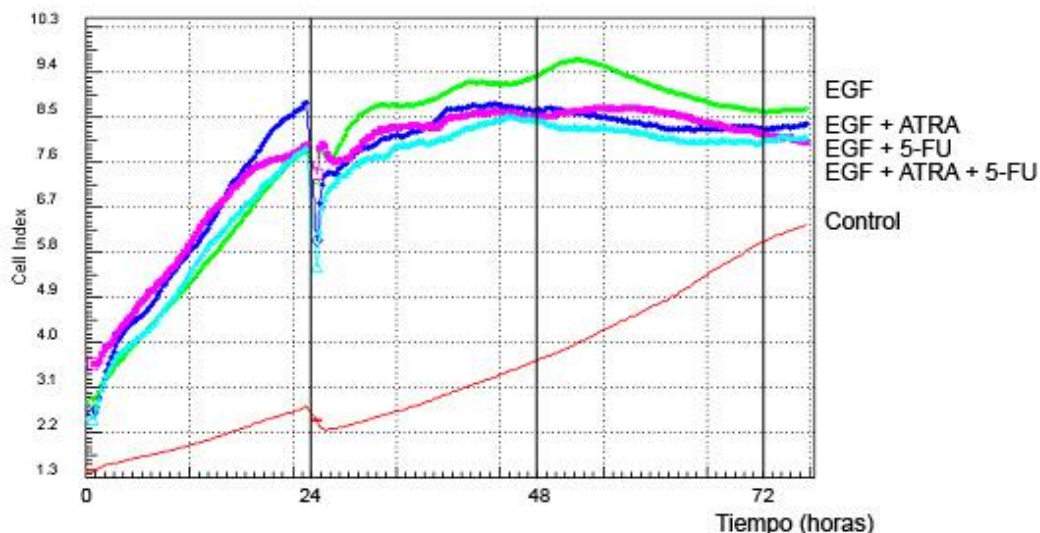


Figura 145. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con EGF (10 ngr/ml), e inhibidos o no con 5-FU (0,4 μ gr/ml) (cuantificado mediante xCELLigence).

En esta experiencia se aprecia como los dos fármacos inhiben de forma similar el efecto proliferativo producido por EGF sobre las células, siendo ligeramente superior la inhibición producida por la suma de ambos fármacos.

1.5.4. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con PDGF e inhibidos con 5-FU

El tercer Factor de Crecimiento que se estudió fue el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), empleándose las concentraciones que habían resultado óptimas para inducir un efecto estimulador de la proliferación de las células ACC-531: 5 ngr/ml, 7,5 ngr/ml y 10 ngr/ml.

a) Ensayos con PDFG 5 ngr/ml

En la figura 146 se muestran los resultados de dos experiencias realizadas en cultivos estimulados con PDGF 5 ngr/ml. La técnica empleada para la medida de la proliferación fue lectura en placa mediante MTT.

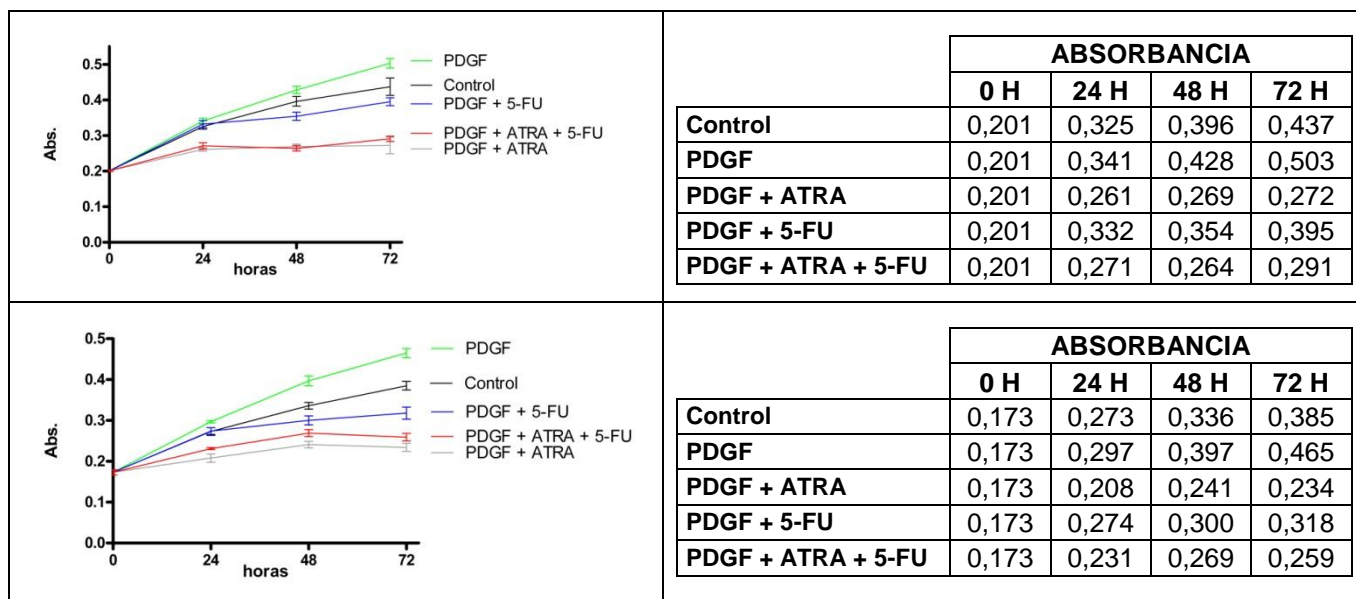


Figura 146. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5% y estimulados con PDGF (5 ngr/ml), inhibidos o no con y 5-FU (0,5 µg/ml) (cuantificado mediante MTT).

En ambas gráficas, el efecto estimulador del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas es evidente a partir de las 24 horas y se mantiene a lo largo de toda la curva.

Por su parte, la adición al medio de ATRA o 5-FU produce una disminución de la proliferación celular, que en el caso del ATRA es casi absoluta. La adición de ATRA a los cultivos inhibidos con 5-FU acentuó significativamente la inhibición obtenida con 5-FU; alcanzando recuentos celulares casi superponibles a los obtenidos con ATRA sólo (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test" $p < 0,05$). En la tabla 111 se resume el resultado del análisis estadísticos de estos resultados.

Tabla 111. Análisis estadístico ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test") de los resultados mostrados en la figura 146 (no significativo: ns; $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***).

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
PDGF vs. Control	-----	ns / ns	* / ***	* / ***
PDGF vs. HGF + ATRA	-----	*** / ***	*** / ***	*** / ***
PDGF vs. HGF + 5-FU	-----	ns / ns	*** / ***	*** / ***
PDGF vs. HGF + ATRA + 5-FU	-----	*** / ***	*** / ***	*** / ***

b) Ensayos con PDGF 7,5 ngr/ml

A continuación, se repitió la misma experiencia, pero estimulando los cultivos con una concentración más elevada de PDGF (7,5 ngr/ml).

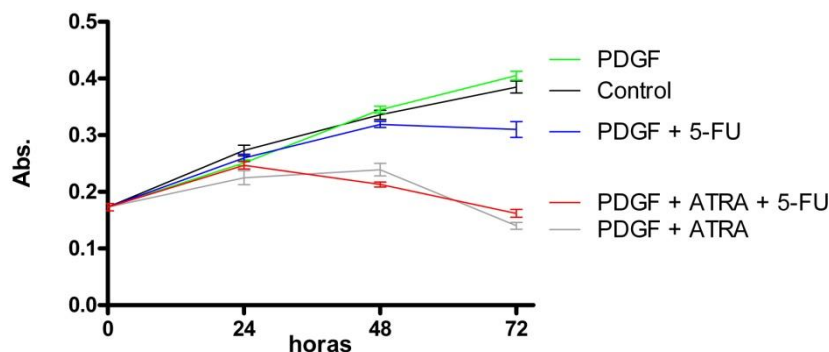


Figura 147. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5% y estimulados con PDGF (7,5 ngr/ml), inhibidos o no con y 5-FU (0,5 µgr/ml) (cuantificado mediante MTT).

En la figura 147 podemos apreciar como con esta concentración de PDGF (7,5 ngr/ml) no se muestra el efecto estimulante de la proliferación de las células ACC-531 hasta las últimas 24 horas. La adición al medio de 5-FU produce una disminución del ritmo proliferativo de las células, evidente a partir de las 48 horas de su exposición al medio (72 horas, "Newman-Keuls Multiple Comparison Test"; $p < 0,001$).

Por otra parte, la adición de ATRA, sólo o combinado con 5-FU, bloquea de manera absoluta la proliferación celular a partir de las primeras 24 horas. Al finalizar el experimento los recuentos celulares se sitúan por debajo de lo sembrado al comenzar la experiencia (tabla 112).

Tabla 112. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos estimulados con PDGF (7,5 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (0,4 µgr/ml).

	ABSORBANCIA			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	0,173	0,273	0,336	0,385
PDGF	0,173	0,251	0,345	0,405
PDGF + ATRA	0,173	0,225	0,239	0,140
PDGF + 5-FU	0,173	0,260	0,319	0,310
PDGF + ATRA + 5-FU	0,173	0,247	0,213	0,162

c) Ensayos con PDFG 10 ngr/ml

Finalmente, se repitió la experiencia aumentando la concentración del PDGF a 10ngr/ml. En la figura 148 se muestran los resultados de dos experimentos consecutivos, realizados con idéntico protocolo. Para la medición de la proliferación celular se utilizó la técnica de MTT.

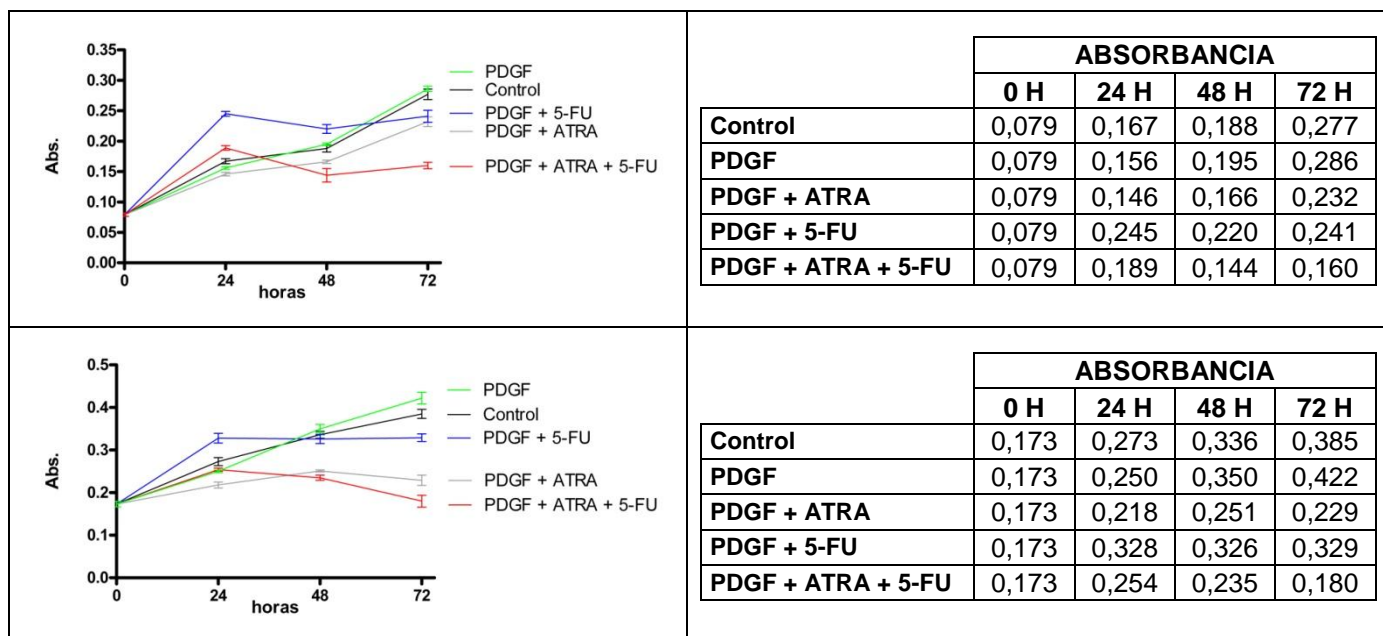


Figura 148. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%y estimulados con PDGF (10 ngr/ml), inhibidos o no con y 5-FU (0,5 µgr/ml) (cuantificado mediante MTT).

Nuevamente, el efecto estimulante de la proliferación celular por parte del PDGF sólo se manifiesta en las últimas 24 horas. La adición del ATRA y 5-FU produce un efecto inhibitor de la proliferación; si bien, dicho efecto sólo se observa en las últimas 24 horas en el caso del 5-FU. La combinación de los dos fármacos produce una inhibición significativamente superior a la inducida por cada uno de ellos por separado. El análisis estadístico de estos resultados se resume en la tabla 113.

Tabla 113. Análisis estadístico ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test") de los resultados mostrados en la figura 148 (no significativo: ns; p<0,05: *; p<0,01: **; p<0,001:***).

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
PDGF vs. Control	-----	* / ns	ns / ns	ns / *
PDGF vs. HGF + ATRA	-----	ns / **	* / ***	*** / ***
PDGF vs. HGF + 5-FU	-----	*** / ***	* / ns	*** / ***
PDGF vs. HGF + ATRA + 5-FU	-----	*** / ns	*** / ***	*** / ***

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos, se repitió la experiencia con la concentración de PDGF 10 ngr/ml, utilizando como técnica de medida el lector de placas xCELLigence (fig. 149).

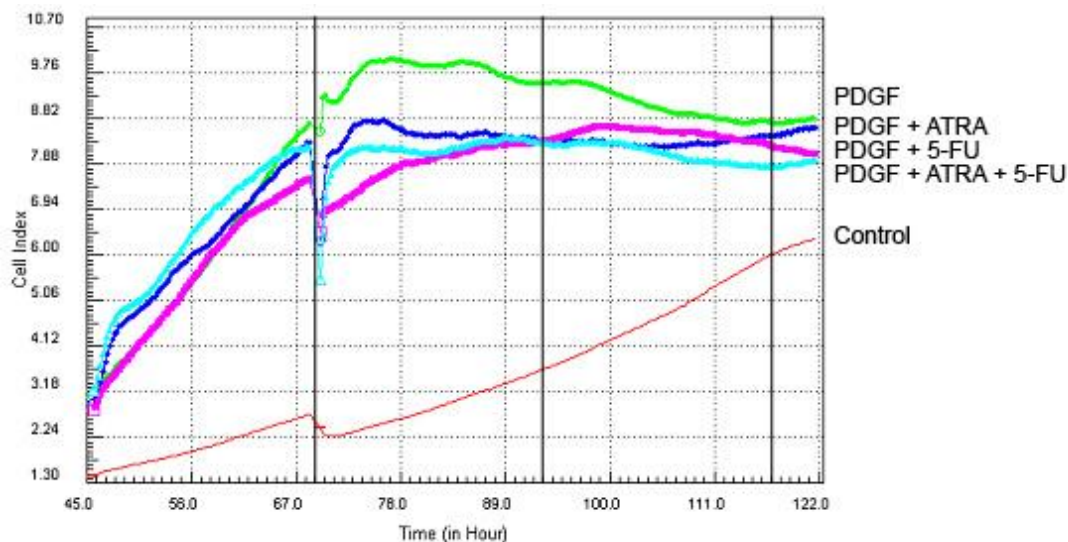


Figura 149. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con PDGF (10 ngr/ml), e inhibidos o no con 5-FU (0,4 μ gr/ml) (cuantificado mediante xCELLigence).

Al contrario de lo que ocurría en las experiencias anteriores, el PDGF muestra ahora su capacidad de estimulación de la proliferación celular desde el inicio de su exposición al cultivo. La adición al medio celular de ATRA o 5-FU produce una disminución de la velocidad de proliferación del cultivo. Esta inhibición resulta ligeramente mayor cuando se combinan ambos fármacos.

1.5.5. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con FGFb e inhibidos con 5-FU

El siguiente factor estudiado fue el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb). Las concentraciones que se utilizaron fueron 5 ngr/ml y 7,5 ngr/ml, y para los primeros ensayos se utilizó el recuento celular mediante la técnica de MTT.

a) Ensayos con FGFb 5 ngr/ml

Los resultados obtenidos con la concentración de factor de crecimiento más baja se resumen en la figura 150.

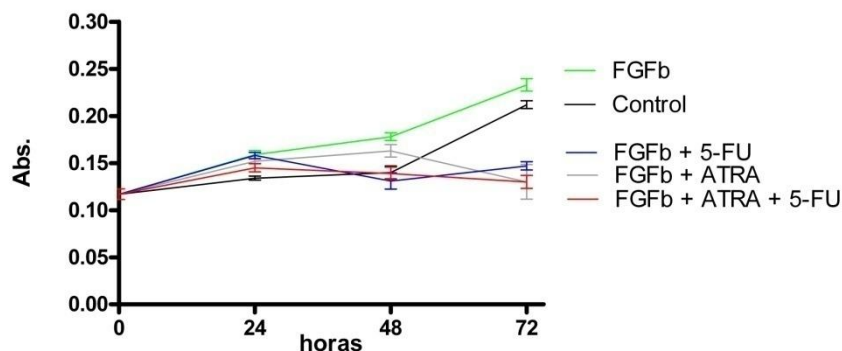


Figura 150. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con FGFb (5 ngr/ml), e inhibidos o no con 5-FU (0,4 μ gr/ml) (cuantificado mediante MTT).

Desde el inicio de su adición al medio, el FGFb estimula las células de ACC-531 que proliferan a mayor velocidad que las de los cultivos control. La adición al medio de cultivo de cualquiera de los dos fármacos (ATRA o 5-FU) provoca un bloqueo completo de la proliferación celular, sin que la combinación de ambos modifique sensiblemente el resultado obtenido (tablas 114 y 115).

Tabla 114. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos estimulados con FGFb (5 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (0,4 μ gr/ml).

	ABSORBANCIA			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	0,117	0,134	0,140	0,212
FGFb	0,117	0,159	0,178	0,233
FGFb + ATRA	0,117	0,152	0,163	0,130
FGFb + 5-FU	0,117	0,158	0,131	0,147
FGFb + ATRA + 5-FU	0,117	0,145	0,139	0,130

Tabla 115. Análisis estadístico ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test") de los resultados mostrados en la figura 150 (no significativo: ns; $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***).

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
FGFb vs. Control	-----	***	**	ns
FGFb vs. HGF + ATRA	-----	ns	ns	***
FGFb vs. HGF + 5-FU	-----	ns	***	***
FGFb vs. HGF + ATRA + 5-FU	-----	ns	**	***

b) Ensayos con FGFb 7,5 ngr/ml

A continuación se repitieron las mismas experiencias, pero aumentando la concentración de factor de crecimiento en el medio de cultivo hasta alcanzar 7,5 ngr/ml. Los resultados se representan en la figura 151.

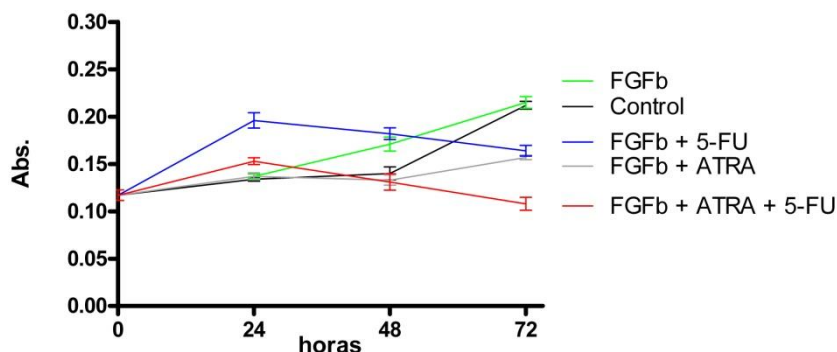


Figura 151. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con FGFb (7,5 ngr/ml), e inhibidos o no con 5-FU (0,4 µgr/ml) (cuantificado mediante MTT).

El FGFb (7,5 ngr/ml) ha estimulado la proliferación celular a partir de las primeras 24 horas de su adición al cultivo. Sin embargo, a las 72 horas el recuento celular muestra valores muy similares al cultivo control.

El ATRA por si sólo inhibe el estímulo proporcionado por el FGFb a lo largo de toda la curva. En cambio, el 5-FU sólo logra su efecto inhibitorio en las últimas 24 horas del ensayo.

La adición conjunta de ATRA y 5-FU inhibe la proliferación de las células ACC-531 a partir de las primeras 24 horas de su exposición, siendo máximo su efecto inhibitorio sobre el cultivo a las 72 horas (tablas 116 y 117).

Tabla 116. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos estimulados con FGFb (7,5 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (0,4 µgr/ml).

	ABSORBANCIA			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	0,117	0,134	0,140	0,212
FGFb	0,117	0,137	0,171	0,215
FGFb + ATRA	0,117	0,137	0,133	0,157
FGFb + 5-FU	0,117	0,196	0,182	0,164
FGFb + ATRA + 5-FU	0,117	0,153	0,131	0,108

Tabla 117. Análisis estadístico ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test") de los resultados mostrados en la figura 151 (no significativo: ns; $p < 0,05$: *; $p < 0,01$: **; $p < 0,001$: ***).

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
FGFb vs. Control	-----	ns	**	ns
FGFb vs. HGF + ATRA	-----	ns	**	***
FGFb vs. HGF + 5-FU	-----	***	ns	***
FGFb vs. HGF + ATRA + 5-FU	-----	*	**	***

1.5.6. Efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con VEGF e inhibidos con 5-FU

Por último, se estudió el efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) utilizado en su concentración óptima para estimular la proliferación de las células ACC-531: 7,5 ngr/ml.

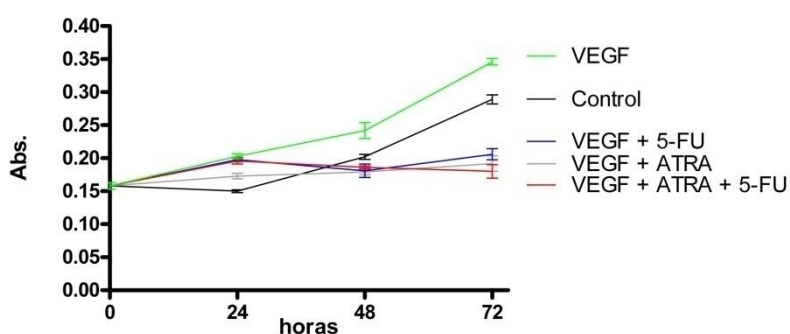


Figura 152. Efecto del ATRA (5 µM) sobre cultivos suplementados con SRN 0,5%, estimulados con VEGF (7,5 ngr/ml), e inhibidos o no con 5-FU (0,4 µgr/ml) (cuantificado mediante MTT).

El VEGF estimula la proliferación de las células ACC-531 desde el inicio de su adición al medio de cultivo. Por otro lado, tanto el 5-FU como el ATRA inhiben la proliferación celular a partir de las 24 horas de tratamiento, llegando a aplanar por completo la curva proliferativa del cultivo. La combinación de ambos no cambia sensiblemente el resultado obtenido con cada uno de ellos por separado (tablas 118 y 119).

Tabla 118. Efecto del ATRA (5 μ M) sobre cultivos estimulados con VEGF (7,5 ngr/ml) e inhibidos con 5-FU (0,4 μ gr/ml).

	ABSORBANCIA			
	0 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas
Control	0,158	0,150	0,202	0,289
VEGF	0,158	0,203	0,242	0,346
VEGF + ATRA	0,158	0,173	0,179	0,192
VEGF + 5-FU	0,158	0,198	0,181	0,206
VEGF + ATRA + 5-FU	0,158	0,196	0,186	0,180

Tabla 119. Análisis estadístico ("Newman-Keuls Multiple Comparison Test") de los resultados mostrados en la figura 152 (*no significativo: ns; p<0,05: *; p<0,01: **; p<0,001:****).

	0 HORAS	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
VEGF vs. Control	-----	***	**	***
VEGF vs. HGF + ATRA	-----	***	***	***
VEGF vs. HGF + 5-FU	-----	ns	***	***
VEGF vs. HGF + ATRA + 5-FU	-----	ns	***	***

2. Estudios “in vivo”

La segunda sección de este capítulo de Resultados recoge los experimentos llevados a cabo “in vivo” con ratas singénicas respecto a la línea celular CC-531. Estos experimentos estuvieron orientados a comprobar si los resultados obtenidos “in vitro” tenían algún paralelismo con la situación real (“in vivo”); es decir, si el ATRA es capaz de frenar el desarrollo de metástasis hepáticas tras cirugía, y si afecta a la efectividad del 5-FU en dicha situación.

La inoculación esplénica de células CC-531 originó la presencia de focos metastásicos en el hígado en un 60% - 75% de los animales (dependiendo de las series). Estos focos alcanzaron un desarrollo suficiente como para poder ser observados a simple vista a torno al día 30 post-inoculación.

Se trata de masas redondeadas, blanquecinas, fácilmente distinguibles del resto del parénquima hepático (fig. 153). Casi siempre se desarrollan superficialmente, por lo que es fácil su recuento. Sin embargo, en ocasiones crecen en el espesor del lóbulo y sólo pueden identificarse si se procede a realizar cortes seriados de 3-4 mm de espesor.

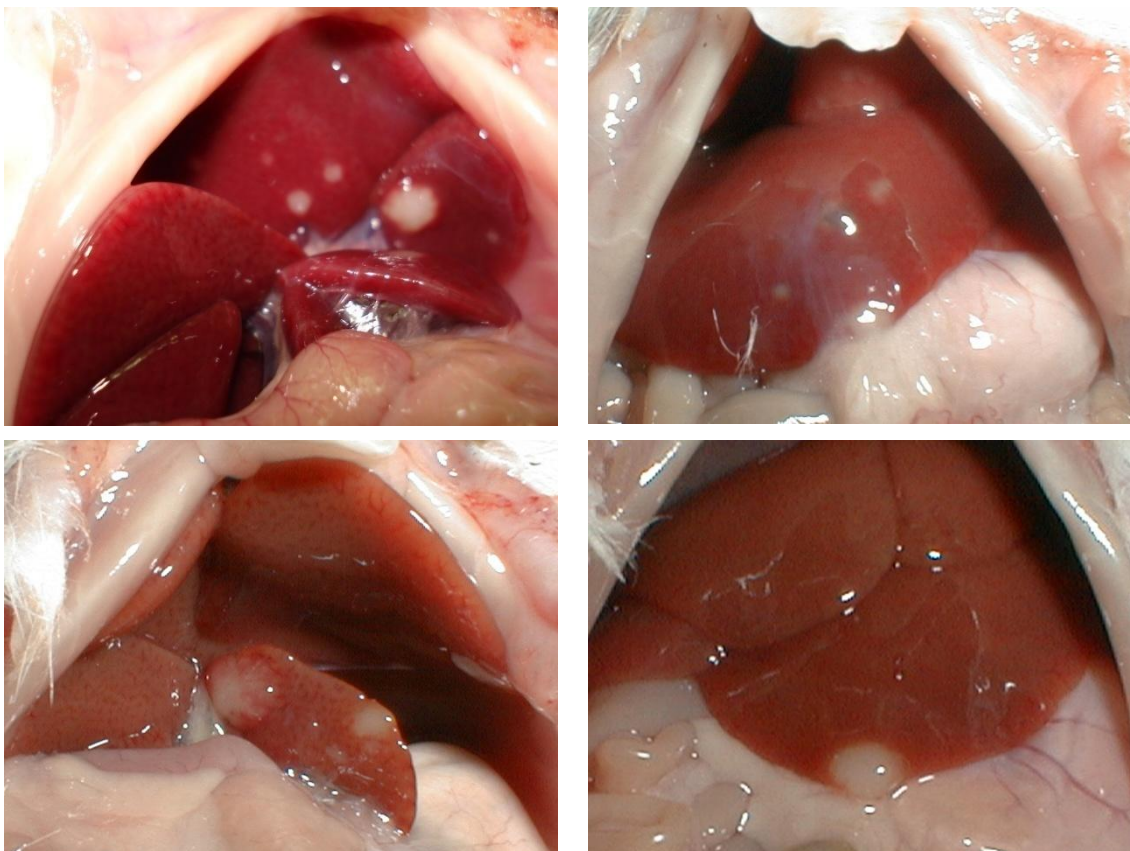


Figura 153. Metástasis de adenocarcinoma de colon (CC-531) inducidas mediante inoculación esplénica.

De todas formas, el desarrollo no es uniforme entre los diferentes animales de cada serie, encontrándose con frecuencia algún animal que presenta focos muy crecidos, que incluso coalescen entre sí (fig. 154).

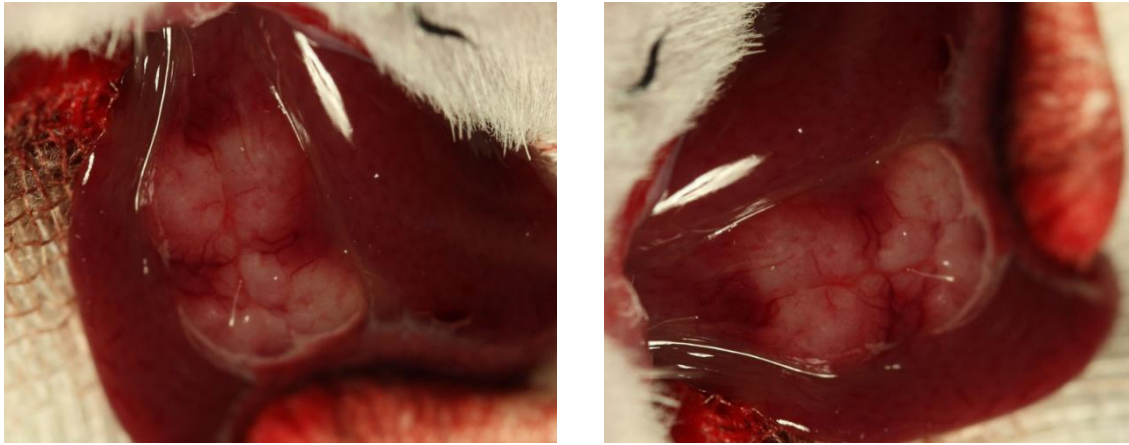


Figura 154. Metástasis confluyentes en la cara posterior del lóbulo paramediano del hígado.

2.1. Efecto de la hepatectomía sobre el desarrollo metastásico

En los animales sometidos a hepatectomía 40% el día 10 de evolución el número de focos metastásicos en el hígado apreciables veinte días después se vio incrementado en más de un 300% (7 vs 2,1; fig. 155). A pesar de la gran variabilidad entre los animales de cada grupo experimental (tabla 120), este incremento alcanzó una importante significación estadística ($p < 0,01$).

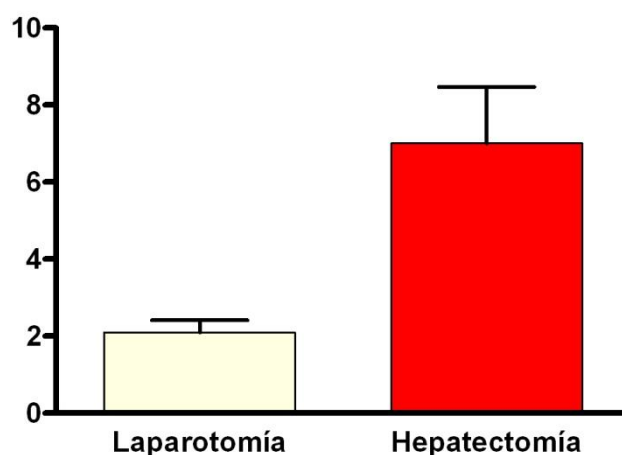


Figura 155. Recuento de focos metastásicos en el hígado el día 30 de evolución ($p=0,0016$).

Tabla 120. Recuento de focos metastásicos

	Laparotomía		Hepatectomía		Análisis
	M	DS	M	DS	T Student
Total	2,1	0,99	7,0	4,41	0,0016
< 1 mm	0,8	0,78	2,6	1,94	0,0087
1 - 3 mm	0,9	0,87	2,3	2,39	0,0475
> 3 mm	0,4	0,52	2,1	2,50	0,0234

Con el fin de conocer con más detalle el comportamiento evolutivo del proceso metastásico, se desglosó el recuento de focos, agrupándolos en tres categorías en función de su tamaño. Tal y como se puede apreciar en la figura 156, el incremento en el número de focos producido por la hepatectomía parcial fue similar en cada una de las tres categorías.

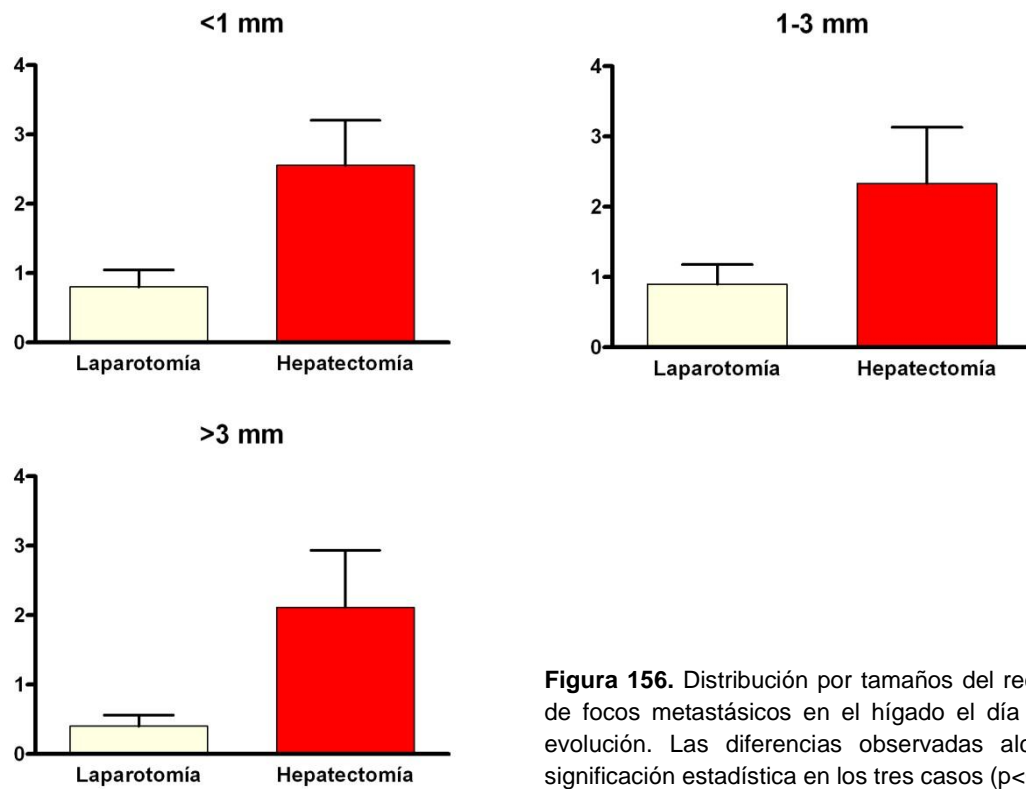


Figura 156. Distribución por tamaños del recuento de focos metastásicos en el hígado el día 30 de evolución. Las diferencias observadas alcanzan significación estadística en los tres casos ($p < 0,05$).

2.2. Tratamiento con ATRA

2.2.1. Efecto sobre el desarrollo metastásico

Los resultados obtenidos en esta serie experimental resultaron algo más dispersos que en otras series, por lo que al someterlos al Test de Normalidad el resultado fue negativo. Ello obliga a presentar estos resultados en términos de mediana y rango (tabla 121), y a utilizar para los análisis un test no paramétrico (Mann Whitney).

Tabla 121. Recuento de focos metastásicos

	Excipiente		ATRA		Análisis p
	Md	Rango	Md	Rango	
Total	6	19 (2-21)	2	27 (1-28)	0,15
< 1 mm	2	5 (1-6)	1	10 (0-10)	0,39
1 - 3 mm	2	7 (0-7)	2	14 (0-14)	0,48
> 3 mm	3	8 (0-8)	0	4 (0-4)	0,02

En conjunto, se observa una reducción en el número de focos en el grupo de animales tratados con ATRA (figura 157), sin embargo la diferencia no alcanza significación estadística.

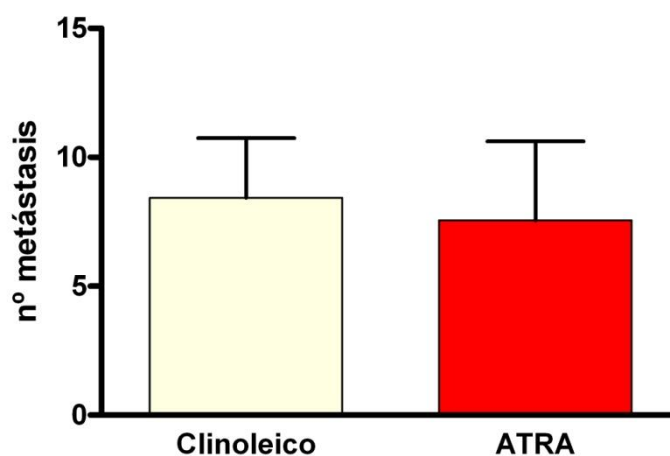


Figura 157. Recuento de focos metastásicos en el hígado el día 30 de evolución (p=0,15).

Al agruparlos por tamaño, se observó que en los animales tratados se redujo significativamente el número de focos mayores de 3 mm (figura 81; 0 vs 3; $p < 0,05$), lo que indica un retardo en el proceso de crecimiento de las metástasis.

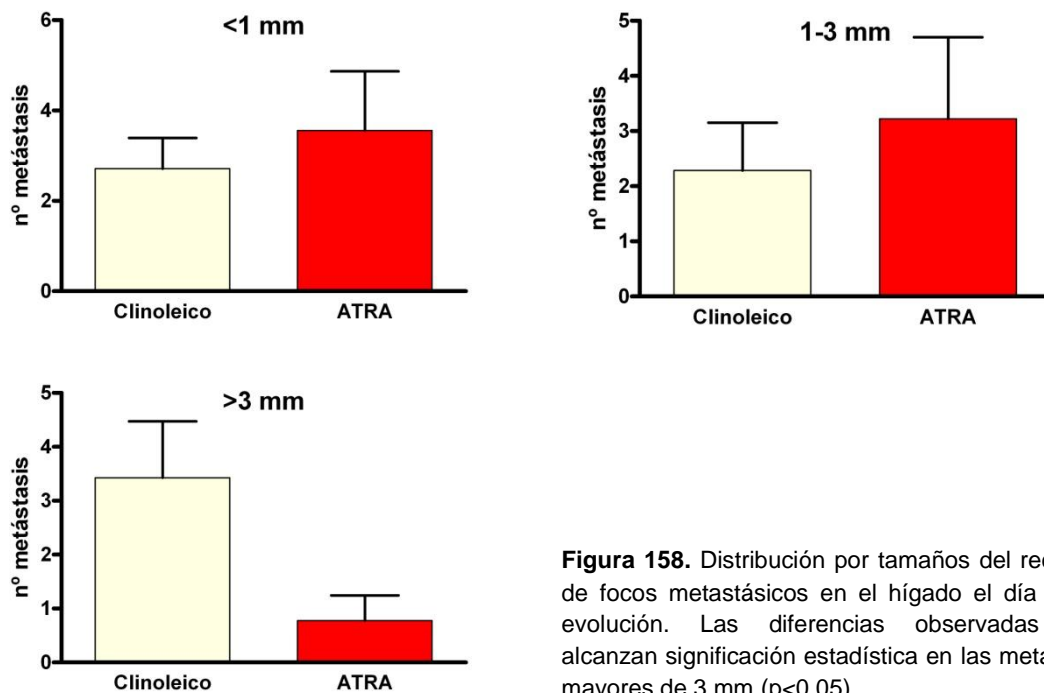


Figura 158. Distribución por tamaños del recuento de focos metastásicos en el hígado el día 30 de evolución. Las diferencias observadas sólo alcanzan significación estadística en las metástasis mayores de 3 mm ($p < 0,05$).

2.2.2. Efecto sobre la supervivencia

En cuanto a la supervivencia de los animales, en los tratados con ATRA los primeros fallecimientos se observan diez días después de los del grupo control. Sin embargo, este ligero retardo no resulta estadísticamente significativo.

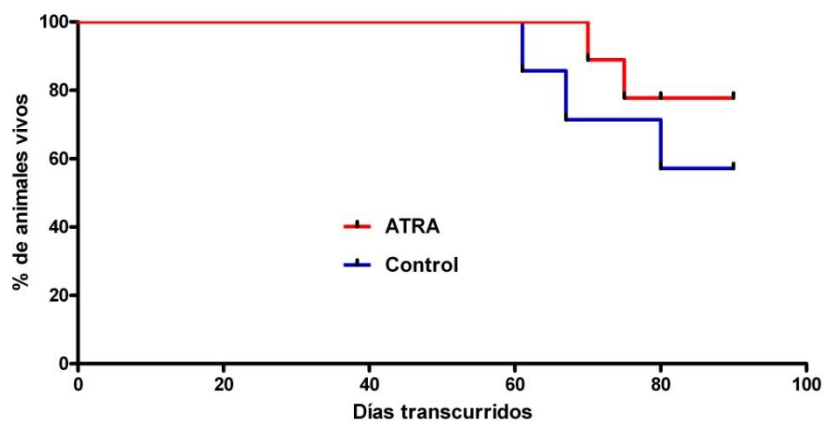


Figura 159. Curva de supervivencia y análisis mediante Kaplan Meier ($p = 0,36$).

De hecho, al prolongar el seguimiento hasta los 150 días, la impresión que produce es justo la contraria, situándose la línea de supervivientes del grupo control por encima de la de los tratados. Sin embargo, tampoco esta diferencia resulta estadísticamente significativa (figura 160).

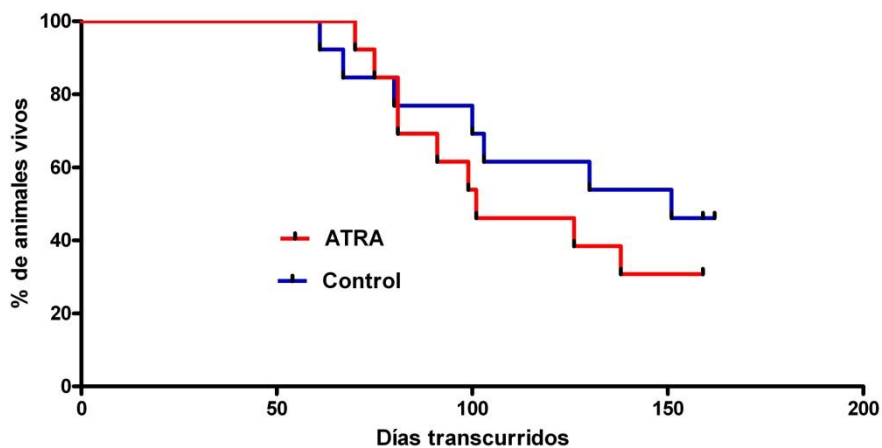


Figura 160. Curva de supervivencia y análisis mediante Kaplan Meier ($p=0,42$).

Por último, si excluimos del estudio los animales que no mostraron metástasis hepáticas, vemos como las dos curvas son prácticamente superponibles (Figura 161).

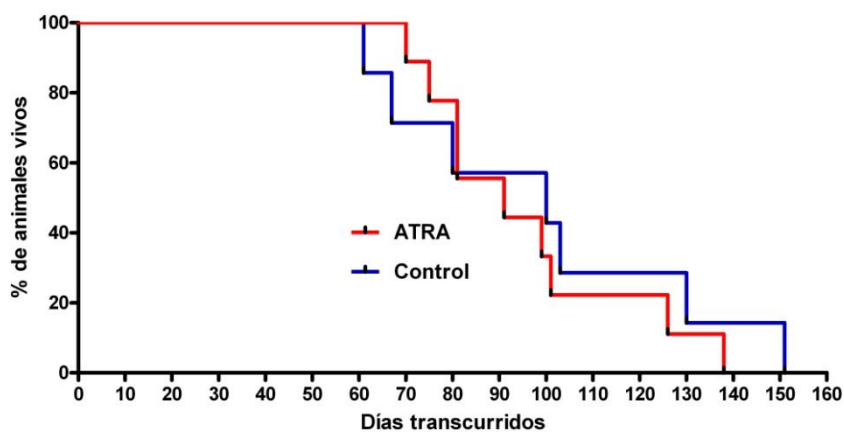


Figura 161. Curva de supervivencia y análisis mediante Kaplan Meier ($p=0,59$) excluyendo los animales que no desarrollaron metástasis hepáticas.

2.3. Tratamiento con 5-Fluor Uracilo

2.3.1. Elección de la dosis terapéutica

Dado que en la literatura se encuentran diversos protocolos de utilización del 5-FU en ratas, realizamos un estudio de toxicidad hematológica con las dos pautas que resultaban más apropiadas para nuestro modelo experimental: tres dosis de 50 o 100 mgr/Kg separadas una semana entre sí (días 13, 20 y 27 de evolución).

En cada una de las dos experiencias se incluyeron tres grupos de animales:

- no operados
- portadores de metástasis
- portadores de metástasis y sometidos a hepatectomía parcial

A su vez, cada uno de esos tres grupos se dividió en dos mitades: una recibió el tratamiento con 5-FU y la otra sólo el solvente.

Los principales resultados obtenidos con la dosis alta de 5-FU se resumen en la figura 162. En cuanto al efecto sobre los leucocitos, produce una deplección casi total de estas células sanguíneas; y esto incluso teniendo en cuenta que los animales con metástasis presentan una leucocitosis franca (9.160 vs 16.500; $p < 0,01$).

También en la serie roja se aprecia un efecto depresor por parte del 5-FU a la dosis de 100 mg/kg, que se manifiesta en una anemia severa (7.856 vs 3.953; $p < 0,001$), una reducción del hematocrito a valores inferiores al 20%, y una reducción de las cifras de hemoglobina a menos de la mitad de los valores normales.

En conjunto se puede afirmar que la dosis estudiada produce en nuestros animales una toxicidad muy grave (fig. 162).

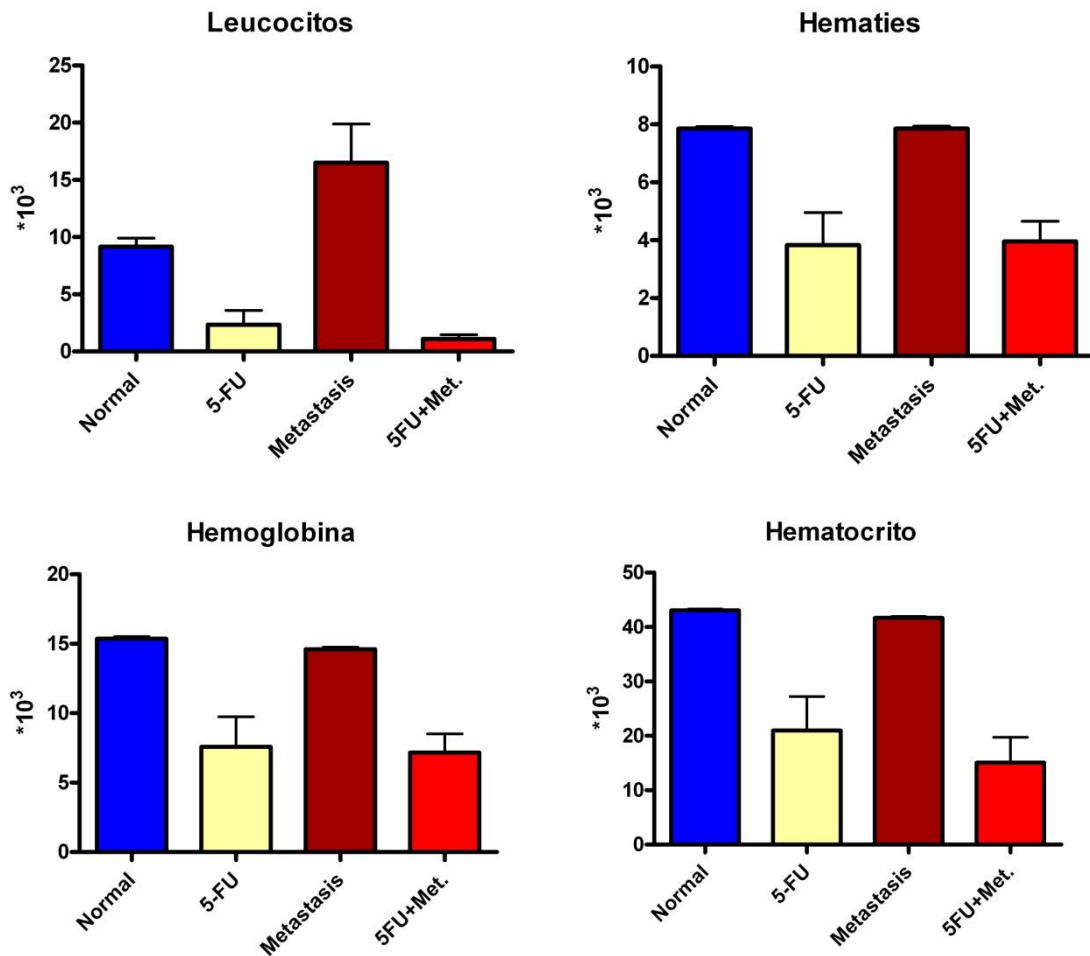


Figura 162. Valores hematológicos de los animales tratados con 5-FU 100 mg/kg.

La serie de animales tratados con la dosis baja de 5-FU presentaron un afectación hematológica igualmente severa en cuanto a la serie blanca se refiere (figura 163). En cambio, en lo que se refiere a la serie roja, la anemia fue muy ligera aunque persistió la pérdida de hemoglobina (todas las diferencias alcanzaron significación estadística).

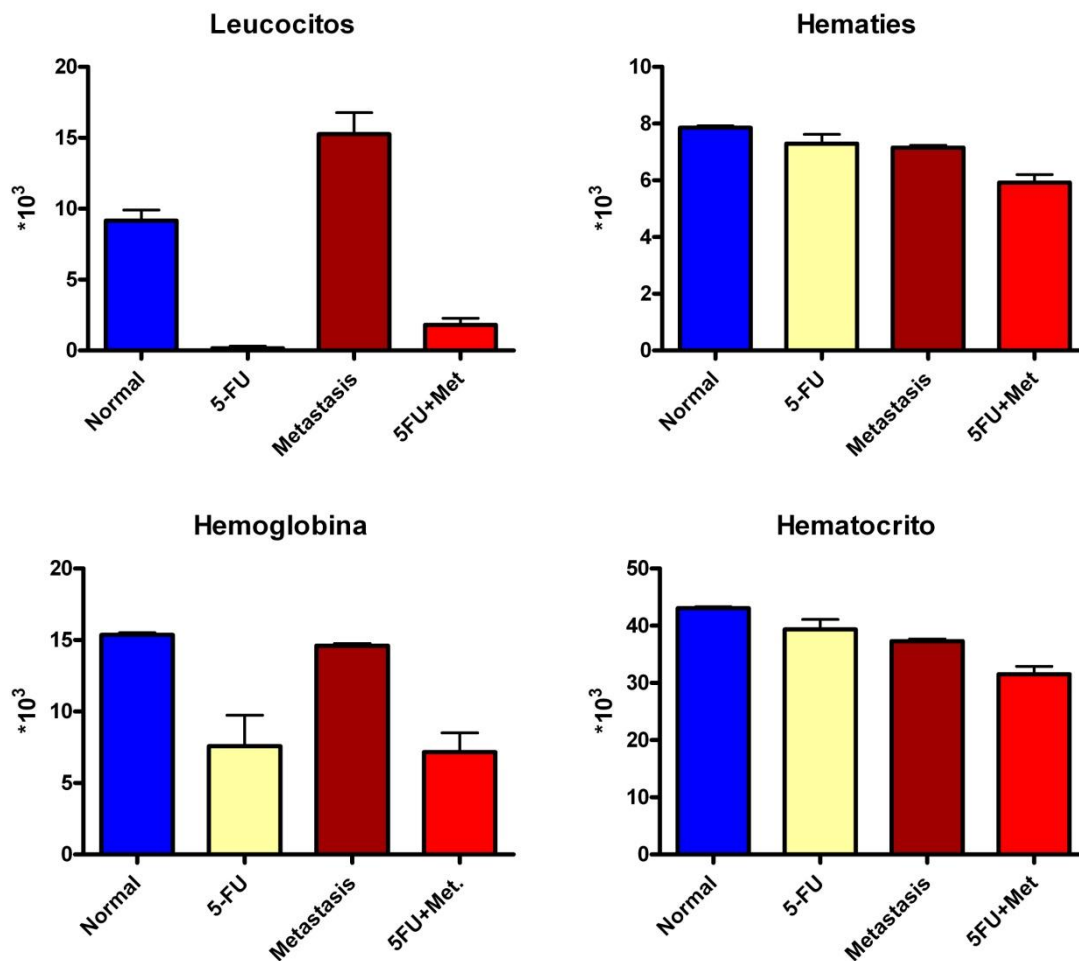


Figura 163. Valores hematológicos de los animales tratados con 5-FU 50 mg/kg.

2.3.2. Efecto sobre el desarrollo metastásico

El tratamiento con 5-FU produjo una reducción dramática en el número de focos metastásicos detectables en el hígado (figura 164). Para poder encontrar metástasis en los animales tratados hubo que retrasar el momento de la evaluación desde el día 30 hasta el 42; en ese momento, en el grupo tratado el recuento de focos mostró menos del 25% de los encontrados en los animales controles (tabla 122).

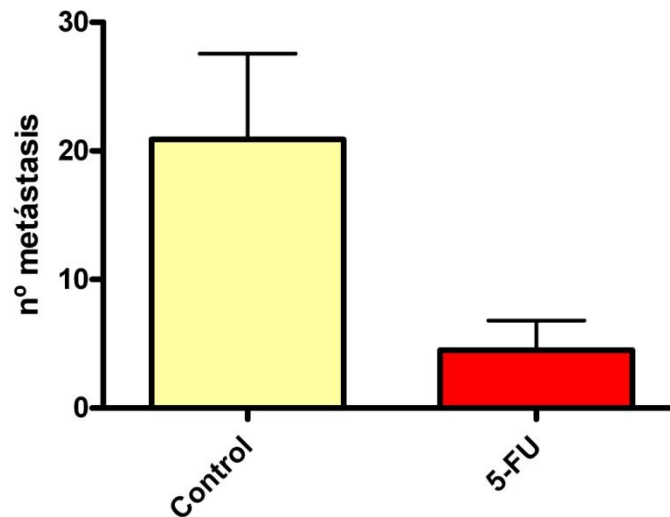


Figura 164. Recuento de focos metastásicos en el hígado el día 42 de evolución ($p=0,0016$).

Tabla 122. Recuento de focos metastásicos en el día 42 de evolución

	Control		5-FU		Análisis
	M	DS	M	DS	T Student
Total	21	6,7	4,5	2,3	0,018
< 1 mm	7	3,1	1,4	0,9	0,0045
1 - 3 mm	8	2,6	2,2	1,1	0,0324
> 3 mm	6	2,0	0,9	0,4	0,0007

La clasificación de las metástasis en función del tamaño mostró una reducción muy similar en cada una de las categorías (figura 165) , a diferencia de lo ocurrido con el ATRA.

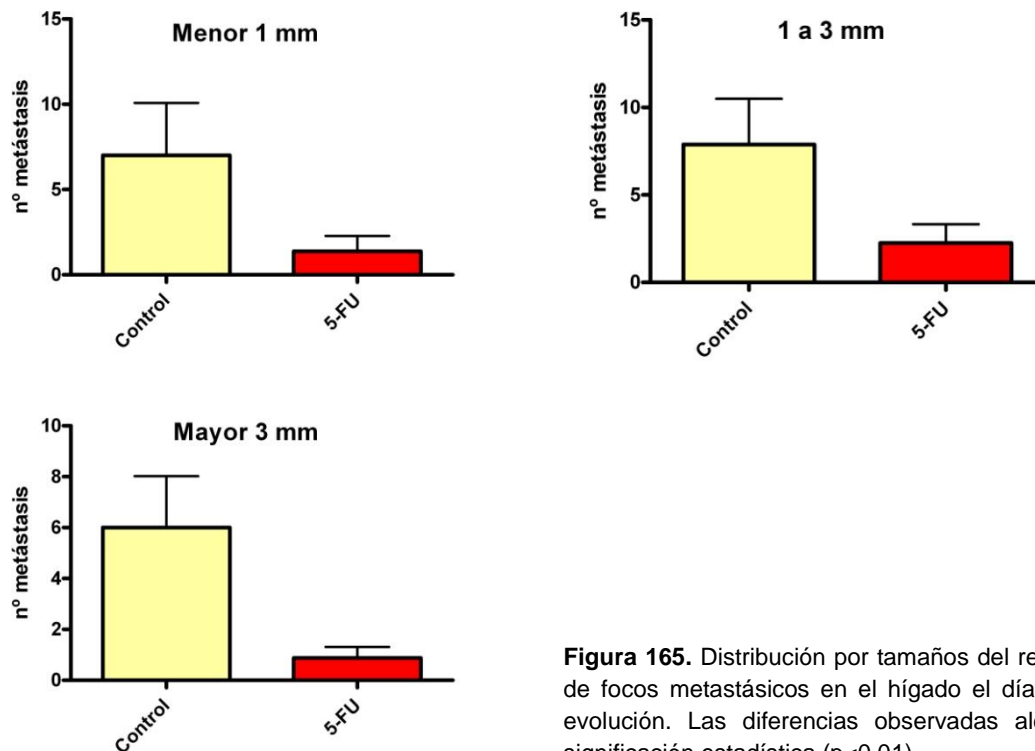


Figura 165. Distribución por tamaños del recuento de focos metastásicos en el hígado el día 42 de evolución. Las diferencias observadas alcanzan significación estadística ($p < 0,01$).

La existencia de un número importante de focos metastásicos permitió analizar también la distribución por lóbulos. Llama la atención que el número no se corresponde con la masa del lóbulo. El lóbulo paramediano supone un 30% del hígado y el lateral izquierdo un 40%, y sin embargo el número de focos en este último duplica al anterior. Este peculiar patrón de distribución no se ve alterado por el tratamiento con 5-FU.

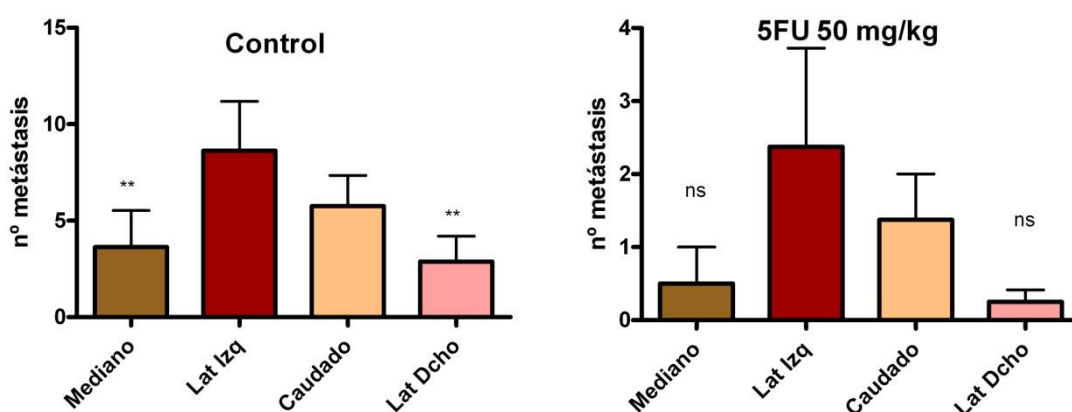


Figura 166. Distribución por lóbulos de las metástasis encontradas. El tratamiento con 5-FU no modifica el patrón de distribución.

2.3.3. Efecto sobre la supervivencia

En el grupo de animales tratados con 5-FU se puede apreciar un ligero retardo en la aparición de las primeras muertes (11 días). Sin embargo, al igual que ocurrió con los animales tratados con ATRA, al prologar el seguimiento más allá de los dos meses, desaparece cualquier diferencia, y las curvas son prácticamente idénticas entre los controles y los tratados (figura 167).

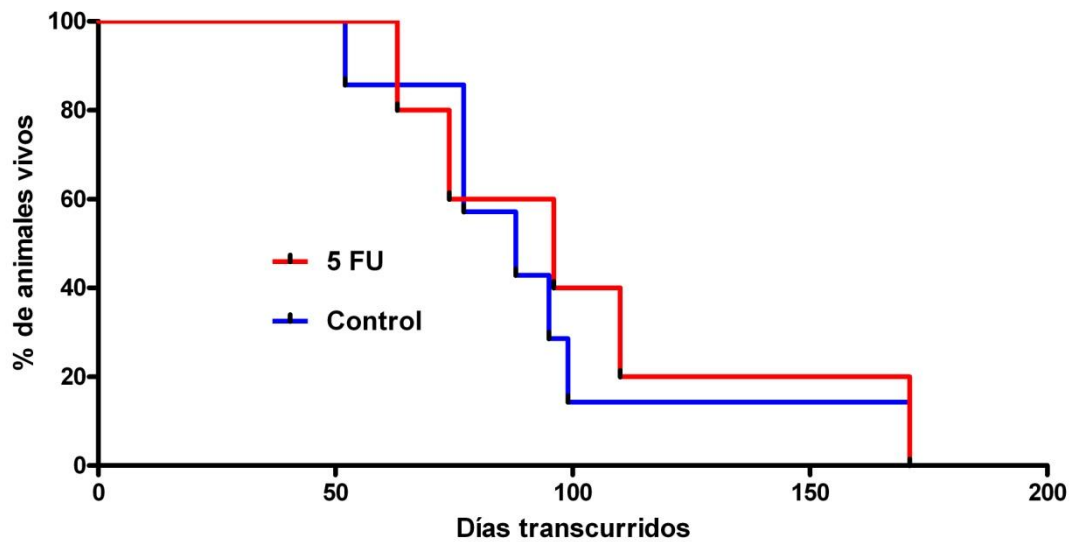


Figura 167. Curva de supervivencia en animales tratados con 5-FU (50 mg/kg).

2.4. Tratamiento con ATRA y 5-Fluor Uracilo

2.4.1. Efecto sobre la evolución metastásica

En las dos primeras series realizadas los animales se sacrificaron el día 42 de evolución y no hubo metástasis en los animales que recibieron ATRA+5-FU. Por ese motivo se realizó una tercera serie en la que los animales fueron vigilados mediante controles ecográficos, decidiéndose el sacrificio al cumplirse la décima semana de evolución.

En el grupo control (tratado únicamente con 5-FU) sólo 4 de los animales desarrollaron metástasis, contabilizándose un total de 13 focos (tabla 123). En el grupo sometido al doble tratamiento sólo tres animales presentaron metástasis, con un total de 9 focos (7 de ellos en el mismo animal). Estos resultados no permiten un análisis estadístico, por lo que no resultan conclusivos.

Tabla 123. Recuento de focos metastásicos en el día 42 de evolución

Animales tratados con 5-FU	Animales tratados con ATRA+5-FU
Rata 1: negativo Rata 2: negativo Rata 3: 1 metástasis de 3 mm en LLD 2 metástasis de 1 mm en LM Rata 4: negativo Rata 5: 1 metástasis de 2 mm en LLD 3 metástasis de 1 mm en LLD 4 metástasis de 1 mm en LM Rata 6: 1 metástasis de 2 mm en LC Rata 7: 1 metástasis de 2 mm en LLD	Rata 1: 1 metástasis de 4 mm en LC Rata 2: negativo Rata 3: negativo Rata 4: negativo Rata 5: 1 metástasis de 1 mm en LLD Rata 6: 1 metástasis de 6 mm en LLD 1 metástasis de 4 mm en LLD 1 metástasis de 2 mm en LLD 1 metástasis de 1 mm en LLD 1 metástasis de 6 mm en LM 1 metástasis de 2 mm en LM 1 metástasis de 1 mm en LM Rata 7: negativo

2.4.2. Efecto sobre la supervivencia

La representación gráfica del control de supervivencia de los animales de esta experiencia (figura 168) muestra un ligero beneficio a favor del grupo que recibió únicamente 5-FU: comienzan a fallecer unos días después, y los últimos animales en morir lo hacen más tarde. Sin embargo, comparación mediante Kaplan Meier muestra que las diferencias observadas no son estadísticamente significativas ($p=0,325$).

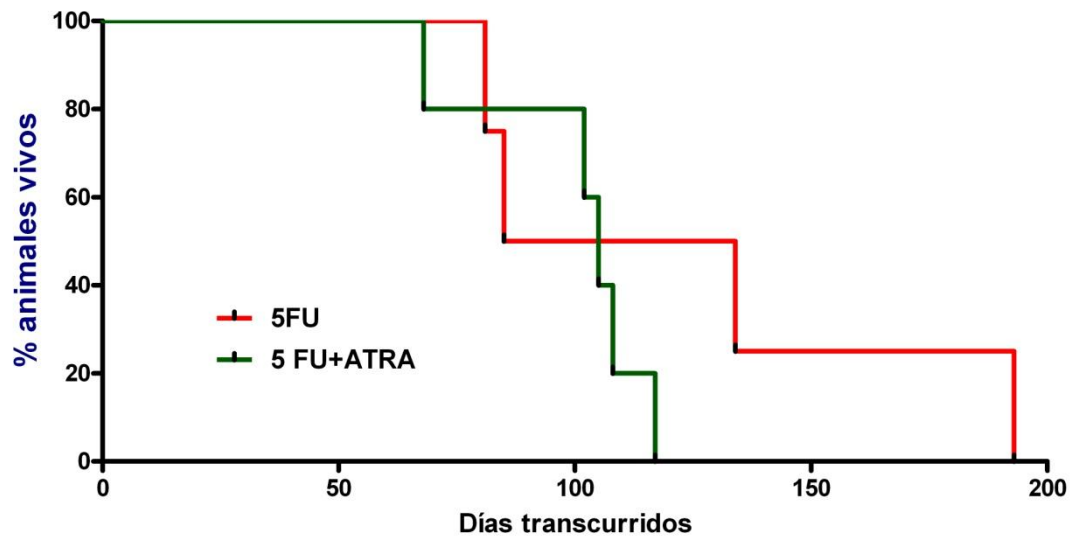


Figura 168. Curva de supervivencia en animales tratados con 5-FU o con ATRA+5-FU.

DISCUSIÓN

Las neoplasias colorrectales constituyen uno de los procesos tumorales más frecuentes en el mundo occidental, representan la tercera causa de patología neoplásica y son responsables de aproximadamente el 10% de las muertes por cáncer. Casi la mitad de los pacientes aquejados de cáncer colorrectal (CCR) desarrollará metástasis hepáticas, y en un 15-25% de ellos está ya presente en el momento del diagnóstico. El tratamiento de elección en la patología metastásica es el quirúrgico, el cual muestra la mejor supervivencia a largo plazo (3).

En este contexto, el conocimiento de la biología del cáncer y de la formación de las metástasis ha conducido al desarrollo de nuevas terapias y modelos de experimentación fundamentados en dicha biología tumoral (183).

En nuestro estudio analizamos el efecto sobre las metástasis hepáticas de la cirugía de resección así como la utilización de los fármacos ácido retinoico (ATRA) y 5-fluorouracilo (5-FU), tanto *in vitro* como *in vivo*.

1. Estudios “*in vitro*”

Para realizar estudios de proliferación celular, especialmente cuando se ensayan tratamientos estimuladores, un paso previo de radical importancia es el establecimiento de un “cultivo control” que a la vez que presenta un cierto ritmo de proliferación, deja margen suficiente para poner de manifiesto la capacidad estimuladora de los agentes sometidos a estudio.

Por este motivo, un paso previo en nuestro trabajo fue constatar la concentración óptima de suero fetal bovino (SFB) en el medio de cultivo que asegure un correcto crecimiento de nuestras células. A raíz de los resultados obtenidos con diferentes concentraciones, la concentración de 10% resultó ser óptima para el crecimiento de las células ACC-531. Otros grupos utilizan concentraciones superiores (202) o inferiores (203), no obstante, optamos por utilizar la del 10% (204) que daba idéntico resultado que las de 15% y 20% pero mayor estímulo proliferativo que la del 5%. Así pues, para los procedimientos de descongelación, pases, mantenimiento y congelación de las células se utilizó medio complementado con el estándar SFB 10%.

1.1. Suero de rata hepatectomizada y proliferación celular

Sin embargo, este procedimiento estándar no resulta un control adecuado para nuestro trabajo, ya que al estudiar el efecto del suero de ratas sometidas a hepatectomía parcial no es posible separar el efecto del suero en sí del de aquellas moléculas aportadas por la resección hepática. Así pues, hubimos de definir un control basado en el estímulo de los cultivos con

suero obtenido de ratas WAG/RijCrl normales (SRN), es decir, sin haber sufrido intervención alguna. El SRN produce un mayor estímulo proliferativo sobre las células en comparación al SFB, llegando a estimular el SRN a la concentración de 5% de igual manera que el SFB al 10%. Efecto lógico por otra parte debido a que las células ACC-531 provienen a su vez de ratas WAG-Rij singénicas.

En cuanto al efecto que el suero de ratas sometidas previamente a hepatectomía (SRH), en nuestras experiencias ha mostrado un claro efecto estimulador de la proliferación celular. Este hallazgo está en consonancia con experimentos similares llevados a cabo por nuestro grupo en otras líneas celulares (154). Otros grupos de investigadores también han encontrado un efecto proliferativo del SRH sobre las células. Penelope Little et al. demostraron que la adición de suero de rata hepatectomizada a cultivos de hepatocitos promovía el crecimiento de los mismos al inducir su entrada en fase S (205). Otro grupo de investigación californiano descubrió que la adición al medio de suero de rata hepatectomizada en cultivos de células hepáticas procedentes de ratas fetales, originaba un incremento en la síntesis de DNA así como de proteínas (206).

Hay que tener en cuenta que para comparar el efecto estimulador de la proliferación celular que el SRH produjo sobre nuestros cultivos, tuvimos que reducir la concentración de los sueros con el fin de evidenciar más claramente las diferencias entre ellos. Utilizando concentraciones del 2,5% ó 0,5% el SRH produjo un mayor estímulo de la proliferación celular que el SRN; efecto no apreciado con concentraciones superiores de suero. No obstante estos resultados no se corresponden con los obtenidos por otro grupo de investigación (203) el cual cultivó las células ACC-531 durante 72 horas en medios enriquecidos con SRN y SRH obtenido a las 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas a partir de la hepatectomía. Del estudio de los datos obtenidos (total de ADN) no obtuvieron diferencias significativas en ninguno de los casos al comparar el crecimiento celular del medio con SRH con respecto al control (SRN).

La contraposición de los resultados obtenidos por este grupo con respecto a los nuestros puede ser explicada tal vez por error metodológico o por haber llegado las células sembradas en placa a la confluencia tras haber estado 72 horas. Como ellos mismos indican, sus resultados muestran que las células CC-531 expresan un patrón de RNAm de Receptores de Factores de Crecimiento que podría permitir la estimulación del crecimiento de estas células por los Factores de Crecimiento producidos por el hígado al regenerarse. Esta afirmación se contradice con sus propios resultados de proliferación celular en placa. Tal vez un estudio del crecimiento celular a intervalos de tiempo inferiores a las 72 horas hubiesen aportado una información más esclarecedora.

1.2. Factores de Crecimiento y proliferación celular

Una vez demostrado que la cirugía de resección hepática conlleva un proceso de regeneración del hígado durante el cual se liberan Factores de Crecimiento que estimulan el crecimiento de las células cancerígenas remanentes en el hígado, se procedió al estudio in vitro del efecto individualizado de los Factores de Crecimiento sobre las células.

Tras el estudio de los efectos sobre los cultivos de diversas concentraciones del Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF), se observó que la adición del factor HGF (7,5 ngr/ml) producía un efecto estimulador de la proliferación celular en placa. Otros grupos de investigación han obtenido resultados similares, demostrando la capacidad estimuladora de la proliferación celular del HGF en diversas líneas celulares como en células pancreáticas (207), de adenocarcinoma gástrico (208) o de colon (209, 210), cáncer de vejiga (211), hepatocitos (109; 212) etc. mediante diversas experiencias in vitro. Merece la pena destacar que la concentración a la que el HGF ha resultado eficaz es muy similar a la que se puede encontrar en el suero de pacientes sometidos a importantes resecciones hepáticas (209).

El siguiente factor de crecimiento que se adicionó a los cultivos con el fin de observar su posible efecto proliferativo sobre los mismos, fue el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Concentraciones cercanas a 10 ngr/ml producían un estímulo proliferativo sobre las células ACC-531 en comparación a las sin tratar. Otros autores demostraron con anterioridad este efecto del EGF sobre otros cultivos celulares como es el caso del grupo C. Kent Osborne el cual demostró el efecto estimulador del EGF sobre cultivos de células de cáncer de mama humano (213).

En tercer lugar, se evaluó el efecto sobre los cultivos del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF). Se observó que concentraciones del orden de 5-10 ngr/ml estimulaban los cultivos celulares. Estos resultados corroboran los ya obtenidos por otros grupos en los que señalan al PDGF como factor estimulante del crecimiento celular y la angiogénesis. Lee SW et al. demostraron que cultivos celulares de cáncer de colon C-26 cultivados con medio complementado con suero extraído de ratones Balb/C hembras laparotomizadas proliferaban en mayor medida que los cultivos control. Además, observaron que dicho estímulo era producido por el aumento en la concentración del factor PDGF en el suero (214). En otro estudio llevado a cabo por un grupo japonés en el cual se cultivaban miofibroblastos y células endoteliales en placas de 24 pocillos con diversas concentraciones del factor en el medio de cultivo, se demostró que el PDGF (5 ó 10 ngr/ml) inducía un estímulo del crecimiento de la capilaridad (215).

Se continuó el estudio utilizando en esta ocasión el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (FGFb), confirmando que el FGFb, a una concentración de 2,5-5 ngr/ml, producía un efecto estimulador en la proliferación de los cultivos con células ACC-531.

Resultados similares se han obtenido también en otras líneas celulares, como en las células mesoteliales de ovario con las que Emilia Pierro et al. demostraron el efecto potenciador de la proliferación del FGFb (10 ngr/ml) al cultivarlas en su presencia (216). Otro grupo de investigación demostró que células de adenoma paratiroideo cultivadas en placas de 12 pocillos aumentaban su ritmo proliferativo al ser estimuladas por el factor FGFb (10 ngr/ml) (217).

Finalmente, se evaluó el efecto del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), obteniendo nuevamente una estimulación de la proliferación de nuestras células mediante la adición al medio de concentraciones de VEGF en torno a 7,5 ngr/ml. Utilizando líneas celulares distintas a la empleada por nosotros pero obteniendo resultados similares, otros grupos de investigación han demostrado también la capacidad que el VEGF posee en la estimulación de la proliferación celular. El mismo grupo que demostró el efecto proliferativo del FGFb sobre las células de adenoma paratiroideo demostró igualmente el efecto del VEGF sobre esta línea celular de adenoma. En su caso, la concentración óptima del factor resultó ser de 20 ngr/ml (217). Por otra parte, en las revisiones llevadas a cabo por Napoleone Ferrara, este autor describe el factor VEGF, confirmando su actividad como agente inductor de mitogénesis y angiogénesis entre otras (218,219).

1.3. Efecto del ATRA sobre la proliferación celular

Una vez demostrada la capacidad que tienen los Factores de Crecimiento HGF, EGF, PDGF, FGFb y VEGF de estimular por sí solos los cultivos celulares in vitro de ACC-531, se procedió a estudiar el comportamiento de las células tumorales adicionando al medio de cultivo el fármaco all-trans retinoico (ATRA). Tras un primer estudio de los efectos de diversas concentraciones del fármaco en medio con SRN 5% (equivalente al 10% del estándar SFB), se observó que la concentración de 10 μ M producía un efecto inhibitorio, llegando a las 72 horas a recuentos celulares cercanos a la mitad de los del cultivo sin tratar. Por otra parte, se vió que concentraciones bajas de ATRA producían un leve efecto potenciador de la proliferación celular.

Este efecto inhibitorio de la proliferación celular in vitro originado por el ATRA ha sido constatado en diversas líneas celulares: células cancerosas de páncreas humano (220, 221), células de cáncer de ovario (222), células de hepatoma humano, cáncer de mama y de pulmón (223), células Müller de rata (224) o queratinocitos (225), entre otras. Con respecto al tipo celular de cáncer de colon, otros autores han señalado también la capacidad inhibitoria del ATRA sobre los cultivos in vitro con concentraciones similares a las utilizadas por nuestro grupo. Eun Young Park et al. sembrando células de adenoma colorrectal HCT-15 en placas de 12 pocillos con medios a los que se les había añadido concentraciones crecientes de ATRA (0,1, 1 y 10 μ M), demostraron que el fármaco producía una inhibición de la proliferación,

llegándose a las 96 horas de su adición al medio a recuentos cercanos a la mitad de los del cultivo control (226).

No obstante, hay estudios que demuestran que no todas las líneas celulares son susceptibles de ver disminuída su proliferación a causa del ATRA, como es el caso de las líneas de cáncer de colon humano HCT-116, SW620 o la línea WiDR (226). Ciertas líneas celulares pueden incluso llegar a ver aumentado su ritmo proliferativo como consecuencia de la adición de ATRA al medio, como resulta en el caso de la línea MC-26 de cáncer de colon. En este estudio, las células MC-26 fueron cultivadas durante 4 días en presencia de concentraciones crecientes de ATRA (10^{-10} - 10^{-7} M). El resultado fue que las células cultivadas con el fármaco vieron estimulada su proliferación de manera dosis-dependiente, con un efecto máximo (~50% por encima de los recuentos del cultivo control) con la concentración de 10^{-8} M de ATRA (227).

Con el fin de evaluar el efecto del ATRA sobre cultivos estimulados con los Factores de Crecimiento, y puesto que en dichos experimentos la concentración de SRN se ve reducida al 0,5%, previamente se realizaron una serie de experiencias con concentraciones decrecientes de SRN y ATRA. El efecto del ATRA 10 μ M no produjo cambios significativos en la proliferación celular al reducir la concentración de SRN a la mitad (2,5%). Por su parte, la concentración de ATRA 5 μ M mostró un efecto antiproliferativo que no se dió con SRN 5% en el medio. Estos resultados evidencian la dependencia entre las concentraciones de ATRA y suero, siendo el estímulo antiproliferativo del ATRA inversamente proporcional a la concentración de suero en el medio de cultivo. Posteriormente, se redujo la concentración del suero al 1%, obteniéndose resultados similares.

Finalmente se estudió el efecto del ATRA sobre cultivos con la concentración más baja de SRN, 0,5%. Las dos concentraciones de ATRA mostraron un efecto antiproliferativo muy superior, produciendo las concentraciones de 5 μ M y 10 μ M una reducción del 25% y del 50% respectivamente, en comparación al cultivo control; datos que corroboran la afirmación anterior consistente en el hecho de que la progresiva reducción de la concentración del SRN en el cultivo se acompaña de un incremento progresivo en la sensibilidad de las células ACC-531 frente al ATRA.

Dado que la mayoría de los experimentos se debían realizar en medio enriquecido con SRN al 0,5%, se amplió el espectro de concentraciones de ATRA. De este modo, se observó que concentraciones ínfimas de ATRA (0,01 y 0,005 μ M) estimulaban el crecimiento de los cultivos mientras que concentraciones altas del fármaco (15 y 20 μ M) inhibían el crecimiento celular, obteniéndose recuentos celulares muy por debajo del control. Estas observaciones resultan difíciles de contrastar con otros grupos de investigación debido a la escasa bibliografía existente al respecto.

Una vez analizado el efecto del fármaco sobre las células cultivadas en condiciones normales, se procedió a enriquecer los cultivos con SRH a diferentes concentraciones. Puesto que la primera concentración de suero a la que se observaron diferencias entre el SRN y el SRH fue la de 2,5%, se comenzó con ella puesto que el objetivo era comprobar si el ATRA era capaz de reducir el efecto estimulador del SRH frente al SRN. Se estudiaron concentraciones de ATRA de 1, 5 y 10 μM , resultando una inhibición significativa de los cultivos únicamente con la última. Al disminuir la concentración de SRH al 1%, las concentraciones de 5 y 10 μM producen una disminución de la proliferación celular; si bien, ésta resulta más acentuada con la concentración mayor. Finalmente, con la concentración de SRH al 0,5%, dado que es la concentración con la que se van a realizar la mayoría de las experiencias, se estudiaron tres concentraciones diferentes de ATRA: 0.05, 5 y 10 μM . En esta ocasión, la concentración más baja de ATRA produjo un efecto estimulador de la proliferación celular, mientras que la concentración de 5 μM redujo la proliferación de las células a valores cercanos a la mitad del control. Por su parte, la concentración más alta del fármaco resultó excesiva para los cultivos, bloqueando en su totalidad el crecimiento celular.

Nuevamente se puede observar el efecto dosis dependiente del ATRA y la importancia de la concentración de suero en el medio. A medida que se disminuye la concentración de SRH en el medio, las células se muestran más sensibles al ATRA.

A raíz de los resultados, se optó por utilizar la concentración de 5 μM de ATRA en las sucesivas experiencias. Concentración que, por otra parte, se enmarca dentro de los valores no tóxicos del fármaco en cuestión (177).

1.4. Efecto del ATRA sobre el estímulo producido por los FC

Tras establecer las concentraciones óptimas de ATRA (5 μM) y de suero (0,5%), se procedió al estudio de los efectos del fármaco sobre cultivos estimulados con los Factores de Crecimiento de manera individual.

Comenzando con el factor HGF en su óptima concentración (7,5 ngr/ml), se observó que el ATRA producía un efecto inhibitor sobre aquellos cultivos a los que se añadía, llegando a valores de recuentos celulares inferiores a los cultivos sin tratar con ATRA ni con factor. Si bien este efecto se puso de manifiesto en las experiencias valoradas mediante la lectura de absorbancia por MTT o mediante lector xCELLigence, resultó mucho más evidente cuando el recuento celular se llevó a cabo mediante el lector NucleoCounter. Estas diferencias son debidas a las propias limitaciones de cada técnica en particular, como pueden ser el rango de absorbancias en el que resulta fiable la gráfica con el MTT, los cambios en las propiedades y características entre placas de 96 pocillos (MTT y xCELLigence) y de 24 pocillos

(Hemocitómetro y NucleoCounter), etc (228). No obstante, nadie duda de la utilidad de estas técnicas a la hora de estimar el recuento de poblaciones celulares reducidas. Muchos son los grupos de investigación que se valen de estas técnicas, como es el caso de un grupo germano que se valió del uso del hemocitómetro, ensayo del MTT y ensayo de la incorporación de [3H]- timidina para estudiar los efectos de los factores de crecimiento en la proliferación de los queratinocitos y fibroblastos humanos *in vitro* (229). Otro ejemplo lo tenemos en el trabajo llevado a cabo por Dimpalkumar Shah y colaboradores en el que defienden el uso del NucleoCounter como técnica eficiente frente a otras, para la determinación del número de células así como de la viabilidad de las mismas en cultivos de células animales (230).

En el caso del Factor de Crecimiento EGF (5 ngr/ml y 10 ngr/ml), los cultivos tratados con el fármaco ATRA (5 μ M) mostraron una disminución de la proliferación en comparación con aquellos no tratados. El ATRA inhibió de manera significativa el efecto proliferativo ejercido sobre las células por el FC en sus dos concentraciones óptimas. Existen diversos estudios que tratan de aclarar las bases moleculares por las que el ATRA inhibe la proliferación *in vitro* de células estimuladas con EGF, como es el caso del grupo chino de Fei Liu et al., que utilizando la línea humana de hepatocarcinoma 7721 demostró que la expresión del gen supresor de metástasis nm23-H1 aumenta en presencia del ATRA (1-10 μ M) y que disminuye en presencia del EGF (10-20 ngr/ml) (231).

El siguiente factor que se utilizó fue el PDGF, en las concentraciones de 5 y 10 ngr/ml. En ambos casos, la adición del ATRA al medio de cultivo produjo un efecto inhibitorio de la proliferación celular, siendo además este efecto mucho más marcado que con los factores de crecimiento anteriores. Se han obtenido resultados similares con otras líneas celulares, como son las células del músculo liso. Miano et al. utilizando cultivos de células vasculares de músculo liso en placas multipocillo con medios con o sin ATRA (2×10^{-6} mol/L) en presencia o en ausencia de PDGF (10 ngr/ml) demostraron que el ATRA es capaz de modular la síntesis de ADN estimulada por el factor PDGF de manera dosis-dependiente (232). Otros grupos también han obtenido resultados similares, como es el caso Wakino et al., quienes han realizado cultivos de células de músculo liso de arteria coronaria humana, con concentraciones variables de ATRA (0,002, 0,02, 0,2 y 2 μ M) y de PDGF (20 ngr/ml) (233). Queda confirmada de esta manera la capacidad que posee el fármaco ATRA de inhibir la proliferación de cultivos celulares estimulados con el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas y que además, esta inhibición se produce de manera dosis-dependiente.

A continuación se llevaron a cabo experimentos en los que se cultivaron células en medios a los que se les había añadido el factor FGFb y ATRA. Las concentraciones utilizadas para el FGFb fueron 2,5, 5 y 10 ngr/ml, y para ATRA 5 μ M. En esta ocasión también se demostró la inhibición de la proliferación producida al añadir el ATRA a los cultivos estimulados con las diversas concentraciones de FGFb. Diversos grupos han trabajado en este respecto si

bien, con experiencias y líneas celulares diferentes. Así, Kosaka et al. estudiaron las interacciones en el ciclo celular del ATRA y FGFb mediante cultivos de células de músculo liso de vasos sanguíneos. Para ello, pre-trataron a las células durante 48 horas con ATRA (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} y $1 \mu\text{M}$) y posteriormente las estimularon con el factor FGFb (10 ngr/ml). Observaron que las células que habían sido pretratadas con ATRA mostraban una menor síntesis de ADN y que esta inhibición de la síntesis de ADN era dosis-dependiente del ATRA, siendo mayor con la concentración $1 \mu\text{M}$ (234).

En último lugar, se estudió el efecto de añadir VEGF ($7,5 \text{ ngr/ml}$) y ATRA ($5 \mu\text{M}$) a los cultivos de ACC-531. El efecto inhibitor del ATRA sobre nuestra línea celular estimulada con el factor quedó nuevamente confirmado. La acción del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular sobre los cultivos celulares así como su interacción con el ATRA ha sido estudiada también por otros grupos de investigación, confirmando su efecto antiprolifartivo. En un estudio realizado con la línea celular NB4 de leucemia promielocítica aguda, se observó que la adición al medio de cultivo de ATRA (10^{-6}M) durante tres días, originaba un drástico descenso en la producción de VEGF por parte de las células (235).

1.5. Persistencia del efecto del ATRA sobre las células CC-531

A la vista de los resultados obtenidos queda confirmada la inhibición ejercida por el ATRA sobre los cultivos celulares de ACC-531 en medios con SRN, SRH o con Factores de Crecimiento. Llegados a este punto, nos preguntamos si este efecto antiproliferativo es o no duradero ya que pueden producirse resistencias.

Es por ello por lo que se decidió pre-tratar a las células en cultivo con ATRA ($0,005 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ y $15 \mu\text{M}$) complementando el medio con SFB 10%. Tras tres días, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos con medio libre de ATRA y SFB 10%. Pasadas 24 horas, a cada grupo de células pretratadas se les cambió el medio por otro con las mismas concentraciones del fármaco pero suplementando el medio con SRN 0,5%.

A raíz de los resultados, se puede afirmar que el pre-tratamiento con ATRA (10 ó $15 \mu\text{M}$) induce un freno de 24 horas en la proliferación tras retirar el ATRA. A las 48 horas, el índice de proliferación aumenta con respecto a los no pre-tratados, mientras que a las 72 horas el índice de proliferación es igual a los no pre-tratados. Estos datos sugieren que el efecto del ATRA sobre las células ACC-531 es temporal, es decir, sólo se manifiesta mientras dura su presencia en el medio de cultivo.

Por otra parte, el tratamiento posterior de los cultivos con ATRA $0,005 \mu\text{M}$ no produjo un cambio significativo con respecto al cultivo sin ATRA. La adición a los cultivos del fármaco a las concentraciones de 10 y $15 \mu\text{M}$ produjo una disminución de la velocidad de proliferación de

las células, llegando incluso a mermar los cultivos. En las células pre-tratadas con ATRA 10 y 15 μM la caída resultó más pronunciada.

Con el objetivo de comprobar si esto era así independientemente del tiempo de exposición al fármaco (pre-tratamiento), se sometieron las células al efecto del ATRA (0,05, 10 y 15 μM) durante un período más largo de tiempo: seis días. En este caso, no se observó ese retraso en la proliferación en las células pre-tratadas con ATRA 10 μM y 15 μM que se apreció en el pre-tratamiento de 3 días de duración. Sí se observó en cambio un aumento del Índice de Proliferación a las 72 horas de las células pre-tratadas con respecto al control. Nuevamente, el cultivo con una concentración ínfima de ATRA (0,05 μM) no produjo cambios significativos con respecto a las células no tratadas. No obstante, centrándonos en el Índice Proliferativo de los cultivos a las 72 horas, se observó un mayor crecimiento de las células pre-tratadas con ATRA con respecto al control SFB 10%. Por su parte, la proliferación posterior de los cultivos en medios con ATRA 10 y 15 μM sufrió un aplanamiento con respecto al cultivo control, llegando esta última concentración a ser nociva para las células.

Varios grupos de investigación han llevado a cabo estudios tanto in vivo como in vitro del efecto de la acción continuada en el tiempo del fármaco ATRA. Esto es debido, en último lugar, al hecho desafortunado de que en la quimioterapia basada en el uso del ATRA contra diversos tipos de cánceres, se produce la aparición de resistencias a la misma (236-238; 239, 240). Según diversos estudios, aunque el ATRA es un agente muy eficaz, como lo es en el caso de la leucemia promielocítica aguda, cuando el ATRA se administra como agente mantenido de forma diaria casi siempre se desarrolla resistencia. El mecanismo exacto de la resistencia al ATRA en casos como la leucemia continúa sin determinarse, si bien se han descrito varios mecanismos posibles. Unos se basan en la necesidad de alcanzar una concentración umbral de ATRA libre en la zona de los receptores nucleares y ligandos de los receptores que se requieren para activar genes diana. De este modo, la resistencia al fármaco podría darse como un resultado de: una alteración del receptor del ácido retinoico RAR, una concentración insuficiente de ATRA o bien como alteraciones en los mecanismos intracelulares que regulan la unión del ácido retinoico y su metabolismo (240).

1.6. Efecto del 5-FU sobre los cultivos CC-531

Con el propósito de mejorar la eficacia del tratamiento lograda con el ATRA, se propuso la utilización conjunta de un quimioterápico convencional, como es el 5-Fluorouracilo (5-FU).

Del estudio de un amplio rango de concentraciones de 5-FU sobre cultivos con medios complementados con SFB al 20% (estándar) se obtuvo que el efecto antiproliferativo del quimioterápico en nuestros cultivos de ACC-531 resultaba ser dependiente de la dosis al quimioterápico así como del tiempo de exposición al mismo. Concentraciones cercanas al 0,25

$\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24 horas lograban reducir en más de un 50% el recuento celular al final de la experiencia (72 horas). No obstante, la concentración así como la duración de exposición al fármaco varía en la bibliografía según el grupo, el tipo de línea celular o el tiempo de exposición al fármaco. Según un estudio realizado con la línea celular de carcinoma de colon HT-29, se consigue una inhibición de la proliferación similar a la nuestra con concentraciones de 5-FU cercanas a 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 48 horas de exposición (241). No obstante, otro estudio llevado a cabo con la línea celular de cáncer de colon WiDR, muestra cómo concentraciones de 5-FU próximas a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24 horas de exposición al cultivo producían la misma inhibición de la proliferación (242).

En un siguiente paso, se estudió el efecto del 5-FU sobre los cultivos complementados con el suero obtenido de ratas. Se utilizaron las concentraciones de 2,5% y 0,5%, ya que fueron las dos concentraciones con las que las células mostraron mayor proliferación con SRH que con SRN.

En esta ocasión, se observó como al sustituir el SFB por SRN (2,5%) en los medios de los cultivos de ACC-531, el 5-FU mostraba una menor capacidad de inhibición de la proliferación celular, llegando a la concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a una inhibición del 33,52%. A raíz de las observaciones se deduce nuevamente como el SRN estimula en mayor medida nuestros cultivos en comparación al SFB. Reduciendo la presencia en los medios celulares del SRN a concentraciones ínfimas (0,5%), el 5-FU 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ produce una mayor inhibición celular que con el SRN 2,5%, llegando a valores del 45,96% de inhibición.

Con el fin de comprobar si el efecto inhibitorio del 5-FU (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se repetía en cultivos estimulados, los medios de cultivo se complementaron con SRH. En un primer lugar, se utilizó la concentración de suero de 2,5%, confirmándose la capacidad inhibitoria del quimioterápico así como la dosis-dependencia de la misma. Al reducir la concentración del suero al 0,5% se observó como el 5-FU producía una inhibición del 41,14%, inhibición menor que la que se produce con el SRN además de mostrar su dosis-dependencia.

En conclusión, se observó que el 5-FU producía un mayor efecto inhibidor de la proliferación en cultivos enriquecidos con SFB que con SRN y que a su vez, esta inhibición con SRN era mayor que con SRH. Por otra parte, la acción del 5-FU en cada caso era dosis-dependiente, de manera que a mayor concentración de quimioterápico mayor inhibición se daba en los cultivos. Para la línea celular en cuestión de ACC-531, concentraciones del orden de 0,4 - 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mostraban una inhibición de los cultivos cercana a la mitad del cultivo control. En lo sucesivo, con el fin de combinar en el medio celular el fármaco ATRA y el quimioterápico 5-FU, se optó por utilizar una concentración de 5-FU más baja: 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En un siguiente paso, se evaluó el efecto de la adición de 5-FU a cultivos estimulados con los Factores de Crecimiento en sus concentraciones óptimas.

Comenzando por el HGF, aquellos cultivos que además del factor llevaban en el medio el quimioterápico mostraron una clara inhibición proliferativa a partir de las primeras 24 horas desde su exposición. Queda demostrado así la capacidad antiproliferativa del 5-FU incluso en cultivos estimulados por el factor HGF. Anteriormente nuestro grupo comprobó este hecho con otra línea celular como la WiDR de cáncer de colon (242, 243).

Resultados similares se obtienen al sustituir el factor HGF por el factor EGF, el cual, en sus óptimas concentraciones (5 y 10 ngr/ml) estimula la proliferación de las células en cultivo. Sin embargo, la adición conjunta del quimioterápico al medio junto con el EGF, produce un efecto inhibitorio sobre los cultivos de ACC-531. Resultados similares han obtenido otros autores con otras líneas, corroborando lo descubierto por nuestro grupo, como es el caso de células de cáncer de colon WiDR (242) ó células endoteliales de córnea de conejo. En este último, sembrando las células en placas de 24 pocillos las expusieron al quimioterápico 5-FU (10 µgr/ml) y al factor EGF (10 ngr/ml) durante 7 días. Los cultivos con EGF libres de 5-FU estimularon la proliferación en un 70% en comparación al cultivo control, obteniéndose resultados similares al realizar recuentos por hemocitómetro o mediante Coulter Counter. La concentración de EGF 1 ngr/ml resultó ser inactiva. La adición al medio de 5-FU inhibió el efecto del EGF sin muestras de toxicidad para dichas células, la cual tenía lugar a concentraciones mayores de 100 µgr/ml (244).

El siguiente factor estudiado fue el PDGF en sus óptimas concentraciones (5, 7,5 y 10 ngr/ml). En todas ellas, la adición al medio del quimioterápico 5-FU ejerció un efecto antiproliferativo de los cultivos celulares de ACC-531, evidente a partir de las primeras 24 horas desde su exposición. Otros grupos han trabajado en su incidencia en los cultivos de diversas líneas celulares en los que añadían además inhibidores del receptor PDGFR (245) o quimiosensibilizadores de fármacos antitumorales (246) incrementando así su efecto antiproliferativo.

Por otra parte, el Factor de Crecimiento FGFb también vió inhibido su efecto estimulador de la proliferación celular al adicionar al medio el quimioterápico 5-FU. En los tres casos en los que se añadió al medio el FGFb en sus concentraciones óptimas (2,5, 5 y 10 ngr/ml) el 5-FU 0,4 µgr/ml fue capaz de inhibir notablemente el efecto del factor sobre las células a partir de las primeras 24 horas de su adición al medio de cultivo. Grupos de investigación que trabajan en líneas celulares diferentes a las nuestras corroboran este efecto antiproliferativo del 5-FU como es el caso del grupo de Im et al. En dicho trabajo, demostraron que el 5-FU (1 y 10 µM) ejercía un efecto anti-proliferativo sobre cultivos estimulados con el factor FGFb (10 ngr/ml) en cultivos celulares de la línea C2C12 de células pluripotenciales de precursores mesenquimales (247). Por otra parte, un trabajo llevado a cabo por Raymond et al.

con células endoteliales de córnea de conejo, demostró que el 5-FU 10 $\mu\text{gr/ml}$ inhibía el estímulo proliferativo producido por el FGF (25 ng/ml), el cual era capaz de estimular la proliferación celular hasta un 20% más que el control en medio libre de 5-FU (244).

Finalmente, se evaluó el efecto de la adición conjunta al medio celular sobre los cultivos de ACC-531 del 5-FU y del factor VEGF (7,5 y 10 ngr/ml). Nuevamente, al añadir al medio celular el quimioterápico se observó la inhibición de los cultivos estimulados por el factor. Tras las primeras 24 horas desde su exposición al cultivo, las células con el 5-FU en el medio ven inhibido el efecto proliferativo proporcionado por el factor. Estos datos son corroborados por los resultados a los que llegaron otros grupos de investigación en líneas celulares como la línea WiDR de cáncer de colon (242) o con la línea celular de endotelio pulmonar (248).

En conclusión, se observó que el quimioterápico 5-FU era capaz de inhibir el efecto proliferativo de cada uno de los Factores de Crecimiento empleados en el estímulo de los cultivos de manera individual.

1.7. Efecto del ATRA asociado a 5-FU

En último lugar, se diseñaron una serie de experiencias con el fin de observar el efecto combinado del ATRA y 5-FU sobre los cultivos de ACC-531.

En un principio, se estudió su efecto sobre cultivos celulares con medios complementados con SRN al 0,5% sin estimular. Se evaluó el efecto de la acción conjunta de ambos a las concentraciones de 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ de 5-FU y 5 y 10 μM de ATRA. Como era de esperar, la acción combinada del 5-FU y la menor de las concentraciones de ATRA originó una disminución de la proliferación con respecto al cultivo control del 68,5%, superior a la producida por ambos de manera individual. Por su parte, la combinación con ATRA 10 μM produjo una inhibición del 91,16%.

Atendiendo a la bibliografía, pocos son los grupos que han investigado en este ámbito. Los efectos de la adición conjunta y simultánea del fármaco y el quimioterápico en el medio celular *in vitro* ha sido escasamente estudiado. No obstante existen ciertos estudios como los llevados a cabo por dos grupos de China y Japón. En el primero, demuestran que el ATRA es capaz de aumentar la sensibilidad a los fármacos como el 5-FU ó MMC mediante cultivos de células LoVo de cancer de colon en placa (249). El segundo grupo demuestra a nivel molecular la utilidad de suministrar conjuntamente ATRA y 5-FU en la quimiorradioterapia (FAR therapy) mediante estudios *in vitro* con dos líneas celulares de carcinoma de cuello y cabeza (250).

El siguiente paso consistió en evaluar el efecto combinado de ambos en cultivos celulares con SRH. En esta ocasión, debido a que el SRH supone un estímulo proliferativo para las células ACC-531, se amplió el rango de concentraciones a utilizar de Suero, ATRA y 5-FU.

El objetivo era aproximar la combinación de concentraciones de fármacos de manera que se redujera a la mitad la proliferación del cultivo control.

Primeramente, se estudió el efecto del ATRA y 5-FU en medios enriquecidos con SRH al 2,5%. La concentración de ATRA fue de 10 μM mientras que para el 5-FU se emplearon una serie de concentraciones (0,3, 0,4 y 0,5 $\mu\text{gr/ml}$). Como cabía esperar, el medio que contiene la combinación de fármacos produce una mayor inhibición de la proliferación de las células ACC-531 que cada uno de forma individual. De este modo, queda confirmado el efecto aditivo de ambos fármacos.

A continuación, se procedió a evaluar el efecto sobre la proliferación celular del 5-FU (mismas concentraciones) y el ATRA a la concentración menor de 5 μM . La adición al medio de cultivo enriquecido con SRH al 2,5% de la combinación de estos dos fármacos se vió seguida de una disminución de la velocidad proliferativa de las células con respecto al control y a ambos por separado. Además, se observó que la disminución era proporcional a la concentración de 5-FU, siendo mayor la inhibición del crecimiento cuanto mayor era la concentración del 5-FU en combinación con ATRA.

Posteriormente, se redujo la concentración de SRH al 0,5%. Al reducir a una concentración ínfima el SRH presente en el medio celular, únicamente se estudió el efecto combinado de los dos fármacos con las concentraciones de 5 μM de ATRA y 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ de 5-FU. Nuevamente se comprobó que la adición conjunta al medio de los fármacos producía una mayor inhibición del crecimiento celular que cada uno por separado.

En resumen se observó que, la acción conjunta de ATRA y 5-FU resultaba ser un estímulo anti-proliferativo mayor que ambos por separado. Además, este efecto era directamente proporcional a la concentración del/los fármacos e inversamente proporcional a la concentración del suero en el medio.

El último grupo de series experimentales tuvo como objetivo evaluar el efecto sobre las células ACC-531 estimuladas con los Factores de Crecimiento de la adición al medio de cultivo de los fármacos ATRA y 5-FU.

Primeramente, se estudió el efecto del ATRA 5 μM y 5-FU 0,4 $\mu\text{gr/ml}$ sobre cultivos estimulados con el factor HGF 7,5 ngr/ml en medios complementados con SRN al 0,5%. Los cultivos con 5-FU y ATRA en el medio por separado o juntos produjeron un freno a la proliferación de las células estimuladas por el factor llegando a valores inferiores incluso a los del cultivo sin tratar. La mayor inhibición de la proliferación se vió en el cultivo con ambos fármacos en el medio. Reiteradamente se observó que la suma de ambos en el medio celular

producía una mayor inhibición que ambos por separado. Se obtuvieron resultados similares al aumentar la concentración del 5-FU a 0,5 µgr/ml y manteniendo el resto de concentraciones.

Posteriormente, se aumentó la concentración de ATRA a 10 µM y se evaluó su efecto en combinación con el 5-FU 0,4 µgr/ml sobre los cultivos. Sin embargo, en esta ocasión la suma de ambos fármacos resultó en una inhibición completa del cultivo.

A raíz de los resultados obtenidos, se optó por utilizar con el resto de los Factores de Crecimiento las concentraciones de ATRA 5 µM y 5-FU 0,4 µgr/ml, las cuales, sin llegar a inhibir por completo al cultivo, muestran su efecto antiproliferativo.

No se han encontrado trabajos que hagan referencia (abalen o desmientan) el hecho de que el uso combinado de los fármacos ATRA y 5-FU inhiba el crecimiento de cultivos celulares estimulados con factores de crecimiento. No obstante, los resultados obtenidos se muestran coherentes con lo desarrollado anteriormente.

El siguiente factor al que se evaluó su acción al combinarlo en el medio de cultivo con los fármacos fue el Factor de Crecimiento Epidérmico. En la concentración de 10 ngr/ml (con la que se dieron los mejores resultados), al añadir al medio ambos fármacos, éstos produjeron una inhibición del efecto estimulador del Factor a las 72 horas del 62%. Por su parte, la inhibición de ambos por separado disminuye al 45,25%.

En conclusión, la adición conjunta de ATRA y 5-FU en los medios celulares produce una disminución de la proliferación celular mayor que la que se da con cada uno de ellos por separado, si bien esta disminución no resulta sinérgica.

Al utilizar el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas se obtuvieron resultados similares. En sus tres concentraciones ensayadas (5, 7,5 y 10 ngr/ml) su efecto proliferativo sobre las células ACC-531 se vió disminuído por la adición al medio del ATRA y/o 5-FU. En todas ellas, la combinación de ATRA y 5-FU resultó más efectiva en la inhibición del estímulo del PDGF, si bien con las dos concentraciones más bajas del Factor, el ATRA por sí sólo fue capaz de inhibir de igual manera que conjuntamente con el 5-FU.

El penúltimo Factor de Crecimiento en ser utilizado en las experiencias fue el FGFb. En las dos concentraciones del factor empleadas (5 y 7,5 ngr/ml) la combinación conjunta de ambos fármacos inhibió en su totalidad el crecimiento de las células desde el inicio de su adición al medio.

En este caso, la suma de ambos fármacos en las concentraciones de ATRA 5 μ M y 5-FU 0,4 μ gr/ml resultan excesivas para los cultivos de ACC-531.

Finalmente, se observó el efecto de la adición al medio de ambos fármacos en cultivos de ACC-531 estimulados por el Factor de Crecimiento VEGF (7,5 ngr/ml). En esta ocasión, si bien la suma de ambos fármacos produce una mayor inhibición que ambos por separado, no se muestran diferencias significativas entre la inhibición por ATRA, por 5-FU o por ATRA y 5-FU. En los tres casos, las curvas se aplanan en su totalidad desde el inicio de su exposición a los fármacos de manera conjunta o separada.

A raíz de los resultados, se deduce que tanto el ATRA como el 5-FU en los cultivos de ACC-531 son capaces de inhibir parcial o totalmente el efecto estimulador de la proliferación producido por el Factor de Crecimiento en cuestión. Si bien esta inhibición resulta mayor al combinar de manera simultánea ambos fármacos en el medio celular.

Por otra parte, el efecto de los fármacos (de manera individual o conjunta) no se muestra con igual intensidad en cada uno de los Factores de Crecimiento estudiados. En el caso de los factores PDGF, FGFb y VEGF la combinación de ATRA y 5-FU en el medio suponen un freno a la proliferación celular desde el mismo momento de su adición al medio, aplanando en su totalidad las curvas proliferativas.

Por consiguiente, la eficacia en la inhibición de la proliferación de las células ACC-531 mediante el uso de estos dos fármacos dependerá así mismo del tipo y concentración de suero en el medio (SFB, SRN o SRH), de la concentración de ATRA, de la concentración de 5-FU, de la adición conjunta o separada de ambos fármacos, del tipo de Factor de Crecimiento y concentración en la que se haya en el medio, de los tiempos de exposición de los fármacos a los cultivos.

2. Estudios “in vivo”

Nuestros estudios “in vivo” se han centrado en tres aspectos. En primer lugar, constatar en el modelo experimental que las células tumorales afincadas en los lóbulos hepáticos no extirpados crecen más deprisa que en los animales no sometidos a resección hepática. En segundo lugar, hemos estudiado si el tratamiento con ATRA, que había demostrado efecto antiproliferativo en los cultivos, bloqueaba o frenaba el desarrollo de las metástasis hepáticas tras una resección parcial del órgano (similar a la que se efectúa en la clínica). Por último, estudiamos si el tratamiento con ATRA modificaba en el animal el efecto de la quimioterapia sobre la progresión de la enfermedad metastásica hepática.

2.1. Ajuste del modelo experimental

En un primer lugar, observamos como la inoculación en bazo de células de adenocarcinoma de colon (ACC-531) derivaba en metastasis hepáticas (al sacrificar los animales 30 días después de la inoculación tumoral). En conjunto, la eficacia media de la inoculación de células tumorales singénicas respecto a la formación de focos tumorales en el hígado resultó ser del 63% ($\pm 0,15$ DS). Porcentaje que varía en otros grupos de investigación según la vía y la concentración celular de la suspensión a inocular elegidas (183). Como ejemplo; un grupo de Noruega estudiando el efecto del Butirato así como la γ -Glutamyltransferasa y la Alcalina fosfatasa del suero durante la metástasis hepática, lograron en su modelo de rata WagRij que la totalidad de las ratas desarrollasen metástasis. Para ello utilizaron la misma línea celular, ACC-531. La vía de inyección fue el bazo, aunque la concentración celular a inyectar fue de 10^6 células, es decir, cuatro veces más concentrada que la utilizada por nuestro grupo (251,252). No obstante, a pesar de las limitaciones propias del modelo, nadie discute las ventajas de la utilización de este tipo de modelos para el estudio de las metástasis hepáticas.

2.2. Efecto de la resección hepática sobre el desarrollo metastásico

Una vez optimizado y estandarizado nuestro modelo animal de metastasis hepáticas, se llevaron a cabo hepatectomías del 40% (día 10 tras inoculación) con el fin de estudiar su efecto sobre la recidiva tumoral, así como para la extracción de suero de rata hepatectomizada para los estudios in vitro. Cabe señalar también la resección del 70% llevada a cabo por otros grupos con fines similares (203; 253-256), si bien en nuestro grupo no se realizaron puesto que el interés del trabajo no se enmarca en una situación extrema.

Centrándonos en aquellos animales en los que se desarrollaron focos tumorales, el número medio de focos macroscópicos detectados en el hígado fue de 2,1 ($\pm 0,99$ DS) en los controles (laparotomía), frente a 7,0 ($\pm 4,4$ DS) en los animales sometidos a hepatectomía parcial. Queda así evidenciado el hecho de que la resección hepática estimula significativamente ($p=0,0016$) el crecimiento de las células cancerígenas residuales en el hígado como ya se había demostrado anteriormente en diversos estudios como el llevado a cabo por un grupo australiano. En dicho trabajo, se examinaban los efectos de la resección hepática del 37% y 70% sobre la regeneración del hígado y el crecimiento del cáncer colorrectal, llegando a la conclusión de que la resección no sólo estimula la recidiva del cáncer sino que además, ésta dependía, entre otros factores, de la extensión de la hepatectomía realizada (257). A pesar de las variantes existentes en el desarrollo del propio modelo animal, el hecho de que la hepatectomía estimula la proliferación de las células cancerígenas remanentes en el hígado no reseca es innegable, tanto en clínica como a nivel experimental (139; 254; 258-261).

Atendiendo al tamaño de las metástasis, se observa cómo dicho aumento ocurre con independencia del tamaño de la metástasis a considerar. Al desglosar los resultados por tamaños, se comprueba que en las tres categorías (<1mm; 1-3mm; >3mm) la hepatectomía parcial del 40% se siguió de un incremento de entorno al 300% en el número de focos macroscópicos.

2.3. Efecto del ATRA sobre el desarrollo metastásico

Como se ha comentado, la adición de ATRA a medios que contienen un Factor de Crecimiento concreto en su concentración óptima o enriquecidos con SRH, inhibe la proliferación celular en dichos medios. El siguiente paso conllevaría a la comprobación de si dicho efecto tiene lugar también en un modelo animal. Otros grupos de investigación han demostrado con anterioridad este efecto antitumoral del ácido retinoico en modelos animales con otros tipos de líneas cancerígenas como glioblastomas (262), o leucemia promielocítica aguda (263).

Nuestro grupo ya demostró previamente la efectividad del ATRA en un modelo de metástasis hepáticas por rhabdomyosarcoma, produciendo el tratamiento una reducción de la tasa de recidiva local del 70% al 33% ($p < 0,05$), aunque no afectó a su tamaño (177).

En cuanto al efecto que el ácido retinoico tiene sobre las metástasis producidas por la línea de Adenocarcinoma de Colon ACC-531, observamos que no hay una diferencia significativa en el número de metástasis en el hígado. Sin embargo, analizando los diferentes tamaños de metástasis por separado, comprobamos que el ácido retinoico retarda el crecimiento de las metástasis en el hígado, ya que se reduce significativamente el número de metástasis mayores de 3 mm.

Por otra parte, al valorar el efecto de este fármaco sobre la supervivencia, comprobamos que el ATRA es capaz de retardar las primeras muertes, pero que no modifica significativamente el conjunto de la curva de supervivencia.

Estos resultados son lógicos si consideramos nuestros resultados acerca de la persistencia del efecto antiproliferativo en las células en cultivo, así como la experiencia clínica en el tratamiento quimioterápico de las metástasis hepáticas: se consiguen aumentos en la sobrevida, pero no se modifica la tasa de curaciones (264).

2.4. Efecto del ATRA sobre el tratamiento con 5-FU

Las experiencias realizadas para estudiar “in vivo” las repercusiones que la administración peroperatoria de ATRA pudiera tener sobre el tratamiento quimioterápico con 5-FU no han aportado resultados concluyentes.

El tratamiento de nuestros animales con 5-FU tuvo un efecto espectacular sobre el desarrollo de las metástasis hepáticas, retrasando su aparición (macroscópica) en más de dos semanas respecto a los animales no tratados. Sin embargo, desde el punto de vista de la supervivencia de los animales, nuestro tratamiento no supuso ventaja alguna. Cabría discutir lo adecuado de la dosis de 5-FU utilizada. Nuestra revisión de la literatura aportó diversas pautas de tratamiento para modelos de oncología en ratas, aunque pueden resumirse fundamentalmente en dos tipos: aquellas que propugnan una administración continuada del fármaco a dosis muy bajas, y las que se basan en administración de varios bolus distanciados por un periodo de tiempo más o menos amplio. El modelo escogido ha sido ampliamente utilizado, si bien es cierto que unos grupos utilizan dosis de 100 mg/kg mientras que otros utilizan dosis menores de 50 mg/kg. Nuestra experiencia con la dosis alta resultó letal para los animales, por lo que nos decantamos por la dosis de 50 mg/kg; como se detalla en el apartado de resultados, aún esta dosis más baja produjo una fuerte toxicidad en los animales (si bien, se recuperaron satisfactoriamente). El hecho de que el desarrollo inicial de las metástasis quede notoriamente frenado por el 5-FU en nuestro modelo, sin que se afecte la supervivencia puede deberse a que el tratamiento quimioterápico no se repitió suficiente número de veces.

Por último, la asociación de ATRA y 5-FU “in vivo” no aportó resultados significativos. Sin embargo, en nuestra opinión no puede concluirse una total ausencia de efectos, ya que el modelo utilizado probablemente no resulte adecuado. Dados los buenos resultados obtenidos con cada fármaco por separado, sería aconsejable realizar nuevos estudios en un modelo tumoral más agresivo, que deje así más margen para mostrar un posible beneficio de la asociación de los dos tratamientos.

En todo caso, no conviene perder de vista, que la razón de ser del estudio no era tanto buscar una potenciación del efecto antiproliferativo del 5-FU mediante la adición de ATRA, sino comprobar que el tratamiento peroperatorio con ATRA no supondría una interferencia negativa con el tratamiento quimioterápico convencional.

CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral pueden establecerse las siguientes conclusiones:

1. Los Factores de Crecimiento ensayados estimulan la proliferación de las células CC-531 en cultivo. Paralelamente, la resección de un lóbulo hepático se sigue de un incremento del desarrollo de metástasis hepáticas de estas células en la rata.
2. Estos Factores de Crecimiento disminuyen el efecto antiproliferativo del 5-FU sobre los cultivos de CC-531.
3. El ATRA frena la proliferación de las células CC-531 en cultivo; lo que se traduce en un retraso en el desarrollo de metástasis hepáticas en rata (tras inoculación esplécnica), que, sin embargo, no comporta un incremento del periodo de supervivencia..
4. El ATRA revierte el efecto estimulador que los referidos Factores de Crecimiento ejercen sobre los cultivos de células CC-531, así como el estímulo que la hepatectomía parcial ejerce sobre el desarrollo de metástasis hepática de CC-531 en la rata.
5. El ATRA refuerza el efecto antiproliferativo del 5-FU sobre los cultivos de CC-531, sin que dicho efecto haya sido posible demostrarlo en las experiencias in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Gastroenterology Organisation. En: www.worldgastroenterology.org/
2. International Agency for Research on Cancer. En: www.iarc.fr/
3. National Cancer Institute. En: www.cancer.gov/
4. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589-600.
5. Adolph VR, Bernabe K. Polyps in Children. *Clin Colon Rectal Surg* 2008;21:280-5.
6. Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome: Diagnostic and therapeutic approach. *World J Gastroenterol* 2009;15: 5397-408.
7. Gammon A, Jaspersen K, Kohlmann W, Burt RW. Hamartomatous polyposis syndromes. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 219-31.
8. Akagi K, Uchibori R, Yamaguchi K, Kurosawa K, Tanaka Y, Kozu T. Characterization of a novel oncogenic K-ras mutation in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 728-32.
9. Külling D, Christ AD, Karaaslan N, Fried M, Bauerfeind P. The presence of more than two index adenomas is the strongest predictor of metachronous colon adenomas. *Swiss Med Wkly.* 2002; 132: 139-42.
10. Paschos K, Bird N. Current diagnostic and therapeutic approaches for colorectal cancer liver metastasis. *Hippokratia* 2008; 12: 132-8.
11. Ahmadi A, Polyak S, Draganov PV. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: The search continues. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 61-6.
12. Fornaro R, Frascio M, Denegri A, Stabilini C, Impenatore M, Mandolino F, Lazzara F, Gianetta E. Chron's disease and cáncer. *Ann Ital Chir* 2009; 80: 119-25.
13. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann Intern Med* 1995; 122: 327-34.
14. Lieberman DA, Prindiville S, Weiss DG, Willett W, et al. Risk factors for advanced colonic neoplasia and hyperplastic polyps in asymptomatic individuals. *JAMA* 2003; 290: 2959-67.
15. Navarro A, Muñoz SE, Lantieri MJ, del Pilar Diaz M, Cristaldo PE, de Fabro SP, Eynard AR. Meat cooking habits and risk of colorectal cancer in cordoba, Argentina. *Nutrition* 2004; 20: 873-7.
16. Sinha R, Peters U, Cross AJ, Kulldorff M, Weissfeld JL, Pinsky PF, Rothman N, Hayes RB. Meat, meat mooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. *Cancer Res* 2005;65:8034-41.
17. Ferguson LR. Meat and cancer. *Meat Sci* 2010; 84: 308-13.
18. Béjar Prado LM, Gili M, Ramírez G, López J, Cabanillas JL. Dietary changes and colorectal cancer trends in Spain during 1951-2007. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102:159-68.
19. Enger SM, Longnecker MP, Chen MJ, Harper JM, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. Dietary intake of specific carotenoids and vitamins A, C, and E, and prevalence of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 147-53.
20. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Pietinen P, Potter JD, Rohan TE, Terry P, Toniolo P, Virtanen MJ, Willett WC, Wolk A, Wu K, Yaun SS, Zeleniuch-Jacquotte A, Hunter DJ. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1015-22.
21. Hartman TJ, Albert PS, Snyder K, Slattery ML, Caan B, Paskett E, Iber F, Kikendall JW, Marshall J, Shike M, Weissfeld J, Brewer B, Schatzkin A, Lanza E; Polyp Prevention Study Group. The association of calcium and vitamin D with risk of colorectal adenomas. *J Nutr* 2005; 135: 252-9.
22. Platz EA, Giovannucci E, Rimm EB, Rockett HR, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Dietary fiber and distal colorectal adenoma in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:661-70.
23. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Willett WC. Dietary fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999; 340:169-76.
24. Asano T, McLeod RS. Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; (2):CD003430.

25. Lanza E, Yu B, Murphy G, Albert PS, Caan B, Marshall JR, Lance P, Paskett ED, Weissfeld J, Slattery M, Burt R, Iber F, Shike M, Kikendall JW, Brewer BK, Schatzkin A, et al. The polyp prevention trial continued follow-up study: no effect of a low-fat, high-fiber, high-fruit, and -vegetable diet on adenoma recurrence eight years after randomization. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1745-52.
26. Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 265-73.
27. Sarebø M, Skjelbred CF, Breistein R, Lothe IM, Hagen PC, Bock G, Hansteen IL, Kure EH. Association between cigarette smoking, APC mutations and the risk of developing sporadic colorectal adenomas and carcinomas. *BMC Cancer* 2006 17; 6: 71.
28. Surveillance Epidemiology and End Results. En: www.seer.cancer.gov/
29. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2006; 117: 12S-34S.
30. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219-29.
31. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *An Bras Dermatol* 2009; 84: 257-62.
32. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 2005; 304: 274-86.
33. Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Cienc* 2009; 81: 623-9.
34. Gillitzer R, Goebeler M. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 513-21.
35. Swift ME, Kleinman HK, DiPietro LA. Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab Invest* 1999; 79: 1479-87.
36. Wilgus TA, Ferreira AM, Oberyzyzn TM, Bergdall VK, DiPietro LA. Regulation of scar formation by vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 2008; 88: 579-90.
37. Pool JG. Normal hemostatic mechanisms: a review. *Am J Med Technol* 1977; 43: 776-80.
38. Hart J. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care* 2002; 11: 205-9.
39. Servold SA. Growth factor impact on wound healing. *Clin Podiatr Med Surg* 1991; 8: 937-53.
40. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* 2004; 9: 283-9.
41. Li S, Huang NF, Hsu S. Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem* 2005; 96: 1110-26.
42. Clark RA. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. *Am J Med Sci* 1993; 306: 42-8.
43. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacol Ther* 1991; 52: 407-22.
44. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 2009; 37: 1528-42.
45. Shaw TJ, Martin P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Sep 15; 122(Pt 18): 3209-13.
46. Raud J. Vasodilatation and inhibition of mediator release represent two distinct mechanisms for prostaglandin modulation of acute mast cell-dependent inflammation. *Br J Pharmacol.* 1990 Mar; 99(3): 449-54.
47. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol.* 2008 Sep; 103(5): 398-406. Epub 2008 Jul 3.
48. Bucher NRL. Regeneration of liver and kidney. Boston: Little, Brown and Company, 1971.
49. Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial sur-gical removal. *Arch Path* 1931; 12:1 86-202.
50. Tesis V.P.P.
51. Tratado de histología, 11ª edición. Bloom-Fawcett.1987.
52. Weinbren K. Regeneration of the liver. *Gastroenterology.* 1959; 37: 657-668.
53. Friedman JM, Chung EY, Darnell JE Jr, Gene expression during liver regeneration. *J Mol Biol* 1984; 179(1): 37-53.

54. Francavilla A, Porter KA, Benichou J, Jones AF, Starzl TE. Liver regeneration in dogs: morphologic and chemical changes. *J Surg Res* 1978; 25(5): 409-419.
55. Kahn D, Hickman R, Terblanche J, Von Sommoggy ST, Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs-The response to different resection sizes. *J Surg Res* 1988; 45: 176-180.
56. Francavilla A, Panella C, Polimeno L, Giangaspero A, Mazzaferro V, Pan Ch-E et al. Hormonal and enzymatic parameters of hepatic regeneration in patients undergoing major liver resections. *Hepatology* 1990; 12(5): 1134-1138.
57. Leffert L, Koch KS, Lad PJ, Skelly H, Hemptine B. Hepatocyte growth factors. En: Zakim D & Boyer TD (Ed), *Hepatology: a text book of liver disease* 1982; 64-75.
58. Koch KS, Leffert HL. Growth regulation of adult rat hepatocytes in primary culture. *Ann NY Acad Sci* 1980; 349: 111-127.
59. Bucher NLR, Swaffield MN. The rate of incorporation of labeled thymidine into deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res* 1964; 24: 1611-1625.
60. Fabricant JI. The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. *J Cell Biol* 1968; 36: 551-565.
61. Rabes HM. Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. En: *Hepatotropic Factors Ciba Found Symp.* 1978; 31-53.
62. James J, Frederiks WM, Noorden CJF, Tas J. Detection of metabolic changes in hepatocytes by quantitative cytochemistry. *Histochemistry* 1986; 84: 308-316.
63. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; Autoradiography with thymidine-H3*. *Cancer Res* 1962; 22: 842-849.
64. Leffert HL, Koch KS, Lad PJ, Hemptine B. Glucagon and liver regeneration. En: *Handbook of experimental pharmacology.* Lefebvre P (ed) Springer-Verlag 1983; 453-484.
65. Weber C. Hormonal control of metabolism in normal and cancer cells. En: *Exploitable molecular Mechanisms and neoplasia.* Willians and Wilkins, 1969: 521-560.
66. Knox WE. *Enzyme patterns in fetal, adult and neoplastic rat tissue.* New York: Karger, 1976.
67. Pitot H. *Fundamentals of Oncology.* Nueva York: Marcel Dekker, 1978.
68. Furuchi K, Usami M, Ohyanagi H, Saitoh Y. Inhibitory effect of portal pooling, bacterial translocation, and Kupffer cell activation on hepatic regeneration after partial hepatectomy by repeated portal triad cross clamping in rats [resumen; en japonés en el original]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi.* 1993; 90(12): 3.006-3.017.
69. Selzner M, Camargo CA, Clavien P-A. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: Protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999; 30(2): 469-475.
70. Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. Effects of ischemia and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg* 1993; 159(8): 393-398.
71. Portugal V, García-Alonso I, Barceló P, Méndez J. Effect of allopurinol, folic acid, SOD and cyclosporine A on ischemic liver regeneration. *Eur Surg Res* 1995; 27(2): 69-76.
72. Bucher NRL, Swaffield MN, DiTroia JF. Influence of age upon incorporation of thymidine-2-C14 into DNA of regeneration rat liver. *Cancer Res* 1964; 24: 509-512.
73. Bucher NRL. Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 1963; 15: 245-300.
74. Rixon RH, Whitfield JF. The control of liver regeneration by parathyroid hormone and calcium. *J Cell Physiol* 1975; 87(2): 147-155.
75. Kaufmann WK, Kaufman DG, Rice JM, Wenk ML. Reversible inhibition of rat hepatocyte proliferation by hydrocortisone and its effect on cell cycle-dependent hepatocarcinogenesis by N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res* 1981; 41(11 pt 1): 4.653-4.660.
76. Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M et al. Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc* 1988; 20(1) Supl 1: 494-497.
77. Moolten FL, Oakman NJ, Bucher NL. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res* 1970; 30(9): 2.353-2.357.
78. Simek J, Erbenova Z, Deml F, Dvorackova I. Liver regeneration after partial hepatectomy in rats exposed before operation to stress stimulus. *Experientia* 1968; 24: 1166-1167.

79. Ehret CF, Meinert JC, Groh KR, Dobra KW, Antipa GA. Circadian Regulation: Growth Kinetics of the Infradian Cell. En: Drewinko B, Humprey RM, eds. Growth Kinetics and Biochemical Regulation of Normal and Malignant Cells. Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1977; 49-76.
80. Caruana JA, Gage AA. Increased uptake of insulin and glucagon by the liver as a signal for regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 1980; 150: 390-394.
81. Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH et al. The origin, hormonal nature and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 137(2): 179-199.
82. Fisher B, Szuch P, Levine M, Saffer E, Fisher ER. The intestine as a source of a portal blood factor responsible for liver regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 137(2): 210-214.
83. Lee S, Skivlocki WP, Fernandez-Cruz L, Hazel J, Sayers HJ, Orloff MJ. Influence of portal vein arterialization on liver regeneration in a double liver rat bioassay model. *Eur Surg Res* 1981; 13: 17-18.
84. Baldia LB, Brightman SA, Dunn MR, Price RIM. The effect of blood flow reversal on the site of liver cell formation. *Gastroenterology* 1967; 52(6): 1.142.
85. Bucher NLR, Swaffield MN. Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(3): 1.157-1.160.
86. Caruana JA, Gage AA. Increased uptake of insulin and glucagon by the liver as a signal for regeneration. *Surg Gynecol Obstet* 1980; 150(3): 390-394.
87. Fernández-Cruz L, Skivlocki WP, Lee S, Sayers HJ, Orloff MJ. Influencia de la perfusión de dosis fisiológicas de insulina y glucagon en la regeneración hepática. *Gastroenterol Hepatol* 1982; 5(10): 533-537.
88. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem* 1979; 48: 193-216.
89. Andreis PG, Armato U. Effects of epidermal growth factor/urogastrone and associated pancreatic hormones on mitotic cycle phases and proliferation kinetics of neonatal rat hepatocytes in primary culture. *Endocrinology* 1981; 10 (5): 1.954-1.964.
90. Zapf J, Rinderknecht E, Humbel RE, Froesch ER. Nonsuppressible insulin-like activity (NSILA) from human serum: recent accomplishments and their physiologic implications. *Metabolism* 1978; 27(12): 1.803-1.828.
91. Blundell TL, Bedarkar S, Rinderknecht E, Humbel RE. Insulin-like growth factor: A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75(1): 180-184.
92. Moses AC, Pilistine SJ [Boynton AL, Leffert HL, eds]. Control of animal cell proliferation, vol 1. Londres: Academic Press, 1978; 91-120.
93. Sudo T, Shobu R, Kuyama T, Suzuki T. Immunohistochemical changes of the islet cells of Langerhans after partial hepatectomy in dogs. *Am J Gastroenterol* 1986; 81(4): 266-271.
94. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:8681-5.
95. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver Regeneration. *Science* 1997; 276:60-6.
96. Rabes HM. Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver. *Ciba Found Symp*. 1977; (55): 31-53.
97. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962; 22: 842-9.
98. Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 101-34.
99. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007; 213: 286-300.
100. Michalopoulos GK. Liver regeneration: Alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2009.
101. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 2010; 176: 2-13.
102. Eucher P, Devaux P, Corbisier F, Remy P, Alvarez Lopez A, Hemptinne B. Effect of prostaglandins on hepatocellular proliferation. *Dig Dis Sci* 1986; 18: 106-107.
103. Rasmussen TN, Jorgensen PE, Almdal T, Poulsen SS, Olsen PS. Effect of gastrin on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Gut* 1990; 31: 92-95.
104. Kanashima R, Kobayashi M. Famotidine does not inhibit liver regeneration. *Dig Dis Sci* 1989; 21: 190-195.

105. Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger RR, Kuhn C, Michalopoulos G. Alpha1-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 1987; 7(6): 1189-1194.
106. Kino S, Kusano M, Mito M. Role of parasympathetic innervation of the liver upon hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 1988; 20(S1): 166.
107. Schirmacher P, Geerts A, Jung W, Pietrangelo A, Rogler CE, Dienes HP. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS* 1993; 65: 285-99.
108. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003; 299: 890-3.
109. Tomiya T, Ogata I, Yamaoka M, Yanase M, Inoue Y, Fujiwara K. The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor-alpha. *Am J Pathol* 2000; 157: 1693-701.
110. Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001; 47: 661-73.
111. Matsumoto K, Fujii H, Michalopoulos G, Fung JJ, Demetris AJ. Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors in vitro: interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor promote DNA synthesis in vitro. *Hepatology* 1994; 20: 376-82.
112. Michalopoulos GK, Bowen WC, Mulè K, Stolz DB. Histological organization in hepatocyte organoid cultures. *Am J Pathol* 2001; 159: 1877-87.
113. Michalopoulos GK, Bowen WC, Mulè K, Luo J. HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr* 2003; 11: 55-75.
114. Babaeva AG, Nesterenko VG, Iudina NV. Intensified capacity of the lymphocytes of mice with repeated liver resection to transfer "regenerative information" [resumen; en ruso en el original]. *Biull Eksp Biol Med* 1982; 93(6): 98-99.
115. Yokomuro K, Miyahara S, Takahashi H, Kimura Y. Regeneration and the immune system. II. Suppressor activities of lymphocytes activated in vivo by liver regeneration and their genetic control. *Eur J Immunol.* 1983; 13(11): 883-889.
116. Miyahara S, Yokomuro K, Takahashi H, Kimura Y. Regeneration and the immune system. I. In vitro and in vivo activation of lymphocytes by liver regeneration and the role of Kupffer cells in stimulation. *Eur J Immunol.* 1983; 13(11): 878-883.
117. Lie TS, Preiainger HK, Yoshimura S, Hong GS. Suppressor cell activity in hepatic regeneration. *Eur Sur Res* 1988; 20 Supl 1: 167-168.
118. Desser-Wiest L, Desser H. The proliferation activity of the rat thymocytes after partial hepatectomy. *Exp Pathol* 1980; 18(3): 167-169.
119. Noda H. Liver regeneration and the immune system. II. Suppressor activity of splenic adherent cells activated in vivo liver regeneration [resumen; en japonés en el original]. *Nippon Gekka Gakkai Zasshi* 1986; 87(6): 636-641.
120. Rakhmievich AL, Sidorenko ON. Stimulation and suppression of cellular immunity in mice during liver regeneration [resumen; en ruso en el original]. *Biull Eksp Biol Med* 1986; 101(5): 591-594.
121. Kolpashchikova IF. Effect of transplantation of thymus, bone marrow, and spleen cells on the regenerative processes in pathologically changed liver [resumen; en ruso en el original]. *Biull Eksp Biol Med* 1979; 88(10): 477-480.
122. Schaff Z, Lapis K, Szendroi M. D-galactosamine-induced liver injury in immunosuppressed mice. *Acta Morphol Hung* 1984; 32(1): 67-72.
123. Ruhlenstroth-Bauer G, Goldberg M, Vogl S. Regulation of hepatocyte proliferation. The feed-back system of hepatopoietin. *Naturwissenschaften* 1984; 71(8): 404-407.
124. Ichihara A, Growth and differentiation of neonatal rat hepatocytes in primary culture. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1989; 41(8): 1021-1026.
125. García-Alonso I, Méndez J, Barberá E. Cyclosporin modifies liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Res Comm* 1989; 6: 43-49.
126. García-Alonso I, Méndez J, Barberá-Guillem E. Changes in succinate dehydrogenase zonation following cyclosporin-treatment in normal and regenerating rat liver. *Cell Mol Biol* 1988; 34(6): 605-614.

127. Kim YI, Salvini P, Auxilia F, Calne RY. Effect of cyclosporin A on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: Comparison with standar immunosuppressive agents. *Am J Surg* 1988; 155(2): 245-249.
128. Kahn D, Lai HS, Romovacek H, Makowka L, Van Thiel D, Starzl TE. Cyclosporine A augments the regenerative response after partial hepatectomy in the rat. *Transplant Proc* 1988; 20(3) Supl 3: 850-852.
129. Grant D, Black R, Zhong R, Wall W, Stiller C, Duff J. The effect of cyclosporine on liver regeneration. *Transplant Proc* 1988; 20(3) Supl 3: 877-879.
130. V. Portugal, I. García-Alonso, P. Barceló, J. Méndez. Effect of allopurinol, folinic acid, SOD and cyclosporine A on ischemic liver regeneration. *Eur Sur Res.* 27: 69-76, 1.995.
131. sistema inmunit y reg hep
132. Fausto N. Growth factors in liver development, regeneration and carcinogenesis. *Prog Growth Factor Res* 1991; 3: 219-34.
133. Francavilla A, Polimeno L, Barone M, Azzarone A, Starzl TE. Hepatic regeneration and growth factors. *J Surg Oncol Suppl* 1993; 3: 1-7.
134. de Jong KP, Slooff MJ, de Vries EG, Brouwers MA, Terpstra OT. Effect of partial liver resection on tumour growth. *J Hepatol* 1996; 25: 109-21.
135. Picardo A, Karpoff HM, Ng B, Lee J, Brennan MF, Fong Y. Partial hepatectomy accelerates local tumor growth: potential roles of local cytokine activation. *Surgery* 1998; 124: 57-64.
136. Meredith K, Haemmerich D, Qi C, Mahvi D. Hepatic resection but not radiofrequency ablation results in tumor growth and increased growth factor expression. *Ann Surg* 2007; 245: 771-6.
137. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31.
138. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-53.
139. Schindel DT, Grosfeld JL. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 995-7.
140. Nicolson GL. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumour metastases to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastases. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 325-43.
141. Menter DG, Herrmann JL, Nicolson GL. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastases. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13: 67-88.
142. Radinsky R. Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organspecific metastases. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 345-61.
143. Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, Benoy I, Martin M, De Pooter C, Van Oosterom AT. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 843-8.
144. Dirix LY, Vermeulen PB, Pawinski A, Prové A, Benoy I, De Pooter C, Martin M, Van Oosterom AT. Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br J Cancer* 1997; 76: 238-43.
145. Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006; 51: 143-58.
146. Okamoto H, Ohigashi H, Nakamori S, Ishikawa O, Imaoka S, Mukai M, Kusama T, Fujii H, Matsumoto Y, Akedo H. Reciprocal functions of liver tumor cells and endothelial cells. Involvement of endothelial cell migration and tumor cell proliferation at a primary site in distant metastasis. *Eur Surg Res* 2000; 32: 374-9.
147. Wang HH, Qiu H, Qi K, Orr FW. Current views concerning the influences of murine hepatic endothelial adhesive and cytotoxic properties on interactions between metastatic tumor cells and the liver. *Comp Hepatol* 2005 9;4:8.
148. Vidal-Vanaclocha F. The prometastatic microenvironment of the liver. *Cancer Microenviron* 2008; 1: 113-29.
149. von Schweinitz D, Faundez A, Teichmann B, Birnbaum T, Koch A, Hecker H, Glüer S, Fuchs J, Pietsch T. Hepatocyte growth-factor-scatter factor can stimulate post-operative tumor-cell proliferation in childhood hepatoblastoma. *Int J Cancer* 2000; 85: 151-9.
150. Jiang WG, Hallett MB, Puntis MC. Hepatocyte growth factor/scatter factor, liver regeneration and cancer metastases. *Br J Surg* 1993; 80: 1368-73.

151. Shimizu H, Miyazaki M, Wakabayashi Y, Mitsuhashi N, Kato A, Ito H, Nakagawa K, Yoshidome H, Kataoka M, Nakajima N. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 2001; 34: 683-9.
152. Wu F, Wu L, Zheng S, Ding W, Teng L, Wang Z, Ma Z, Zhao W. The clinical value of hepatocyte growth factor and its receptor—c-met for liver cancer patients with hepatectomy. *Dig Liver Dis* 2006; 38: 490-7.
153. Sasaki T, Nakamura T, Rebhun RB, Cheng H, Hale KS, Tsan RZ, Fidler IJ, Langley RR. Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growth factor alpha-epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model. *Am J Pathol* 2008; 173: 205-16.
154. García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Portugal V, Castro B, Caramés J, Méndez J. Effect of hepatic resection on development of liver metastasis. *Rev Esp Enferm Dig* 2003; 95: 771-6.
155. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM, Ellis V, Pollock R, Broglio KR, Hess K, Curley SA. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239: 818-25.
156. Rougier P, Milan C, Lazorthes F, Fournatier G, Partensky C, Baumel H, Faivre J. Prospective study of prognostic factors in patients with unresected metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 1995; 82: 1397-400.
157. Shimada H, Tanaka K, Endou I, Ichikawa Y. Treatment for colorectal liver metastases: a review. *Langenbecks Arch Surg* 2009; 394: 973-83.
158. de Gramont A, Flger A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Lovet C, Hendler D, de Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-47.
159. Alberts SR, Horvath WL, Sternfeld WC, Goldberg RM, Mahorey MR, Dakhil SR, Rowland K, Nair S, Sargent DJ, Donohue JH. Oxaliplatin, fluorouracil and leucovorin for patients with unresectable liver only metastases from colorectal cancer: a North Central Cancer Treatment Group Phase II Study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 9243-9.
160. Benoist S, Pautrat K, Mitry E, Rougier R, Penna C, Nordinger B. Treatment strategy for patients with colorectal cancer and synchronous irresectable liver metastases. *Br J Surg* 2005; 92: 1155-60.
161. Poston GJ, Adam R, Alberts S, Curley S, Figueras J, Haller D, Kunstlinger F, Mentha G, Nordlinger B, Patt Y, Primrose J, Roh M, Rougier P, Ruers T, Schmoll HJ, Valls C, Vauthey NJ, Cornelis M, Kahan JP. OncoSurge: a strategy for improving resectability with curative intent in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 7125-34.
162. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 22; 351: 337-45.
163. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Norotomiy W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 715-7.
164. Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Smith JM. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed Proc* 1976; 35: 1332-8.
165. Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. *The retinoids* 1994: 443-520.
166. Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e002.
167. Travis GH, Golczak M, Moise AR, Palczewski K. Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 469-512.
168. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest* 2010; 120: 956-62.
169. Kennedy KA, Porter T, Mehta V, Ryan SD, Price F, Peshdary V, Karamboulas C, Savage J, Drysdale TA, Li SC, Bennett SA, Skerjanc IS. Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative β -catenin. *BMC Biol* 2009; 7: 67.
170. Collins SJ. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 346: 51.

171. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 2008; 134: 921-31.
172. Lotan R. Retinoids and apoptosis: implications for cancer chemoprevention and therapy. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1655-7.
173. Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ, De Luca LM. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1271-9.
174. Lotan R. Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J* 1996; 10: 1031-9.
175. Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7305-15.
176. Hellemans K, Verbuyst P, Quartier E, Schuit F, Rombouts K, Chandraratna RA, Schuppan D, Geerts A. Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids. *Hepatology* 2004; 39: 97-108.
177. García-Alonso I, Palomares T, Alonso-Varona A, Castro B, Del Olmo M, Portugal V, Méndez J. Effects of all-trans retinoic acid on tumor recurrence and metastasis. *Rev Esp Enferm Dig* 2005; 97: 240-8.
178. Ocker M, Herold C, Ganslmayer M, Hahn EG, Schuppan D. The synthetic retinoid adapalene inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells in vitro. *Int J Cancer* 2003; 107: 453-9.
179. Experimental and surgical technique in the rat. 2ª edición. 1992. H.B. Waynfoth, P.A. Flecknell.
180. Hepatology a textbook of liver disease. Zakim & Boyer. 1990. 2ª Edición. Vol. 1.
181. Shackelford Cirugía del aparato digestivo Tomo III, 3ª edición George D. Zuidema. 1991.
182. Bockus. Gastroenterología. 4ª edición. Tomo IV Hígado. 1987. J. Edward Berk y cols.
183. de Jong GM, Aarts F, Hendriks T, Boerman OC, Bleichrodt RP. Animal models for liver metastases of colorectal cancer: research review of preclinical studies in rodents. *J Surg Res* 2009; 154: 167-76.
184. Leduc EH. Metastasis of transplantable hepatomas from the spleen to the liver in mice. *Cancer Res* 1959; 19: 1091-5.
185. Hedrich HJ. History, strains and models. *The laboratory rat* 2000: 3-8.
186. Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C, Hoitinga MR. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models. Comparative aspects with those in humans. *Comp Med* 2000; 50: 16-26.
187. Calman KC. Tumour immunology and the gut. *Gut* 1975; 16: 490-9.
188. Alonso Varona A, García-Alonso I, Portugal V, San Emeterio E, Méndez J, López de Tejada I. Development of an experimental model for the study of hepatic metastasis. *Rev Esp Enferm Dig* 1994; 86: 521-5.
189. García-Olmo DC, García-Rivas M, García-Olmo D, Ontañón J. The site of injection of tumor cells in rats does not influence the subsequent distribution of metastases. *Oncol Rep* 2003; 10: 903-7.
190. Inoue Y, Kashima Y, Aizawa K, Hatakeyama K. A new rat colon cancer cell line metastasizes spontaneously: biologic characteristics and chemotherapeutic response. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 90-7.
191. García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Echenique-Elizondo M, Caramés J, Castro B, Méndez J. Effect of liver resection on the progression and growth of rhabdomyosarcoma metastases in a rat model. *J Surg Res* 2008; 148: 185-90.
192. Echevarria Uruga JJ, García-Alonso Montoya I, Díaz Sanz I, Herrero de la Parte B, Miguélez Vidales JL, Zabalza Estévez I, Fernández-Ruanova B. Ultrasonographic characterization of an experimental model of liver metastases from colon carcinoma in rats. *Radiologia* 2010; 52: 37-44.
193. Nano R, Barni S, Chiari P, Pinelli T, Fossati F, Altieri S, Zonta C, Prati U, Roveda L, Zonta A. Efficacy of boron neutron capture therapy on liver metastases of colon adenocarcinoma: optical and ultrastructural study in the rat. *Oncol Rep* 2004; 11: 149-53.
194. Naomoto Y, Kondo H, Tanaka N, Orita K. Novel experimental models of human cancer metastasis in nude mice: lung metastasis, intraabdominal carcinomatosis with ascites, and liver metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987; 113: 544-9.
195. Gambarota G, Veltien A, van Laarhoven H, Philippens M, Jonker A, Mook OR, Frederiks WM, Heerschap A. Measurements of T1 and T2 relaxation times of colon cancer metastases in rat liver at 7 T. *MAGMA* 2004; 17: 281-7.

196. Topal B, Roskams T, Fevery J, Penninckx F. Aggregated colon cancer cells have a higher metastatic efficiency in the liver compared with nonaggregated cells: an experimental study. *J Surg Res* 2003; 112: 31-7.
197. van Duijnhoven FH, Tollenaar RA, Terpstra OT, Kuppen PJ. Locoregional therapies of liver metastases in a rat CC531 coloncarcinoma model results in increased resistance to tumour rechallenge. *Clin Exp Metastasis* 2005; 22: 247-53.
198. Rothbarth J, Woutersen RA, Sparidans RW, van de Velde CJ, Mulder GJ. Melphalan antitumor efficacy and hepatotoxicity: the effect of variable infusion duration in the hepatic artery. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 1098-103.
199. Ivarsson K, Stuessen C, Stenram U, Tranberg KG. Linomide improves the effect of interstitial laser thermotherapy in a rat liver tumour model. *Anticancer Res* 2003; 23: 1257-63.
200. Boni L, Benevento A, Dionigi G, Rovera F, Diurni M, Dionigi R. Injection of colorectal cancer cells in mesenteric and antimesenteric sides of the colon results in different patterns of metastatic diffusion: an experimental study in rats. *World J Surg Oncol* 2005; 3: 69.
201. Kashtan H, Rabau M, Mullen JB, Wong AH, Roder JC, Shpitz B, Stern HS, Gallinger S. Intra-rectal injection of tumour cells: a novel animal model of rectal cancer. *Surg Oncol* 1992; 1: 251-6.
202. Cell Lines Service. www.cell-lines-service.de. 2004.
203. Aalbers AG, ten Kate M, van Grevenstein WM, Hofland LJ, Wiemer EA, Jeekel J, van Eijck CH. A small mammal model of tumour implantation, dissemination and growth factor expression after partial hepatectomy. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 469-75.
204. Durowicz S, Olszewski WL, Gewartowska M, Stańczyk M, Stanisławska J, Wluka A. Spleen migrating dendritic cells primed with CC531 colon cancer antigen and LPS - is it a method to compromise liver metastases?. *Surg Oncol* 2009. Aug 6.
205. Little P, Skouteris GG, Ord MG, Stocken LA. Serum from partially hepatectomized rats induces primary hepatocytes to enter S phase: a role for prostaglandins? *J Cell Sci* 1988; 91: 549-53.
206. Paul D, Leffert H, Sato G, Holley RW. Stimulation of DNA and protein synthesis in fetal-rat liver cells by serum from partially hepatectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972; 69: 374-7.
207. Jeffers M, Rao MS, Rulong S, Reddy JK, Subbarao V, Hudson E, Vande Woude GF, Resau JH. Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling induces proliferation, migration, and morphogenesis of pancreatic oval cells. *Cell Growth Differ* 1996; 7: 1805-13.
208. Shibamoto S, Hayakawa M, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Ito F. Hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta stimulate both cell growth and migration of human gastric adenocarcinoma cells. *Cell Struct Funct* 1992; 17: 185-90.
209. Otte JM, Schmitz F, Kiehne K, Stechele HU, Banasiewicz T, Krokowicz P, Nakamura T, Fölsch UR, Herzig K. Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal cancer. *Digestion* 2000; 61: 237-46.
210. Li HW, Shan JX. Effects of hepatocyte growth factor/scatter factor on the invasion of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3877-81.
211. Tamatani T, Hattori K, Iyer A, Tamatani K, Oyasu R. Hepatocyte growth factor is an invasion/migration factor of rat urothelial carcinoma cells in vitro. *Carcinogenesis* 1999; 20: 957-62.
212. Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA, Michalopoulos GK. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996; 132: 1133-49.
213. Osborne CK, Hamilton B, Titus G, Livingston RB. Epidermal growth factor stimulation of human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* 1980; 40: 2361-6.
214. Lee SW, Gleason NR, Stapleton GS, Zhai C, Huang EH, Bessler M, Whelan RL. Increased platelet-derived growth factor (PDGF) release after laparotomy stimulates systemic tumor growth in mice. *Surg Endosc* 2001; 15: 981-5.
215. Sato N, Beitz JG, Kato J, Yamamoto M, Clark JW, Calabresi P, Raymond A, Frackelton AR Jr. Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1993; 142: 1119-30.
216. Pierro E, Nicosia SV, Saunders B, Fultz CB, Nicosia RF, Mancuso S. Influence of growth factors on proliferation and morphogenesis of rabbit ovarian mesothelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1996; 54: 660-9.

217. Cavallaro G, Cucina A, Coluccia P, Petramala L, Cotesta D, Polistena A, Zinamosca L, Letizia C, Rosato L, Cavallaro A, De Toma G. Role of growth factors on human parathyroid adenoma cell proliferation. *World J Surg* 2010; 34: 48-54.
218. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25.
219. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
220. Singh B, Murphy RF, Ding XZ, Roginsky AB, Bell RH Jr, Adrian TE. On the role of transforming growth factor-beta in the growth inhibitory effects of retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 2007; 6: 82.
221. El-Metwally TH, Pour PM. The retinoid induced pancreatic cancer redifferentiation-apoptosis sequence and the mitochondria: a suggested obligatory sequence of events. *JOP* 2007; 8: 268-78.
222. Ravikumar S, Perez-Liz G, Del Vale L, Soprano DR, Soprano KJ. Insulin receptor substrate-1 is an important mediator of ovarian cancer cell growth suppression by all-trans retinoic acid. *Cancer Res* 2007; 67: 9266-75.
223. Lin LM, Li BX, Xiao JB, Lin DH, Yang BF. Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5633-7.
224. Zhang Y, Nie Y, Xu J, Pan Z, Huang Q, Wu K. Effects of all-trans retinoic acid on the rat Müller cell in vitro. *Yan Ke Xue Bao* 2007; 23: 163-7.
225. Mrass P, Rendl M, Mildner M, Gruber F, Lengauer B, Ballaun C, Eckhart L, Tschachler E. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. *Cancer Res* 2004; 64: 6542-8.
226. Park EY, Dillard A, Williams EA, Wilder ET, Pepper MR, Lane MA. Retinol inhibits the growth of all-trans-retinoic acid-sensitive and all-trans-retinoic acid-resistant colon cancer cells through a retinoic acid receptor-independent mechanism. *Cancer Res* 2005; 65: 9923-33.
227. Stewart LV, Thomas ML. Retinoids differentially regulate the proliferation of colon cancer cell lines. *Exp Cell Res* 1997; 233: 321-9.
228. Wiepz GJ, Edwin F, Patel T, Bertics PJ. Methods for determining the proliferation of cells in response to EGFR ligands. *Methods Mol Biol* 2006; 327: 179-87.
229. Kim DS, Korting HC, Schäfer-Korting M. Effects of growth factors on the proliferation of human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Pharmazie* 1998; 53: 51-7.
230. Shah D, Naciri M, Clee P, Al-Rubeai M. NucleoCounter-An efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. *Cytotechnology* 2006; 51: 39-44.
231. Liu F, Qi HL, Chen HL. Effects of all-trans retinoic acid and epidermal growth factor on the expression of nm23-H1 in human hepatocarcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 85-90.
232. Miano JM, Topouzis S, Majesky MW, Olson EN. Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1996; 93: 1886-95.
233. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Jackson S, Yin F, Nagpal S, Chandraratna RA, Hsueh WA, Law RE. Retinoids inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells by modulating cell cycle regulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 746-51.
234. Kosaka C, Sasaguri T, Komiyama Y, Takahashi H. All-trans retinoic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation targeting multiple genes for cyclins and cyclin-dependent kinases. *Hypertens Res* 2001; 24: 579-88.
235. Kini AR, Peterson LA, Tallman MS, Lingen MW. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood* 2001; 97: 3919-24.
236. Wang T, Ma X, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Role of pregnane X receptor in control of all-trans retinoic acid (ATRA) metabolism and its potential contribution to ATRA resistance. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324: 674-84.
237. Neri LM, Borgatti P, Tazzari PL, Bortul R, Cappellini A, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, Martelli AM. The phosphoinositide 3-kinase/AKT1 pathway involvement in drug and all-trans-retinoic acid resistance of leukemia cells. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 234-46.

238. Delva L, Cornic M, Balitrand N, Guidez F, Micléa JM, Delmer A, Teillet F, Fenaux P, Castaigne S, Degos L, et al. Resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) therapy in relapsing acute promyelocytic leukemia: study of in vitro ATRA sensitivity and cellular retinoic acid binding protein levels in leukemic cells. *Blood* 1993; 82: 2175-81.
239. Imaizumi M, Suzuki H, Yoshinari M, Sato A, Saito T, Sugawara A, Tsuchiya S, Hatae Y, Fujimoto T, Kakizuka A, Konno T, Iinuma K. Mutations in the E-domain of RAR portion of the PML/RAR chimeric gene may confer clinical resistance to all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1998; 92: 374-82.
240. Adamson PC. All-Trans-Retinoic Acid Pharmacology and Its Impact on the Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia. *Oncologist* 1996; 1: 305-314.
241. Tang XY, Zhu YQ, Tao WH, Wei B, Lin XL. Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma. *Postgrad Med J* 2007; 83: 338-43.
242. Caramés M, Alonso-Varona A, García-Alonso I, Palomares T. Glutathione modulators reverse the pro-tumour effect of growth factors enhancing WiDr cell response to chemotherapeutic agents. *Anticancer Res* 2010; 30: 1223-31.
243. Palomares T, Caramés M, García-Alonso I, Alonso-Varona A. Glutathione modulation reverses the growth-promoting effect of growth factors, improving the 5-fluorouracil antitumour response in WiDr colon cancer cells. *Anticancer Res* 2009; 29: 3957-65.
244. Raymond GM, Jumblatt MM, Bartels SP, Neufeld AH. Rabbit corneal endothelial cells in vitro: effects of EGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 474-9.
245. Pietras K, Rubin K, Sjöblom T, Buchdunger E, Sjöquist M, Heldin CH, Ostman A. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 2002; 62: 5476-84.
246. Kim R, Emi M, Arihiro K, Tanabe K, Uchida Y, Toge T. Chemosensitization by STI571 targeting the platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor-signaling pathway in the tumor progression and angiogenesis of gastric carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1800-9.
247. Im YS, Shin HK, Kim HR, Jeong SH, Kim SR, Kim YM, Lee do H, Jeon SH, Lee HW, Choi JK. Enhanced cytotoxicity of 5-FU by bFGF through up-regulation of uridine phosphorylase 1. *Mol Cells* 2009; 28: 119-24.
248. Singleton PA, Garcia JG, Moss J. Synergistic effects of methylnaltrexone with 5-fluorouracil and bevacizumab on inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1669-79.
249. Wei HB, Hu BG, Han XY, Zheng ZH, Wei B, Huang JL. Effect of all-trans retinoic acid on drug sensitivity and expression of survivin in LoVo cells. *Chin Med J (Engl)* 2008; 121: 331-5.
250. Masuda M, Toh S, Koike K, Kuratomi Y, Suzui M, Deguchi A, Komiyama S, Weinstein IB. The roles of JNK1 and Stat3 in the response of head and neck cancer cell lines to combined treatment with all-trans-retinoic acid and 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 329-39.
251. Li X, Mortensen B, Rushfeldt C, Huseby NE. Serum gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase during experimental liver metastases. Detection of tumour-specific isoforms and factors affecting their serum levels. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1935-40.
252. Li X, Mikkelsen IM, Mortensen B, Winberg JO, Huseby NE. Butyrate reduces liver metastasis of rat colon carcinoma cells in vivo and resistance to oxidative stress in vitro. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21: 331-8.
253. Xu B, Cai WS, Xiao HQ, Li SH, Xia JT, Zhu GH, Weng JF. Influence of liver regeneration after partial hepatectomy on the development of liver metastasis of colon cancer in rats. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2009; 47: 369-72.
254. de Jong KP, Lont HE, Bijma AM, Brouwers MA, de Vries EG, van Veen ML, Marquet RL, Slooff MJ, Terpstra OT. The effect of partial hepatectomy on tumor growth in rats: in vivo and in vitro studies. *Hepatology* 1995; 22: 1263-72.
255. de Jong KP, Brouwers MA, van Veen ML, Brinker M, de Vries EG, Daemen T, Scherphof GL, Slooff MJ. Serum obtained from rats after partial hepatectomy enhances growth of cultured colon carcinoma cells. *Invasion Metastasis* 1998-1999; 18: 155-64.
256. Aussilhou B, Panis Y, Alves A, Nicco C, Klatzmann D. Tumor recurrence after partial hepatectomy for liver metastases in rats: prevention by in vivo injection of irradiated cancer cells expressing GM-CSF and IL-12. *J Surg Res* 2008; 149: 184-91.

-
257. Harun N, Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Liver regeneration stimulates tumor metastases. *J Surg Res* 2007; 138: 284-90.
258. Mizutani J, Hiraoka T, Yamashita R, Miyauchi Y. Promotion of hepatic metastases by liver resection in the rat. *Br J Cancer* 1992; 65: 794-7.
259. Christophi C, Harun N, Fifis T. Liver regeneration and tumor stimulation--a review of cytokine and angiogenic factors. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 966-80.
260. Scheele J, Stangl R, Altendorf-Hofmann A. Hepatic metastases from colorectal carcinoma: impact of surgical resection on the natural history. *Br J Surg* 1990; 77: 1241-6.
261. Liau KH, Ruo L, Shia J, Padela A, Gonen M, Jarnagin WR, Fong Y, D'Angelica MI, Blumgart LH, DeMatteo RP. Outcome of partial hepatectomy for large (> 10 cm) hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 1948-55.
262. Karmakar S, Banik NL, Ray SK. Combination of all-trans retinoic acid and paclitaxel-induced differentiation and apoptosis in human glioblastoma U87MG xenografts in nude mice. *Cancer* 2008; 112: 596-607.
263. Westervelt P, Pollock JL, Oldfather KM, Walter MJ, Ma MK, Williams A, DiPersio JF, Ley TJ. Adaptive immunity cooperates with liposomal all-trans-retinoic acid (ATRA) to facilitate long-term molecular remissions in mice with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9468-73.
264. Bilbao P, del Olmo M, Alonso-Varona A, Castro B, Bilbao J, Palomares T.L-2-Oxothiazolidine-4-carboxylate reverses the tumour growth-promoting effect of interleukin-2 and improves the anti-tumour efficacy of biochemotherapy in mice bearing B16 melanoma liver metastases. *Melanoma Res.* 2002 Feb; 12(1): 17-26.