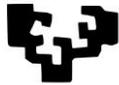


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia Molekularra Gradua / Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Efecto de la hipertermia sobre la proliferación de células CC-531 *in vitro*

Egilea/Autor:
Diego Sáenz de Urturi Indart
Zuzendaria/Director/a:
Ignacio García Alonso



Índice

1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	4
3. MATERIAL y MÉTODOS.....	5
Reactivos utilizados	5
All-Trans Retinoic Acid	5
Azul de Tripán.....	5
Dimetilsulfóxido (DMSO).....	5
Hepatocyte Growth Factor	5
Phosphate Buffered Saline (PBS).....	5
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	5
Suero Bobino Fetal (SBF)	5
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide.....	5
Tripsina	6
Técnicas utilizadas en el estudio	6
Cultivos celulares.....	6
Amplificación de las células originales	7
Cultivos en placas de 96 pocillos.....	7
Ensayos de hipertermia.....	7
Series experimentales	7
Análisis estadístico	8
4. RESULTADOS	9
Efecto de la hipertermia sobre la proliferación de los cultivos.....	9
Efecto del ATRA sobre cultivos expuestos a hipertermia	10
Efecto de combinado del ATRA y HGF sobre cultivos expuestos a hipertermia.....	11
5. DISCUSIÓN	15
6. CONCLUSIONES	16
7. BIBLIOGRAFÍA	17



1. INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR) es un problema mundial, con una incidencia anual de aproximadamente un 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).

Gran parte de los carcinomas colorrectales son adenocarcinomas glandulares, caracterizados por la invasión de tejidos o estructuras circundantes y por su potencial de metastatizar, por vía linfática o vascular. De hecho, alrededor del 50% de los pacientes con cáncer de colon desarrollan metástasis hepáticas, bien en la presentación del tumor o en la recidiva de la enfermedad. Por este motivo, las metástasis hepáticas del CCR constituyen un problema clínico de primera magnitud.

En la última década, la cirugía ha aumentado sus indicaciones desde pacientes con no más de tres metástasis, hasta pacientes con una masa tumoral hepática inicialmente no resecable, pero susceptibles de reducir el volumen tumoral mediante quimioterapia o de incrementar la masa hepática remanente hasta proporciones compatibles con la supervivencia del enfermo (embolizaciones, ligadura de vasos portales, etc.).

Hoy por hoy, la técnica curativa indiscutida es la resección quirúrgica del parénquima hepático invadido por tumor; sin embargo, solo una pequeña parte de los pacientes que presentan metástasis hepáticas son aptos para someterse a resección quirúrgica (3).

Por otra parte, aunque la cirugía sea la terapia más eficaz en estos enfermos, es muy común en estos pacientes observar una recidiva de la enfermedad. Esta recidiva se produce cuando la micrometástasis residual presente en el hígado comienza de nuevo a crecer (4). El desarrollo del proceso metastático depende de la presencia de factores de crecimiento, la proliferación celular y la angiogénesis. En este proceso, las células neoplásicas reciben factores de crecimiento provenientes tanto de células tumorales como de células del órgano diana, que en conjunto inducirán una señal mitogénica que provoca la división y proliferación, dando lugar a un aumento de la masa tumoral (5-7).

Por este motivo, tiene gran interés el desarrollo de terapias que complementen la resección quirúrgica, especialmente si están orientadas a privar a las posibles células tumorales residuales del beneficio de la pléyade de factores tróficos liberados como consecuencia de la resección hepática y del propio acto quirúrgico.

En este sentido, se trabaja ensayando la administración de retinoides como quimioterapia neoadyuvante o complemento postquirúrgico. Se ha visto que los retinoides regulan un gran número de procesos fisiológicos importantes como son el desarrollo embrionario, la visión, la reproducción, la

formación ósea, el metabolismo, la hematopoyesis, la diferenciación, proliferación y apoptosis (8-15). Además, farmacológicamente han sido reconocidos como moduladores del crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. Han sido capaces de suprimir carcinogénesis en una amplia variedad de tejidos como el cáncer oral, piel, vejiga, pulmón, próstata y mama en animales de experimentación (15, 16).

Un derivado retinoide, ácido all-trans retinoico (ATRA), fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en pacientes de leucemia mieloide aguda.

Algunos estudios *in vitro* del efecto del ATRA, han mostrado una clara reducción de la proliferación celular en células cancerosas. No obstante, los estudios referidos a la utilización de retinoides en el tratamiento de metástasis hepáticas son escasos (17-19).

Otro enfoque terapéutico es el recurso a la hipertermia o termoterapia para inducir la apoptosis de las células tumorales, sensibilizarlas frente a ciertos quimioterápicos o, incluso, a modo de ablación térmica del tumor.

La ventaja del empleo de la hipertermia para eliminar células cancerosas se debe a que las células o tejidos normales, son menos susceptibles a las altas temperaturas, al contrario que las células cancerosas. Por ello, con el empleo de la hipertermia se podrían reducir los tumores sin provocar lesiones en los tejidos sanos circundantes (20).

Uno de los mayores problemas es que la aplicación de hipertermia sistémica podría provocar efectos no deseados en el organismo en lugar de únicamente en el tumor. Una alternativa a este problema es el empleo de nanopartículas magnéticas unidas a un marcador característico del tumor, de forma que estas nanopartículas se acumulen en el tumor y pueda localizarse la aplicación de la hipertermia.

Los mecanismos moleculares por los que actúa la hipertermia no se conocen con exactitud, aunque se han determinado algunos de los cambios celulares que se producen tras este shock térmico. Estos cambios incluyen variaciones en la membrana celular, metabolismo, núcleo y estructuras del citoesqueleto, síntesis de macromoléculas, expresión de genes de shock térmico y transducción intracelular de señales (21). Sin embargo, se cree que la desnaturalización proteica y los daños en la membrana son los principales responsables del efecto citotóxico de la hipertermia (22, 23, 24).

Esto se debe a que por un lado, las proteínas comienzan a desnaturalizarse a temperaturas superiores a 40°C, por lo que estructuras multimoleculares y enzimas se ven alteradas y pierden su actividad (25). Cuando complejos enzimáticos responsables de la síntesis y reparación del DNA están dañados, podrían darse daños irreversibles. Además, el propio DNA recién sintetizado es sensible al estrés térmico pudiendo darse un emparejamiento incorrecto entre las dos hebras, contener pares de bases aberrantes e incluso producirse mutaciones. La hipertermia puede incluso inhibir el propio proceso de replicación del DNA a través de la inactivación de algunos enzimas importantes (26).



Por otro lado, la membrana celular también se ve modificada por el efecto de la hipertermia. La alteración de las propiedades de la membrana puede emplearse para facilitar la captación de fármacos debido a los cambios en la fluidez y la permeabilidad de ésta (27). Esto hace que en los fármacos quimioterápicos se administren aplicados conjuntamente con hipertermia acumulándose así una mayor cantidad de fármaco en el sitio del tumor gracias a la permeabilidad aumentada.

2. OBJETIVOS

Los estudios *in vitro* deben de preceder siempre a los experimentos *in vivo*, siendo los ensayos clínicos la etapa última y final. Sin embargo, es el problema clínico y la hipótesis de su posible solución, quienes deben de justificar los estudios básicos y básico-aplicados; lo que hoy día se denomina investigación translacional.

El presente trabajo está orientado a aportar datos en torno a tres preguntas surgidas en los foros de investigación clínica: ¿puede una elevación transitoria de la temperatura inducir la apoptosis de las células tumorales? ¿Un episodio de hipertermia puede sensibilizar a las células tumorales frente a un quimioterápico? ¿Puede la hipertermia reducir la capacidad de respuesta de las células tumorales a los estímulos proliferativos de los factores de crecimiento?

3. MATERIAL y MÉTODOS

Reactivos utilizados

All-Trans Retinoic Acid

El ácido all-trans retinoico (ATRA) ha sido suministrado por Sigma (R-2625) en un frasco de 1g. Para su utilización en los cultivos se ha disuelto en etanol 100° a una concentración 10^{-2} M, conservándose congelado. Para tratar Los cultivos con ATRA, se añadió al medio la cantidad de solución stock necesaria para obtener una concentración de fármaco 10 μ M.

Azul de Tripán

El azul de tripán, empleado como tinción para determinar las células no viables en la técnica de recuento celular, ha sido suministrado por Gibco (Trypan Blue Stain 0,4%; Gibco, 15250-061).

Dimetilsulfóxido (DMSO)

El dimetilsulfóxido (DMSO) ha sido empleado para formar el medio de congelación de las células (SBF + 10% DMSO) y para romper las células en la técnica de viabilidad MTT. Este reactivo ha sido proporcionado por MERK (MERCK, 1.02952.1000).

Hepatocyte Growth Factor

El Factor de crecimiento hepatocitario (HGF; PeproTech) ha sido suministrado liofilizado, en un vial de 10 μ g, conservado a -20°C. El factor se ha diluido en PBS, en una concentración de 1 μ g/ml. En los experimentos realizados el HGF se ha empleado a una concentración de 7,5 ng/ml.

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Tanto para limpiar las células adheridas a las placas tras la tripsinización, como para disolver el ATRA y el HGF se ha utilizado PBS (Phosphate Buffered Saline), suministrado por Sigma (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Sigma, P-3813).

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)

El medio de cultivo empleado para el crecimiento celular es el RPMI, que ha sido suministrado por Gibco®, Life Technologies (RPMI-1640; Gibco, 52400-025).

Suero Bobino Fetal (SBF)

El suero bobino fetal (SBF), empleado para complementar los medios de cultivo celulares tanto para el crecimiento como para la congelación, ha sido proporcionado por Biochrom (SBF; Biochrom AG, S0115).

Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

El reactivo Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, empleado para la técnica de MTT, ha sido suministrado por Sigma (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; Sigma, M2128-1G).

Tripsina

La tripsina, empleada para despegar las células adheridas a los frascos de cultivo, ha sido suministrada por Gibco (0,05% Trypsin-EDTA 1X; Gibco, 25300).

Técnicas utilizadas en el estudio

Cultivos celulares

Sala de cultivos celulares

Los experimentos *in vitro* realizados en este trabajo se llevaron a cabo en el laboratorio de cultivos celulares del Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina y Odontología de la UPV/EHU.

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador (Sanyo; MCO-19AI C UV) a 37°C y con 5% CO₂. Para la manipulación de los cultivos se utilizó una campana de flujo laminar Teslar AH-100. Para la recolección de las células tras despegarlas del frasco de cultivo, se empleó una centrífuga refrigerada (Thermoscientific; Biofuge Primo).

Células utilizadas

Para este proyecto se empleó la línea celular estabilizada de adenocarcinoma de colon CC-531, de ratas Wag/RijCrI. Se adquirieron dos viales congelados de pase 21 a Cell Line Service (Alemania).

Condiciones de cultivo

Las células se han cultivado en medio RPMI enriquecido con 10% de SBF. El medio se complementó con antibióticos penicilina (100 U.I./ml) y estreptomina (100 mg/ml) (LONZA; DE 17-602E), para evitar la contaminación de los cultivos.

Recuento celular

El conteo de células se realizó manualmente, empleando una cámara de Neubauer, mediante la visualización directa por el microscopio óptico invertido de contraste de fases. Para su observación, se realiza una dilución 1:1 de la suspensión celular y azul tripán, colorante que penetra en el interior de las células no viables.

Valoración de proliferación celular mediante MTT

El Test Mitocondrial del Tetrazolio (MTT) es un ensayo colorimétrico para medir la viabilidad celular. Se basa en la capacidad del enzima succinato deshidrogenasa para transformar el tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) en cristales insoluble del formazán. La cantidad de formazán, directamente relacionada con el número de células viables en el cultivo, puede determinarse midiendo la absorbancia a 540 nm mediante un lector de placas Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific)

Para llevar a cabo la cuantificación, en placas de cultivo de 96 pocillos se añaden 10 μ l/pocillo de MTT diluido en PBS y tras un tiempo de espera de 2 horas, se eliminó el medio de cultivo y se añadió DMSO para lisar las células.

Amplificación de las células originales

La expansión y almacenamiento de los viales adquiridos de pase 21 se realizó descongelando y atemperando los viales rápidamente en baño caliente a 37°C y sembrando seguidamente las células en frasco de cultivo T-25 (Tissue Culture Flasks; Orange Scientific, 5510100) con 5 ml de medio de cultivo RPMI + 20% SBF. Una vez adheridas al frasco de cultivo (4-5 horas), se retiró el medio y se añadió medio de cultivo nuevo. Cuando las células llegaron a estado de confluencia, se despegaron con Tris-EDTA y se sembraron en un frasco de cultivo T-75 (Cell Culture Flasks; Corning, 430641), donde se mantuvieron hasta llegar a confluencia. El stock obtenido, de pase 24, se congeló en SBF + 10% DMSO.

Cultivos en placas de 96 pocillos

Para cada experiencia, se seleccionaron aquellos viales cuyas células presentaban una viabilidad igual o superior al 95%. Tras la expansión del vial y la obtención de la suspensión celular, se realizó la dilución necesaria para la obtención de una concentración celular de 25.000 células/ml.

En cada pocillo de las placas de cultivo, se añadieron 100 μ l de la suspensión celular, de forma que en cada pocillo haya 2.500 células.

Ensayos de hipertermia

El insulto térmico se realizó manteniendo las placas de cultivo en un incubador a 47°C y 5% CO₂ durante 30, 45 o 60 minutos. La viabilidad celular se determinó mediante MTT tras 0 y 24 horas del insulto térmico.

Para las experiencias combinadas de temperatura y ATRA y/o HGF, la adicción de éstos se realizó 24 horas después de sembrar las células, dejándose actuar durante otras 24 horas antes de aplicar el insulto térmico. La determinación de la viabilidad en este ensayo se realizó a las 24, 48 y 72 horas.

Series experimentales

Se han realizado tres series experimentales para comprobar en cada una de ellas el efecto de la hipertermia sobre el crecimiento celular, la sensibilización a agente quimioterápicos tras la exposición a la hipertermia y el efecto de la hipertermia sobre proliferación inducida por factores de crecimiento.

Efecto de la hipertermia en sobre el crecimiento celular. Se emplearon 8 placas de 96 pocillos. Dos de ellas se usaron como control sin hipertermia para las 0 y las 24 horas. Otras seis placas se emplearon para someter a las células a hipertermia durante 30, 45 y 60 minutos y ver el efecto a las 0 y 24 horas. En cada placa se emplearon 6 pocillos como blanco y 90 pocillos se sembraron con células a concentración de 25000 células/ml.

Sensibilización a agente quimioterápicos tras la exposición a la hipertermia. Se emplearon 8 placas de 96 pocillos. Dos de ellas se usaron como control sin hipertermia para las 0 y las 24 horas. Otras seis placas se emplearon para someter a las células a hipertermia durante 30, 45 y 60 minutos y ver el efecto a las 0 y 24 horas. En cada placa se emplearon 6 pocillos como blanco y 90 pocillos se sembraron con células a concentración de 25000 células/ml. En los pocillos sembrados se añadieron 100 μ l de ATRA 10 μ M por pocillo.

Efecto de la hipertermia sobre proliferación inducida por factores de crecimiento. Se emplearon 12 placas de 96 pocillos. Tres de ellas se usaron como control sin hipertermia para las 0, 24 y 72 horas. Otras nueve placas se emplearon para someter a las células a hipertermia durante 30, 45 y 60 minutos y ver el efecto a las 0, 24 y 72 horas. En cada placa se emplearon 8 pocillos como blanco y 88 pocillos se sembraron con células a concentración de 25000 células/ml. De los pocillos sembrados, 16 se emplearon como control sin tratamiento, a 24 se les añadió 100 μ l de ATRA 10 μ M, a otros 24 se les añadió 100 μ l de HGF 7,5 ng/ml y a otros 24 se les añadió 100 μ l de ATRA 10 μ M y HGF 7,5 ng/ml.

Análisis estadístico

Los valores de absorbancia obtenidos se trataron con el paquete informático *Microsoft Office Excel* para la obtención de la media y la desviación estándar de cada grupo analizado.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa *GraphPad Prism 6*. Los datos se representaron en diagramas de barras y se realizaron pruebas no paramétricas de la T y análisis de la varianza (ANOVA), considerándose significativas aquellas diferencias que mostraron un valor $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Efecto de la hipertermia sobre la proliferación de los cultivos

Se ha estudiado el efecto que diferentes periodos de hipertermia ejercen sobre la viabilidad y posterior proliferación de las células tumorales en cultivo. En concreto, se han realizado tres ensayos diferentes, en función de la duración de la exposición a la hipertermia (30, 45 y 60 minutos) cuantificándose la concentración de células en el cultivo tanto al terminar el insulto térmico como tras 24 horas más de cultivo en condiciones normales..

La exposición a 47°C durante 30 minutos no ha tenido ningún efecto sobre el cultivo. De hecho, al comparar los resultados del test de MTT obtenidos en los cultivos control con los observados en aquellos sometidos a hipertermia, no se encuentran diferencias significativas ($p > 0,05$), tal y como se puede apreciar en la figura 3.1. Así, las medidas realizadas en tiempo 0 muestran un valor medio de $0,170 \pm 0,021$ para los controles, frente a $0,183 \pm 0,03$ para los de hipertermia. Veinticuatro horas más tarde, estas cifras se elevaron a $0,216 \pm 0,074$ y $0,217 \pm 0,045$ respectivamente.

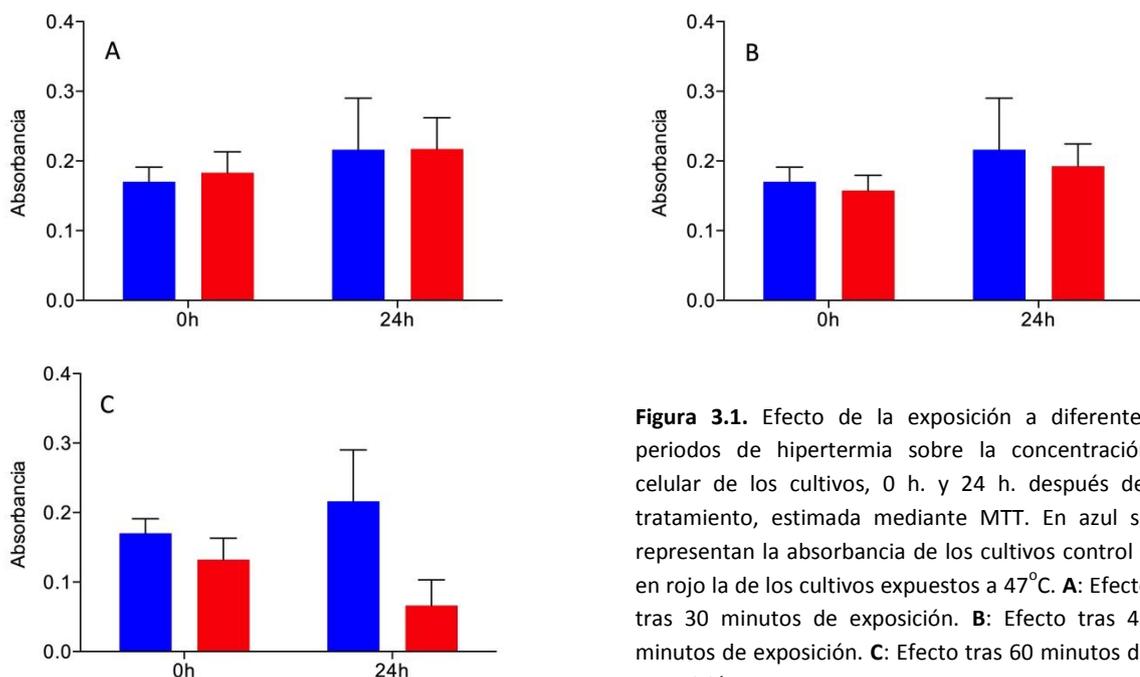


Figura 3.1. Efecto de la exposición a diferentes periodos de hipertermia sobre la concentración celular de los cultivos, 0 h. y 24 h. después del tratamiento, estimada mediante MTT. En azul se representan la absorbancia de los cultivos control y en rojo la de los cultivos expuestos a 47°C. **A:** Efecto tras 30 minutos de exposición. **B:** Efecto tras 45 minutos de exposición. **C:** Efecto tras 60 minutos de exposición.

En cambio, en los experimentos realizados con exposiciones a hipertermia de 45 minutos, sí que se observó alguna modificación en el comportamiento de los cultivos. Al igual que ocurrió en el experimento con media hora a 47°C, no hubo ningún efecto inmediato; o, lo que es lo mismo, no se observó pérdida de células en el cultivo una vez completado el periodo de hipertermia: $0,170 \pm 0,021$ vs $0,157 \pm 0,022$ ($p > 0,05$).

En cambio, transcurridas 24 horas, el estudio con MTT muestra diferencias significativas entre los cultivos tratados y los sometidos a 45 minutos de hipertermia ($p < 0,05$). Así, en los cultivos control la

absorbancia media fue de $0,192 \pm 0,032$, mientras que en los sometidos al insulto térmico encontramos unos valores de $0,216 \pm 0,074$. Es decir, que 24 horas después de exponerse durante 45 minutos a hipertermia, se observa un incremento de células en el cultivo de un 12,5%.

Por último, en los cultivos mantenidos durante 60 minutos a 47°C , se ha podido apreciar un efecto claramente inhibitorio. En primer lugar, la estimación de la concentración de células en el cultivo nada más concluir el periodo de hipertermia muestra unos valores medios de $0,132 \pm 0,031$, que resultan significativamente menores que los hallados en los cultivos controles ($0,170 \pm 0,021$), tal y como se puede apreciar en la figura 1 ($p < 0,05$). O lo que es lo mismo, el tratamiento de hipertermia durante 60 minutos promueve la muerte celular al reducir la concentración celular en los cultivos tratados un 22% con respecto al cultivo control.

Este mismo efecto, pero más acusado aún, se ha encontrado al realizar el estudio con MTT de los cultivos 24 horas después de haberlos sometido a hipertermia. Así, se obtienen unos valores medios de absorbancia de tan sólo $0,066 \pm 0,037$; cifra que no llega a ser la tercera parte (30,5%) de la hallada en los respectivos controles ($0,216 \pm 0,074$; $p < 0,001$).

Tras comparar la absorbancia a las 24 horas con la obtenida al final de la hipertermia, vemos que se ha producida una drástica caída de los valores, quedando reducidos hasta un 34%. Es decir, no sólo se ha bloqueado la proliferación, sino que se ha producido la muerte de una importante proporción de células tumorales en el cultivo.

Efecto del ATRA sobre cultivos expuestos a hipertermia

En este apartado se presentan los resultados obtenidos al estudiar el posible efecto de la hipertermia sobre la acción antiproliferativa del ácido all-trans retinoico. Se incluyen tres experiencias que reproducen los mismos apartados del epígrafe anterior: tiempos progresivos de exposición a la hipertermia, con 30, 45 y 60 minutos, respectivamente.

En los cultivos no sometidos a hipertermia en los que se incorporó ATRA se puede apreciar una ligera disminución de la media de absorbancia, al compararse con cultivos no tratados ($0,148 \pm 0,02$ vs $0,170 \pm 0,021$; $p < 0,05$).

Con se observa en la figura 3.2-A, los cultivos tratados con ATRA no muestran una modificación significativa en sus niveles de absorbancia tras experimentar 30 minutos de hipertermia: $0,148 \pm 0,02$ vs $0,156 \pm 0,027$ ($p > 0,05$).

En cambio, transcurridas 24 horas desde la exposición a hipertermia durante media hora, se aprecia que en los cultivos tratados con ATRA los niveles de absorbancia con MTT se encuentran descendidos respecto a aquellos que únicamente fueron sometidos al periodo de hipertermia: $0,141 \pm 0,045$ vs $0,176 \pm 0,05$ ($p < 0,05$).

Aumentar en un 50% la duración de la exposición a hipertermia no modificó sensiblemente el comportamiento de los cultivos tratados con ATRA. Tal y como se aprecia en la figura 3.2, las gráficas

que muestran los resultados de absorbancia del MTT son superponibles. En la valoración realizada nada más concluir la hipertermia los valores medios de absorbancia son prácticamente idénticos: $0,148 \pm 0,02$ vs $0,145 \pm 0,02$. En cambio, 24 horas más tarde, los cultivos sometidos a hipertermia mostraron una significativa reducción de sus valores de absorbancia ($0,176 \pm 0,05$ vs $0,121 \pm 0,037$; $p < 0,05$), lo que traduce una reducción de más del 30% en el número medio de células en cada pocillo de la placa.

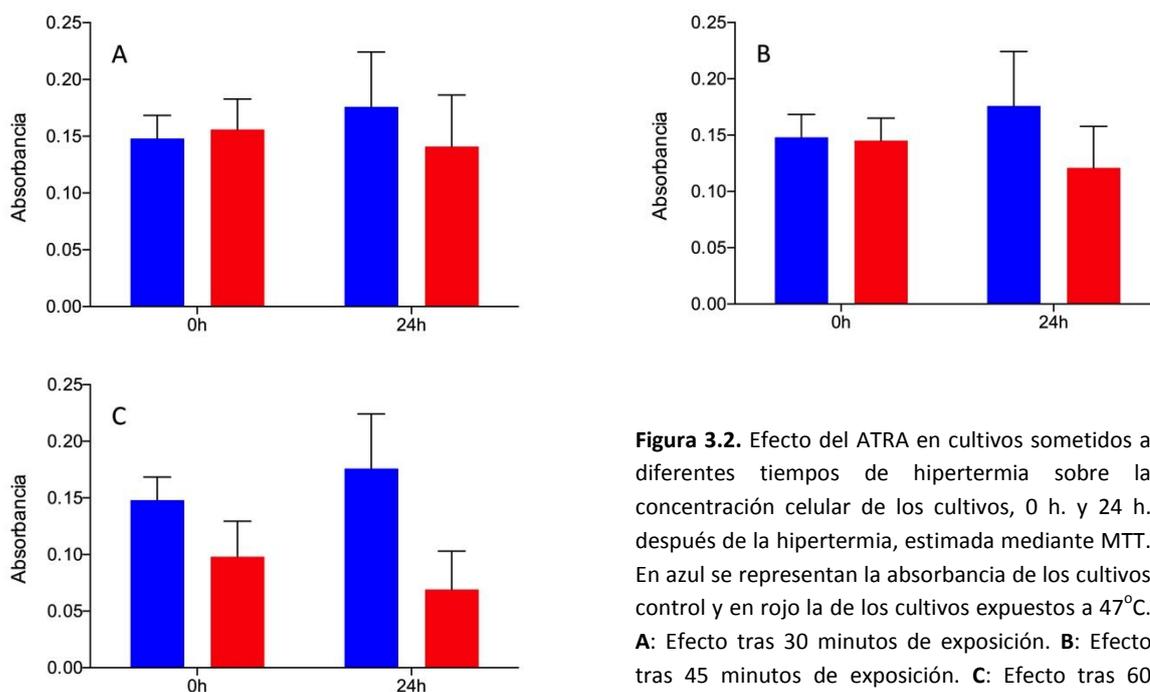


Figura 3.2. Efecto del ATRA en cultivos sometidos a diferentes tiempos de hipertermia sobre la concentración celular de los cultivos, 0 h. y 24 h. después de la hipertermia, estimada mediante MTT. En azul se representan la absorbancia de los cultivos control y en rojo la de los cultivos expuestos a 47°C . **A:** Efecto tras 30 minutos de exposición. **B:** Efecto tras 45 minutos de exposición. **C:** Efecto tras 60 minutos de exposición.

Por último, se ve que en los cultivos sometidos a 60 minutos de hipertermia, el efecto antiproliferativo del ATRA resulta sensiblemente más acusado. De hecho, se manifiesta inmediatamente de concluir el insulto hipertérmico, con una reducción de la absorbancia superior al 30% ($0,148 \pm 0,02$ vs $0,098 \pm 0,03$; $p < 0,05$), lo que traduce una muerte celular inmediata de una de cada tres células como consecuencia de la hipertermia.

Al estudiar la situación de los cultivos 24 horas más tarde, se observa que mientras los cultivos expuestos al ATRA pero no sometidos a hipertermia proliferaron ($0,148 \pm 0,02$ vs $0,176 \pm 0,05$; $p < 0,05$), ocurrió justamente lo contrario con los expuestos hipertermia, que experimentaron una reducción de casi el 50% en el número de células presentes en los pocillos $0,098 \pm 0,03$ vs $0,069 \pm 0,03$; $p < 0,05$). De hecho, el insulto térmico, redujo la absorbancia de los cultivos a las 24 horas en algo más del 60%: $0,176 \pm 0,05$ vs $0,069 \pm 0,03$; $p < 0,05$).

Efecto de combinado del ATRA y HGF sobre cultivos expuestos a hipertermia

En ésta sección se recogen los resultados del efecto que pudiera tener la presencia del factor de crecimiento hepatocitario en cultivos expuestos a hipertermia tratados con ácido all-trans retinoico. Se realizaron tres ensayos con tiempos progresivos de exposición al insulto térmico (30, 45 y 60 minutos) y

un control con cultivos mantenidos a 37°C. La determinación de la viabilidad celular se realizó 24, 48 y 72 horas después del insulto térmico.

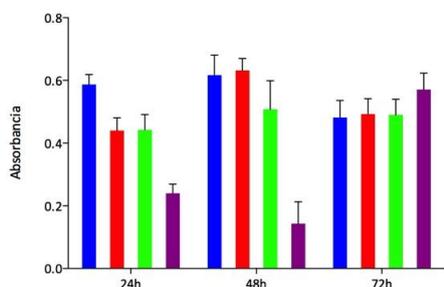


Figura 3.3.- Efecto de la exposición a 30 minutos (rojo), 45 minutos (verde) y 60 minutos (morado) sobre el crecimiento de cultivos celulares de la línea CC-531 a 47°C, en comparación con un control mantenido a 37°C.

Las células cultivadas con diferentes tiempos de exposición a hipertermia, sufrieron modificaciones en su cinética proliferativa normal, al compararse cada condición con un control mantenido a 37°C. Así, la viabilidad celular medida mediante la prueba del MTT mostró un descenso de aproximadamente un 25% tras estar expuesta durante 30 y 45 minutos a 47°C. El efecto de duplicar el tiempo de exposición a la hipertermia (60 minutos), provocó que el descenso de la proliferación fuera 2,4 veces mayor con respecto al control ($0,240 \pm 0,029$ vs. $0,587 \pm 0,032$).

Cuarenta y ocho horas después de la exposición a la hipertermia, apenas hubo variaciones en el crecimiento celular de los cultivos expuestos durante 30 minutos a 47°C; sin embargo, la exposición por tiempos de 45 y 60 minutos, redujo la proliferación en un 17,7% y 78,8%, respectivamente.

La aplicación del insulto térmico durante 30 y 45 minutos, no varió la cinética de proliferación celular al compararse con el control 72 horas después de la hipertermia. Pero, la exposición durante 60 minutos a 47°C, causó un aumento del número de células del 18,5%.

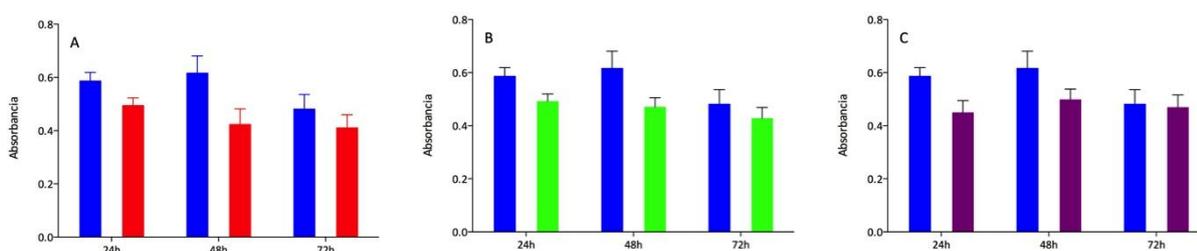


Figura 3.4. Efecto del ATRA (rojo, A), HGF (verde, B) y ATRA+HGF (morado, C) sobre la concentración celular de los cultivos mantenidos a 37°C, 24, 48 y 72 horas después de la hipertermia, estimada mediante MTT. Cultivos control en azul (A-C).

En los cultivos no sometidos a hipertermia y tratados con ATRA, figura 3.4-A, se observa una reducción de la proliferación celular de un 15,7%, 31,1% y 14,7% en cada uno de los tres tiempos analizados, 24, 48 y 72 horas. La suplementación del medio de cultivo con HGF, figura 3.4-B, también provocó un descenso en la proliferación celular del 16,2%, 23,7% y 11,2%, respectivamente. Finalmente, con la combinación de ambos compuestos, HGF + ATRA (figura 3.4-C), se puede observar que la tasa proliferativa repite el mismo patrón negativo, reduciéndose la absorbancia detectada en los cultivos a

las 24 y 48 horas en un 23,3% y 19,1% respectivamente; sin embargo, a las 72 horas, podemos ver que los valores obtenidos en el grupo control y el tratado, son idénticos.

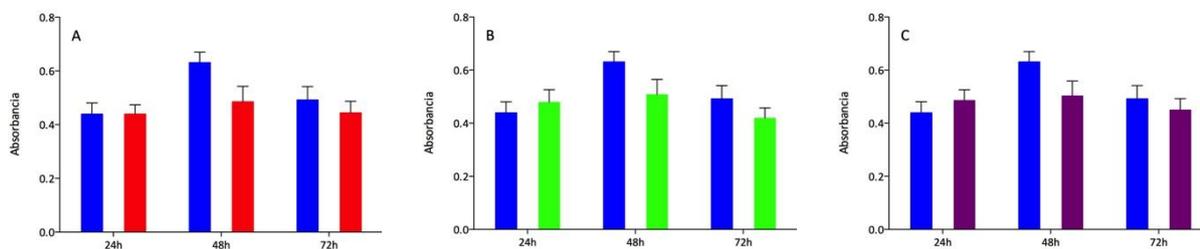


Figura 3.5. Efecto del ATRA (rojo, A), HGF (verde, B) y ATRA+HGF (morado, C) en cultivos sometidos a 30 minutos de hipertermia sobre la concentración celular de los cultivos, 24, 48 y 72 horas después de la hipertermia, estimada mediante MTT. Cultivos control en azul (A-C).

La suplementación de los cultivos con ATRA, HGF y la combinación de ambos, ATRA+HGF, no tuvo efectos en las 24 horas posteriores al insulto térmico de 30 minutos, si lo comparamos con el grupo control que sólo fue expuesto a la hipertermia (figura 3.5). En las 48 horas posteriores a la exposición a 47°C, se puede observar que el ATRA causó una disminución de la tasa proliferativa del 23%, siendo ésta de un 20% en los cultivos suplementados con HGF y con ATRA+HGF. La absorbancia detectada tras 72 horas del insulto térmico, sufrió una disminución de entre un 10%, 15% y 8% en los cultivos tratados con ATRA, HGF y ATRA+HGF.

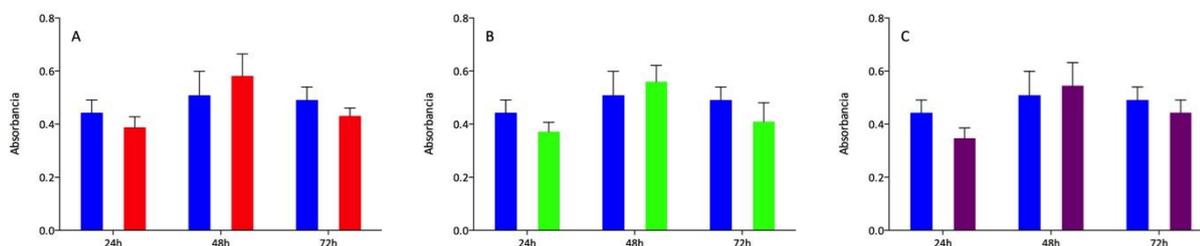


Figura 3.6. Efecto del ATRA (rojo, A), HGF (verde, B) y ATRA+HGF (morado, C) en cultivos sometidos a 45 minutos de hipertermia sobre la concentración celular de los cultivos, 24, 48 y 72 horas después de la hipertermia, estimada mediante MTT. Cultivos control en azul (A-C).

Al comparar la curva de proliferación de los cultivos expuestos a hipertermia durante 45 minutos junto con diferentes compuestos (ATRA (figura 3.6-A), HGF (figura 3.6-B) y ATRA + HGF (figura 3.6-C)), se puede apreciar, que en los tres grupos tratados, sigue el mismo patrón. El tratamiento provoca un retardo en la proliferación a las 24 y 72 horas, pero a las 48 horas mejora el crecimiento de los cultivos tratados frente a los controles.

El ATRA provoca una disminución del crecimiento de un 12% tras 24 y 72 horas respecto al control sin tratar, mientras que a las 48 horas provoca un aumento de la proliferación celular del 14,5%. EL HGF, al igual que el ATRA, también provoca una disminución de la tasa de proliferación a las 24 y 72 horas de un

16% y 16,5%, respectivamente; sin embargo, a las 48 horas, hay un aumento del 10% en la tasa de proliferación. La combinación de ambos, ATRA + HGF, vuelve a repetir este patrón, disminuye la proliferación celular en un 21,5% y 9,5% a las 24 y 72 horas, y aumenta un 7,3% a las 48 horas.

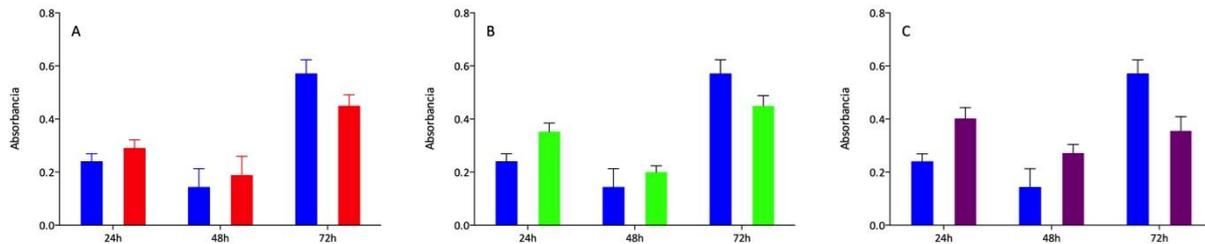


Figura 3.7. Efecto del ATRA (rojo, A), HGF (verde, B) y ATRA+HGF (morado, C) en cultivos sometidos a 60 minutos de hipertermia sobre la concentración celular de los cultivos, 24, 48 y 72 horas después de la hipertermia, estimada mediante MTT. Cultivos control en azul (A-C).

En el caso de los cultivos a los que se sometió a temperaturas de 47°C por un espacio de tiempo de 60 minutos, se pudo comprobar que a las 24 horas, el tratamiento con ácido all-trans retinoico, factor de crecimiento hepatocitario y la combinación de ambos provocó un incremento del 38,1%, 46,7% y 67,5% en el crecimiento de los cultivos celulares expuestos al insulto térmico, respecto al control mantenido a 37°C. Igualmente, a las 48 horas, la proliferación celular de los cultivos aumentó en un 32,2%, 39,9% y 90,2% al tratarse con ATRA, HGF y ATRA + HGF respectivamente. Sin embargo, a las 72 horas, la adición de estos compuesto causó una disminución de la tasa proliferativa de un 21,4% al exponerse los cultivos a ATRA y HGF y un 37,9% con la combinación de ambos, ATRA + HGF.

5. DISCUSIÓN

En nuestros experimentos, se constata que la hipertermia (una elevación de 10°C en la temperatura del cultivo) mantenida durante un cierto tiempo, frena la proliferación de las células tumorales de carcinoma CC-531. Si bien con exposiciones de 30 o 45 minutos no se modifica sensiblemente la curva de proliferación, tras una exposición de 60 minutos se invierte el sentido de la curva, reduciéndose significativamente el número de células presentes en el cultivo al cabo de 24 horas. El hecho de que las medidas realizadas al terminar el insulto térmico no muestren modificaciones significativas, hace pensar que no se produce destrucción directa de células por el calor.

Se ha visto que la hipertermia provoca efectos nocivos en la célula principalmente a nivel de DNA y membrana (22, 23, 24). Por ello, podría ocurrir que los efectos nocivos que se producen en las células por el tratamiento durante 30 y 45 minutos (Figura 3.1 A y B) no sean suficientes para provocar una muerte celular, o al menos una reducción del crecimiento del cultivo. Con una exposición a hipertermia durante 60 minutos sin embargo, provoca una acumulación de errores en la célula que acaban produciendo la muerte de ésta (Figura 3.1 C).

Las alteraciones en el DNA y la membrana acumulados durante la hipertermia, puede provocar que en las 24 horas posteriores al tratamiento, las células no fueran capaces de soportar los daños y acabaran muriendo, tal y como puede observarse en los cultivos expuestos a hipertermia durante 45 y 60 minutos (Figura 3.1 B y C). Es de destacar la dependencia del tiempo de exposición en la reducción de la absorbancia del cultivo, representando las células viables del cultivo, posiblemente debido al mayor tiempo de acumulación de daño celular.

Si bien es cierto que los estudios del efecto de la hipertermia en células de adenocarcinoma son escasos, la hipertermia ha sido estudiada en otros tipos celulares.

Hasta ahora se ha visto un efecto negativo sobre crecimiento celular en células tumorales, incluso de inducción de muerte, de forma dependiente a la temperatura (28). Estos hechos apoyan en parte los resultados obtenidos en el proyecto, ya que se ha observado de la misma forma una reducción del crecimiento e incluso muerte celular tras la hipertermia.

En cuanto al efecto del tratamiento con ATRA de los cultivos sometidos a hipertermia, parece que puede concluirse que este fármaco aumenta el efecto antiproliferativo de la hipertermia. Esto se pone de manifiesto en el hecho de que con sólo 45 minutos de exposición a 47°C, ya se ve una reducción del número de células tras 24 horas. Además, en los cultivos sometidos a 60 minutos de hipertermia el efecto antiproliferativo es más marcado que en los cultivos sin ATRA; de hecho, ya al terminar el periodo de hipertermia se aprecia una reducción frente al control.

Estos resultados concuerdan con lo demostrado por otros autores y por experiencias previas en este Laboratorio, tanto con células de adenocarcinoma de colon como de rhabdomyosarcoma (29).

En cuanto a las experiencias con HGF, en cultivos normales no hemos constatado el efecto estimulador de la proliferación celular demostrado por otros investigadores (30-35). Si nos fijamos en lo publicado por Palomares y Cols., en sus experiencias tuvieron que privar a los cultivos del estímulo del suero bobino fetal para poder apreciar el efecto estimulador de HGF 10nmol. Es sabido que un exceso de factor trófico tiene un efecto antiproliferativo. En nuestro caso, dado que para mantener las condiciones generales del ensayo los cultivos incorporaron un 10% de SBF no es extraño que en vez de un estímulo se aprecie un freno en el cultivo. Exactamente lo mismo ocurre en los cultivos sometidos a 30 y 45 minutos de hipertermia.

En cambio, en los cultivos que experimentan un decaimiento más intenso, como consecuencia de su exposición a 60 minutos de hipertermia, sí que se ha evidenciado un efecto estimulador del HGF, que se manifiesta en las primeras dos mediciones. En cambio, en el registro de 72 h, con una población celular ya recuperada, deja de mostrarse el efecto estimulador del HGF. Puede decirse que el daño producido por la hipertermia “abre una ventana terapéutica” para el efecto estimulador del HGF sobre las células tumorales.

Por último, la adición de ATRA a los cultivos enriquecidos con HGF no ha producido ningún efecto reseñable. Podría pensarse que el estímulo del HGF de alguna manera “protege” a las células del efecto antiproliferativo del ATRA.

6. CONCLUSIONES

Los cultivos de CC531 sometidos a sesenta minutos de hipertermia muestran una reducción en el número de células viables 24 horas después.

Los cultivos tratados con ATRA presentan mayor sensibilidad a la agresión térmica, que se manifiesta tras 45 minutos de hipertermia

Los cultivos controles tratados con HGF no muestran un mayor crecimiento por la estimulación debida al factor trófico. Sin embargo, en cultivos inhibidos por la exposición a 60 minutos de hipertermia sí se aprecia un efecto estimulador del HGF.

Los cultivos tratados con ATRA y HGF no presentan ningún efecto propio de estos factores, su crecimiento y sensibilidad a la hipertermia es similar a la de los cultivos sin tratar.

7. 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. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Radinsky R. Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organspecific metastases. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12: 345-61.
8. Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. *The retinoids* 1994: 443-520.
9. Mark M, Ghyselincx NB, Chambon P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development . *Nucl Recept Signal* 2009; 7: e002.
10. 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.
11. Hogarth CA, Griswold MD. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J Clin Invest* 2010; 120: 956-62.
12. 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.
13. Collins SJ. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 346-51.
14. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 2008; 134: 921-31.
15. Lotan R. Retinoids and apoptosis: implications for cancer chemoprevention and therapy. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1655-7.
16. Hansen LA, Sigman CC, Andreola F, Ross SA, Kelloff GJ, De Luca LM. Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1271-9.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Annals of oncology* 2002; 13: 1173-84.
21. Vertree RA, Leeth A, Girouard M, Roach JD, Zwischenberger JB. Whole-body hyperthermia: a review of theory, design and application. *Perfusion* 2002; 17: 279-90.
22. Hokland SL, Pedersen M, Salomir R, Quesson B, St²dkilde-J²rgensen H, Moonen CT. MRI-guided focused ultrasound: methodology and applications. *IEEE transactions on medical imaging* 2006; 25: 723-31.

23. Day ES, Morton JG, West JL. Nanoparticles for thermal cancer therapy. *J Biomech engineering* 2009; 131: 074001.
24. Lepock JR. Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage. *International journal of hyperthermia* 2003; 19: 252-66.
25. Streffer C. Strahleneffekte nach Exposition während der pränatalen Entwicklung. *Der Radiologe* 1995; 35: 141-7.
26. Dickson JA, Shah DM. The effects of hyperthermia (42 degrees C) on the biochemistry and growth of a malignant cell line. *Eur J of cancer* 1972; 8: 561-71.
27. Christophi C, Winkworth A, Muraliharan V, Evans P. The treatment of malignancy by hyperthermia. *Surgical oncology* 1998; 7: 83-90.
28. Tajagi H, Azuma K, Tsuka T, Imagawa T, Osaki T, Okamoto Y. Antitumor effects of high-temperature hyperthermia on a glioma rat model. *Oncology Lett* 2014; 7: 1007-10.
29. T. Palomares, I. García-Alonso, R. San Isidro, J. Mendez, A. Alonso-Varona. All-trans-retinoic acid counteract the tumor-stimulating effect of hepatectomy and increases survival of rats bearing liver metastases. *J Surg Res* 2014; 188(1): 143-151.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.