

# Efecto de la hipertermia en combinación con quimioterapia sobre la proliferación de células tumorales *in vitro*

Autor:

Diego Sáenz de Urturi Indart. Facultad de Biología, Universitat de Barcelona UB.

Director:

Prof. Ignacio García-Alonso Montoya. Dpto. de Cirugía y Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina, Universidad del País vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU

Tutora:

Dra. Norma Alva Bocanegra. Dpto. de Fisiología e Inmunología. Facultad de Biología, Universitat de Barcelona UB

Máster en Fisiología Integrativa

22 de Junio de 2015, Barcelona

# Efecto de la hipertermia en combinación con quimioterapia sobre la proliferación de células tumorales in vitro

---

**Autor:** Diego Sáenz de Urturi Indart



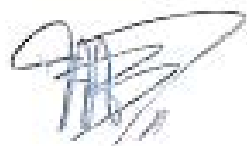
**Elaboración del Proyecto:** Departamento de Cirugía y Radiología y Medicina Física, Facultad de Medicina y Odontología. UPV/EHU. Leioa, Bilbao.

**Director:** Prof. Ignacio García-Alonso Montoya. Dpto. de Cirugía y Radiología y Medicina Física. Facultad de Medicina y Odontología, UPV/EHU.

**Tutora:** Dra. Norma Alva Bocanegra. Dpto. de Fisiología e Inmunología. Facultad de Biología, UB.

## Máster en Fisiología Integrativa

22 de Junio de 2015, Barcelona

		
<i>Firma del alumno</i> Diego Sáenz de Urturi Indart	<i>Firma del director</i> Prof. Ignacio G <sup>a</sup> -Alonso	<i>Firma de la Tutora</i> Dra. Norma Alva Bocanegra

## Resumen

**Background:** Prior to induce hyperthermia on whole animals as a therapeutic approach against liver tumors, it is necessary to check their sensitivity to hyperthermia in vitro. The use of chemotherapeutics combined to hyperthermia might have a positive effect inhibiting cell proliferation.

**Methods:** CC-531 colorectal cancer cells were exposed to 47°C for 45'. The experiment was carried out in normal cultures (RPMI + 10% FCS) and in cultures enriched with All-trans Retinoic Acid (ATRA), 5-Fluor Uracile (5-FU) or both for different periods of time.

**Results:** Following hyperthermic insult, a marked decrease in the amount of cells in the culture was observed and cell proliferation was stopped for the next 48 h; then after, the remaining cells started to proliferate again. ATRA treatment (alone or combined with 5-FU) highly decreased the proliferative rate of the cultures, while 5-FU induced a significantly lower effect. When any of the drugs were added to cultures exposed to hyperthermia, the cells were not able to restart proliferation after 48 h.

**Conclusions:** Hyperthermia has shown a great damaging capability over tumor cells in vitro, though after 48 h the surviving cells restored proliferation. Pretreatment of the cultures with chemotherapy during twenty-four hours, completely abrogated the proliferative capacity of the cells, at least for 72 h.

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>8</b>
<b>MATERIAL y MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
<b>Células y técnicas de cultivo empleadas.....</b>	<b>9</b>
<b>Recuento celular .....</b>	<b>10</b>
<b>Siembra en placas de 96 pocillos.....</b>	<b>10</b>
<b>Fármacos empleados .....</b>	<b>10</b>
All-Trans Retinoic Acid (ATRA) .....	10
5 – Fluorouracilo (5-FU) .....	11
<b>Hipertermia .....</b>	<b>11</b>
<b>Valoración de la citoviabilidad.....</b>	<b>11</b>
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>13</b>
<b>Efecto de la hipertermia sobre la proliferación celular en cultivo.....</b>	<b>13</b>
<b>Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular en cultivo.....</b>	<b>15</b>
Acido All-trans-retinoico.....	15
5-Fluor Uracilo.....	16
Acido All-trans-retinoico con 5-Fluor Uracilo.....	17
<b>Efecto de la hipertermia sobre cultivos expuestos a quimioterápicos.....</b>	<b>19</b>
Ácido All-trans-retinoico.....	19
5-Fluor Uracilo.....	20
Acido All-trans-retinoico con 5-Fluor Uracilo.....	21
<b>Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular en cultivo tratado con hipertermia.....</b>	<b>23</b>
Ácido All-trans-retinoico.....	23
5-Fluor Uracilo.....	25
All-trans-retinoico con 5-Fluor Uracilo.....	26
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>31</b>

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es la principal causa de muerte en países desarrollados y la segunda en países en vías desarrollo <sup>1</sup>. En concreto, el cáncer colorrectal (CCR) representa casi un 10% del total de cánceres, cuya incidencia va en aumento, y es el tercer cáncer más incidente en 2012 con más de un millón de nuevos casos y en Europa, para hombres y mujeres, el segundo más frecuente <sup>2</sup>.

Gran parte de los CCR son adenocarcinomas glandulares, caracterizados por su capacidad de invadir 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.

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 <sup>3,4</sup>.

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.).

Por otra parte, 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 <sup>5</sup>. 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 <sup>6-8</sup>.

Las micrometástasis, debido a sus características, son consideradas masas tumorales no resecables, que por tanto, no podrán ser tratadas mediante cirugía <sup>3,4,9-12</sup>. Esto hace que la eliminación completa de la masa tumoral tenga una menor probabilidad de éxito, lo cual aumenta el riesgo de una nueva recidiva.

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 <sup>13</sup>.

En este sentido, existen una serie de terapias dirigidas al tratamiento de tumores no resecables que pueden complementar o no la resección quirúrgica. Unas de estas terapias son la quimioterapia adyuvante <sup>14-17</sup> o quimioterapia intraarterial tras la resección de la metástasis en el hígado <sup>18-22</sup>. Entre las terapias no complementarias a la resección quirúrgica, empleadas con el fin de controlar y reducir la masa tumoral, destacan la quimioterapia neoadyuvante para metástasis hepáticas irresecables <sup>23</sup> o la ablación local <sup>24-30</sup>.

Aunque con estas terapias se muestre una reducción de la masa tumoral e incluso mejorías en la supervivencia de los pacientes, no es suficiente para acabar completamente con las células tumorales, con lo que sigue habiendo riesgo de padecer una nueva recidiva de la enfermedad.

Para hacer frente a este problema, se trabaja ensayando la administración de nuevos fármacos que impidan el crecimiento de las células tumorales con el fin de emplearse como quimioterapia adyuvante o neoadyuvante. Estos son fármacos que intervienen y regulan procesos de crecimiento celular, diferenciación y apoptosis.

Los retinoides son unos de los fármacos ensayados 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, la proliferación y la apoptosis <sup>31-37</sup>. 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 <sup>37,38</sup>.

Dentro de la familia de los retinoides destaca el ATRA (*all trans retinoic acid*). Algunos estudios *in vitro* del efecto del ATRA, han mostrado una clara reducción de la proliferación en células cancerosas. No obstante, los estudios referidos a la utilización de retinoides en el tratamiento de metástasis hepáticas son escasos <sup>39-41</sup>.

Por otra parte, uno de los fármacos más empleados para el tratamiento de la carcinogénesis colorectal es el antimetabolito 5-fluorouracilo (5-FU). Los antimetabolitos son fármacos que interfieren en procesos biosintéticos esenciales o se

incorporan a macromoléculas como DNA o RNA impidiendo su funcionamiento normal<sup>42</sup>. En este caso, el 5-FU en la célula se transforma en distintos metabolitos que finalmente altera la síntesis de RNA y la actividad de la timidilato sintasa, afectando por ende a la síntesis de DNA<sup>43</sup>.

El 5-FU ha sido empleado en un amplio rango de cánceres, incluyendo el CCR, el de mama y cánceres del tracto aerodigestivo. La combinación de 5-FU con otros quimioterápicos ha mostrado una mejora en la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, aunque es en el cáncer colorrectal en el que posee el mayor impacto. De hecho, la quimioterapia basada en 5-FU mejora la supervivencia general y libre de enfermedad de los pacientes con CCR en estadio III resecado<sup>44</sup>.

Otro enfoque terapéutico es el recurso de 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<sup>45</sup>.

Uno de los mayores problemas del tratamiento con hipertermia es la limitación técnica. Actualmente destacan dos modalidades a la hora de aplicar la hipertermia, son la hipertermia general (WBH) y las técnicas hipertérmicas locoregionales, como por ejemplo la perfusión hipertérmica de miembro aislado (HILP) o la perfusión hipertérmica peritoneal (HPP)<sup>46</sup>.

La WBH, empleada para tumores metastáticos diseminados por el organismo, eleva la temperatura corporal hasta 42°C empleando cámaras térmicas, similares a grandes incubadoras, en las que se introduce al paciente, o mantas de agua calientes.

En el caso de las técnicas hipertérmicas locoregionales, la aplicación de calor se localiza a una zona concreta de área pequeña, como tumores localizados bajo la piel o cerca de cavidades corporales, y en zonas amplias de gran área como una cavidad, un órgano o una extremidad. Así, en función de la localización y del área tratada, existirán distintas técnicas de aplicación de energía para aumentar la temperatura, que podrá ser a través de microondas, radiofrecuencia o ultrasonido<sup>45,47-50</sup>.

Tanto el tratamiento de hipertermia sistémico como el local/regional abarca tanto células tumorales como sanas, sin ningún tipo de discriminación, lo cual podría provocar efectos no deseados en el organismo en lugar de únicamente en el tumor. Una alternativa ante este problema es conseguir una aplicación de energía más

focalizada, de modo que las únicas células que sufrieran el tratamiento por hipertermia fuesen las cancerosas, reduciendo así el daño generado en el tejido sano.

Algunas investigaciones prometedoras proponen como alternativa el empleo de nanopartículas magnéticas unidas a un marcador característico del tumor. De esta manera, las nanopartículas se acumularían en el tumor en mayor medida y podría localizarse la aplicación de la hipertermia distinguiendo entre células tumorales y sanas. La investigación de Echevarria-Uraga *et al* es un ejemplo claro del empleo de estas nanopartículas. La sobreexpresión en las células tumorales de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  permite el uso del tripéptido RGD (arginina-glicina-aspartato, su ligando natural) para direccionar las nanopartículas sobre las células tumorales y aplicar la hipertermia principalmente sobre ellas <sup>51</sup>.

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 alteraciones en la membrana celular, metabolismo, núcleo y estructuras del citoesqueleto, síntesis de macromoléculas, expresión de genes de shock térmico y transducción intracelular de señales <sup>52</sup>. Sin embargo, se cree que la desnaturalización proteica y los daños en la membrana son los principales responsables del efecto citotóxico de la hipertermia <sup>53-55</sup>.

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 <sup>56,57</sup>. 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 ocurrir 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 <sup>58</sup>.

Estudios realizados con líneas celulares tumorales expuestas a distintas temperaturas entre 41 y 47° C mostraron curvas de supervivencia con una relación dosis dependiente entre la temperatura aplicada y la muerte celular. En las curvas de supervivencia pudo observarse un “hombro” al inicio del tratamiento que muestra un proceso de muerte celular de dos pasos. Esto estaba marcado por una parada lineal en el crecimiento celular al inicio del tratamiento térmico (lo cual refleja un daño reversible y no letal), seguido de una muerte celular exponencial. El cambio repentino en la supervivencia celular se debía a la dosis de energía térmica administrada en

función del tiempo (para cada temperatura), que al inicio de la muerte celular exponencial coincidía con la energía térmica necesaria para la desnaturalización proteica. Se demostró así que uno de los principales factores que contribuyen a la muerte celular por hipertermia era la desnaturalización de proteínas tanto citoplasmáticas como de membrana <sup>46</sup>.

Por otro lado, la membrana celular también se ve modificada por el efecto de la hipertermia. Las alteraciones de las propiedades de la membrana más destacables son el aumento en la fluidez de la membrana además de la desnaturalización de las proteínas de membrana mencionada anteriormente <sup>59</sup>.

Aunque el efecto citotóxico de la hipertermia está comprobado, no es lo suficientemente eficaz como para sustituir a cualquiera de los tratamientos que se emplean actualmente. Por ello, el interés del empleo de la hipertermia es como terapia coadyuvante gracias a sus efectos de sensibilización sobre las células a la quimioterapia.

La interacción entre el calor y fármacos quimioterapéuticos puede tener efectos sinérgicos que produzcan un mayor efecto citotóxico sobre las células como en el caso de los agentes alquilantes, compuestos de platino o incluso la doxorubicina. Otros fármacos ya conocidos como la lidocaína o el antifúngico anfotericina B son compuestos denominados “termosensibilizadores”, que actúan de forma citotóxica únicamente a altas temperaturas.

Sin embargo, es de destacar que en algunos casos como con la mayoría de los antimetabolitos, *alcaloides vinca* y taxanos, el efecto citotóxico es independiente a la temperatura, por lo que no habrá efecto sinérgico. Incluso hay fármacos que pierden su estructura molecular con la temperatura y que por tanto no puedan ser combinados con calor <sup>60-63</sup>.



## OBJETIVOS

1. Analizar el efecto de la exposición a hipertermia sobre el crecimiento de las células de adenocarcinoma de colon CC-531.
2. Valorar el efecto de la hipertermia sobre la eficacia del tratamiento con quimioterapia de primera línea *in vitro*.
3. Estudiar si los tratamientos con quimioterapia de primera línea *in vitro* condicionan la efectividad de la hipertermia para frenar la proliferación celular.

# MATERIAL y MÉTODOS

## Células y técnicas de cultivo empleadas

Los experimentos in vitro realizados durante el proyecto 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 Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

La línea celular de cáncer de colon utilizada (CC-531) se adquirió de Cell Line Service, y corresponde a pase 21.

Ya en nuestro laboratorio, con el fin de disponer de suficientes alícuotas de idéntico pase para los experimentos, se amplificó la línea hasta pase 26, y se prepararon suspensiones celulares de 106 células/ml en suero bobino fetal (SBF) + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), que se almacenaron en N<sub>2</sub> en crioviales de 1 ml.

Para la expansión celular los crioviales se descongelaron y atemperaron rápidamente en un baño caliente a 37°C. Una vez descongelada, la suspensión celular se sembró en un frasco de cultivo T-25 (Tissue Culture Flasks; Orange Scientific, 5510100) al cual se añadió 3 ml de medio RPMI (RPMI-1640; Gibco, 52400-025) complementado con penicilina (100 U.I./ml), estreptomina (100 mg/ml) y anfotericina B (25 µg/ml) (Calbiochem, Germany; 516104) y 1 ml de SBF.

El cultivo celular se mantuvo a 37°C, en un incubador (Sanyo; MCO-19AI C UV) con atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub>. Al cabo de 4-6 horas de cultivo, una vez que las células se encontraban adheridas, se retiró el medio de cultivo y se añadió 5 ml de medio nuevo (RPMI + 10% SBF), devolviéndolo al incubador.

Alcanzada la confluencia en el frasco de cultivo T-25, se procedió a resembrarlo en un frasco de cultivo T-75 (Cell Culture Rasks, Corning, 430641). Para ello, se retiró el medio de cultivo en el frasco T-25 y se lavaron las células con 3 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Sigma, P-3813). A continuación, se añadieron 3 ml de Tris-EDTA (0,05% Trypsin-EDTA 1X; Gibco, 25300), dejándose de nuevo en el incubador durante 3-4 minutos. Pasado este tiempo, la suspensión de células se recogió en un tubo cónico de 15 ml con 2 ml de SBF.

La suspensión celular obtenida se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 5 minutos a 7°C en una centrifugadora refrigerada (Biofuge Primo, ThermoScientific). Una vez centrifugado, se retiró el sobrenadante y el pellet celular obtenido se resuspendió en 7 ml de RPMI. Los 7ml de suspensión celular se sembraron en el frasco de cultivo T-75,

al que se le añadió medio RPMI con 10% de SBF hasta alcanzar un volumen final de 15 ml.

Finalmente, las células sembradas en el frasco de cultivo T-75, una vez que alcanzaban la confluencia se emplearon para llevar a cabo los experimentos.

### **Recuento celular**

Para el recuento celular se empleó el Nucleo Counter NC-100 (ChemoMetec; Dinamarca). Se tomaron dos fracciones alícuotas de 100  $\mu$ l de la suspensión celular. A una de ellas se le añadió el buffer de lisis y seguidamente el buffer estabilizante. La otra no se trató con ninguno de los buffer.

Empleando los casetes propios del equipo (NucleoCassette; Chemometec), se cargaron 60  $\mu$ l de las muestras para medir el número de células presentes en el medio. Con la fracción sin tratar, se determinó el número de células no viables de la suspensión; y con la suspensión lisada se determinó el número total de células presente en la suspensión.

Mediante el software de análisis del equipo (NucleoView), se calculó la viabilidad del cultivo y la concentración celular.

### **Siembra en placas de 96 pocillos**

A partir de las células crecidas en los frascos T-75, se obtuvo una suspensión celular en la que se determinó la concentración celular.

Para la siembra de las placas de 96 pocillos (96 Well Cell Culture Cluster; Corning), se preparó una suspensión celular de 25.000 células/ml, a partir de la suspensión inicial, de la que se sembraron 100  $\mu$ l en cada pocillo (2.500 células/pocillo).

### **Fármacos empleados**

#### **Ácido All-trans-retinoico (ATRA)**

Para los experimentos con ATRA (Sigma, R-2625) de este proyecto se preparó una solución stock de  $10^{-2}$  M, para lo cual se pesaron 0,003 g de ATRA que se disolvieron en 10 ml de etanol absoluto (100°). Este stock se almacenó a  $-21^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

El tratamiento con ATRA se realizó tras 48 horas de crecimiento de las células. Para ello, se retiró el medio de cultivo a cada pocillo y se añadió medio nuevo (RPMI + 10% de SBF) con ATRA 10  $\mu$ M, dejándose actuar durante 24 horas antes de la hipertermia.

## 5 – Fluor Uracilo (5-FU)

Para los experimentos con 5-FU (Sigma, F6627-5G) de este proyecto se preparó una solución stock de 0,25 mg/ml, para lo cual se pesaron 0,0025 g de 5-FU que se disolvieron en 10 ml de RPMI. Este stock se almacenó a -21°C hasta su utilización.

El tratamiento con 5-FU se realizó tras 48 horas de crecimiento celular. Para ello, se retiró el medio de cultivo a cada pocillo y se añadió medio nuevo (RPMI + 10% de SBF) con 5-FU 0,25 µg/ml, dejándose actuar durante 24 horas antes de la hipertermia.

## Hipertermia

Los cultivos fueron sometidos a hipertermia 24, 48 y 72 horas después de la adición de los distintos citotóxicos. Para lo cual se pasaron a un incubador a 47°C, atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> durante 45 minutos, estas condiciones se eligieron por experimentos realizados en trabajos previos<sup>64</sup>. Una vez transcurrido este tiempo se devolvieron a las condiciones de cultivo habituales.

## Valoración de la citoviabilidad

Una vez tratados los cultivos de las placas de 96 pocillos, la determinación de la supervivencia celular se realizó mediante el Test Mitocondrial del Tetrazolio (MTT).

La adición del tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-dipheniltetrazolium), sustrato del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, hace que sea metabolizado y transformado en formazán, relacionándose la concentración de éste con el número de células metabólicamente activas presentes en el cultivo.

Para el empleo del tetrazolio (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; Sigma, M2128-1G) se preparó una solución stock en la que se disolvieron 100 mg en 20 ml de PBS. Tras disolver el tetrazolio, se esterilizó la solución con un filtro de poro de 0,2 µm (Orange Scientific). El stock de tetrazolio se almacenó a 4°C hasta su empleo.

Se añadieron 10 µl de tetrazolio por cada pocillo y se dejó incubar durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridas las 2 horas, se retiró el medio de cultivo, se añadieron 100 µl de DMSO (MERK, 1.02952.1000) a cada pocillo para lisar las células y disolver los cristales de formazán producidos y se realizó una medida de la absorbancia a 540 nm en el lector de placas Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific).

La determinación de la citoviabilidad se realizó 0, 24, 48 y 72 horas tras la aplicación de hipertermia.

## Análisis estadístico

Las cifras de absorbancia obtenidas tras la lectura de las placas de 96 pocillos se han descrito mediante la media y la desviación estándar, y se han ilustrado con un gráfico de líneas. La comparación de las medias se ha realizado mediante un análisis de la varianza (ANOVA). En los casos en que se haya constatado diferencias estadísticamente significativas, se ha añadido un análisis Newman Keuls.

Todos los análisis se han realizado con el programa GraphPad Prism 6, aceptando un nivel mínimo de significación  $p < 0,05$ .

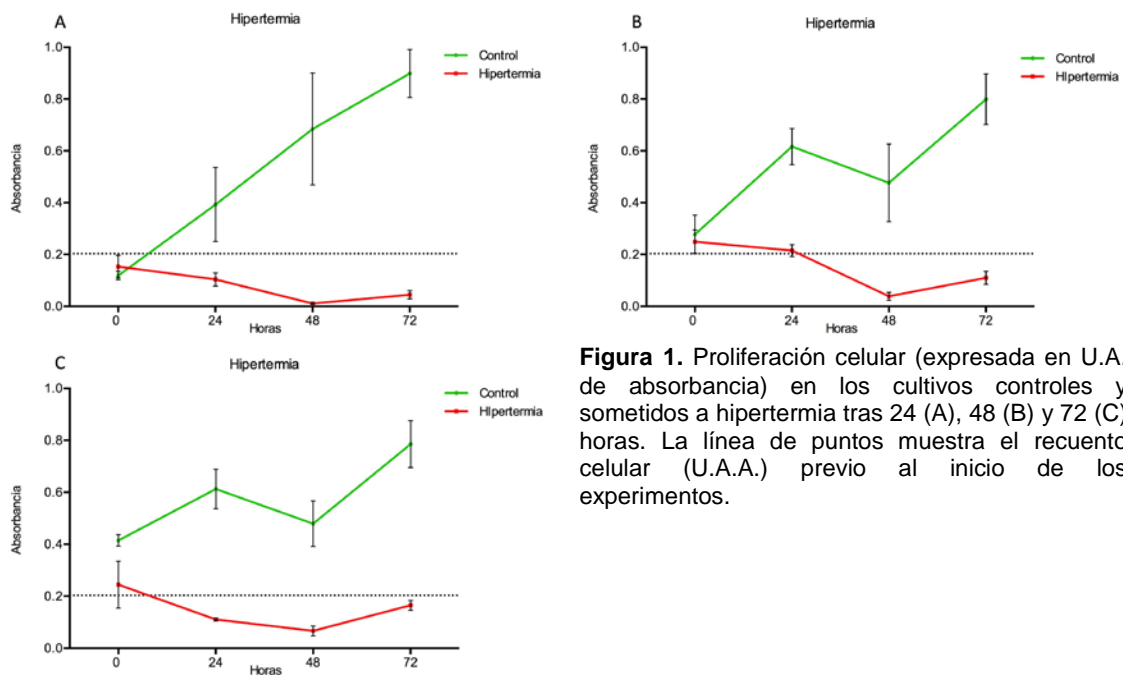
## RESULTADOS

Vamos a exponer secuencialmente los resultados de nuestro trabajo. En un primer apartado se recogen los efectos que la exposición durante 45 minutos a 47°C produce sobre los cultivos de las células CC-531. A continuación se exponen los resultados obtenidos al tratar los cultivos con los dos quimioterápicos descritos en el epígrafe anterior. En el tercer apartado se analiza el efecto de la hipertermia sobre cultivos expuestos a quimioterápicos. Y, por último, en el cuarto apartado analizamos el efecto de los quimioterápicos sobre cultivos expuestos a hipertermia.

### Efecto de la hipertermia sobre la proliferación celular en cultivo

Se ha estudiado el efecto de la hipertermia sobre la proliferación de células tumorales en condiciones normales de cultivo. Para ello, se han realizado tres réplicas de un experimento en el que tras someter a hipertermia a los cultivos celulares se midió su viabilidad celular a distintos tiempos: 24, 48 y 72 horas. Cada uno de estos experimentos se realizó sobre placas que llevaban diferentes tiempos de crecimiento 72, 96 y 120 horas (contado a partir de la siembra de las células

Como puede apreciarse en la figura 1, en los tres casos, la exposición de las células a 45 minutos de hipertermia (47°C) originó un importante declive en la curva de crecimiento, con disminución progresiva del número de células en el cultivo durante las primeras 48 horas subsiguientes; de tal manera que en ninguna de las tres experiencias pudo recuperarse el nivel de los controles, transcurridas 72 horas.



**Figura 1.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) en los cultivos controles y sometidos a hipertermia tras 24 (A), 48 (B) y 72 (C) horas. La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

El efecto de la hipertermia sobre los cultivos no es una simple destrucción directa de células por el factor temperatura, sino que células que han sobrevivido las primeras 24 horas posteriores a la hipertermia siguen muriendo (tal como demuestra la progresiva disminución de valores absolutos de células en el cultivo).

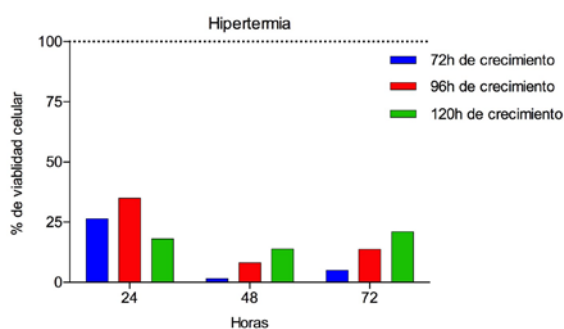
Hay que destacar, con todo, que las pocas células que sobreviven a las 48 horas, mantienen su capacidad proliferativa, tal como se puede ver por el repunte en las gráficas de la figura 1.

Si en lugar de observar el comportamiento de las células en valores absolutos de absorbancia (que representan en relación directa el número de células en el cultivo) nos fijamos en la pendiente de la curva, podemos apreciar que ni siquiera durante las últimas 24 horas del estudio se puede observar una recuperación de la tasa de crecimiento que se aproxime a una situación normal. En la tabla 1 recogemos la pendiente en grados de la curva de los cultivos en las últimas 24 horas.

**Tabla 1.** Pendiente de las gráficas de cultivos en las últimas 24 horas de la experiencia (calculada en grados)

Tiempo previo de cultivo	Control	Hipertermia
24 horas	41,7	8,1
48 horas	53,3	16,5
72 horas	51,9	22,3
<b>Media</b>	<b>48,97</b>	<b>15,63</b>

Por último, expresamos el recuento de células en los cultivos sometidos a hipertermia como porcentaje del correspondiente valor en su cultivo control, vemos que el comportamiento ha sido muy similar en las tres experiencias realizadas, lo que refuerza la significación de nuestros hallazgos (fig. 2).



**Figura 2.** Recuento celular expresado como porcentaje respecto a un control en los cultivos tratados con ATRA (A), 5-FU (B) y ATRA + 5-FU (C).

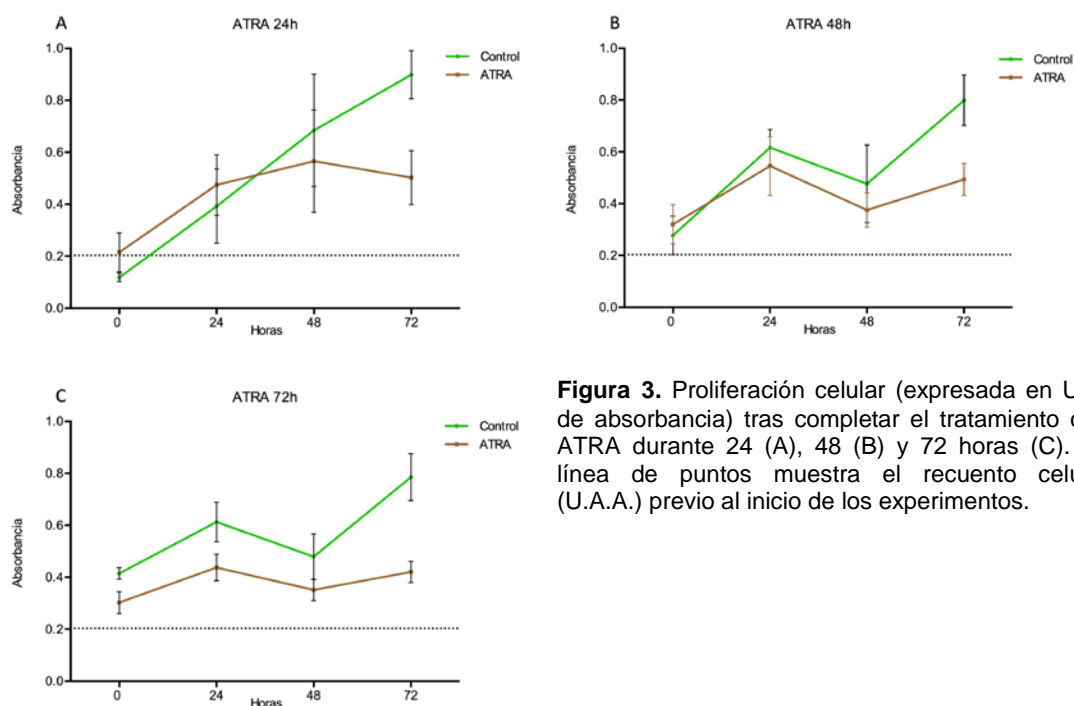
## Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular en cultivo

En este apartado se presentan los resultados del estudio realizado para valorar el efecto que la adición de quimioterápicos a los cultivos ejerce sobre la proliferación de las células tumorales. En primer lugar, se recoge el estudio llevado a cabo con ATRA, luego el realizado con 5-FU, y por último el que combina ambos fármacos.

### Acido All-trans-retinoico

Tal y como se observa en la figura 3, la adición de ATRA 10  $\mu\text{M}$  al cultivo ha tenido un significativo efecto frenador sobre la proliferación de las células.

La exposición de las células en cultivo al ATRA durante 24 horas (fig. 3A) condicionó negativamente a las células, ya que a partir de las 24 horas tras haber suspendido el tratamiento se desploma la curva de proliferación, siendo ya la diferencia en el recuento celular significativamente inferior a las 48 horas ( $0,684 \pm 0,22$  vs  $0,57 \pm 0,20$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con ATRA durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

En el experimento realizado con 48 horas de exposición del cultivo al ATRA (fig. 3B) se aprecia un comportamiento anómalo de los cultivos, ya que tanto el control como el tratado presentan un declive en el recuento celular entre las 24 y 48 horas. Sin embargo, también en esta experiencia se constata el efecto inhibitorio del ATRA, con una reducción importante a las 48 horas que se amplía a las 72 horas, quedando los cultivos tratados en valores inferiores al 50% de los controles ( $0,80 \pm 0,1$  vs  $0,49 \pm$



0,06;  $p < 0,01$ ). En este caso, a diferencia de lo observado en el experimento detallado en el párrafo anterior, tras el valle de las 48 horas, los cultivos que habían estado expuestos al ATRA durante 48 horas volvieron a experimentar un crecimiento neto; si bien la pendiente es menor que en los controles.

Por último, en los cultivos expuesto al ATRA durante 72 horas, se puede apreciar (fig. 3C) un comportamiento casi paralelo al control, pero reducido en aproximadamente un 25%. Así, en cada uno de los cuatro momentos del estudio se observa un recuento celular (absorbancia) significativamente menor que en los controles (tabla 2).

Tabla 2. Valores absolutos y relativos de los cultivos controles y expuestos al ATRA durante 72 h.

	0 h	24 h	48 h	72 h	
Control	0,415	0,6123	0,479	0,785	
ATRA	Valor absoluto	0,302	0,437	0,351	0,421
	% del control	72,9 %	71,4 %	73,3 %	53,5 %
<i>Significación estadística: p &lt;</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>	

### 5-Fluor Uracilo

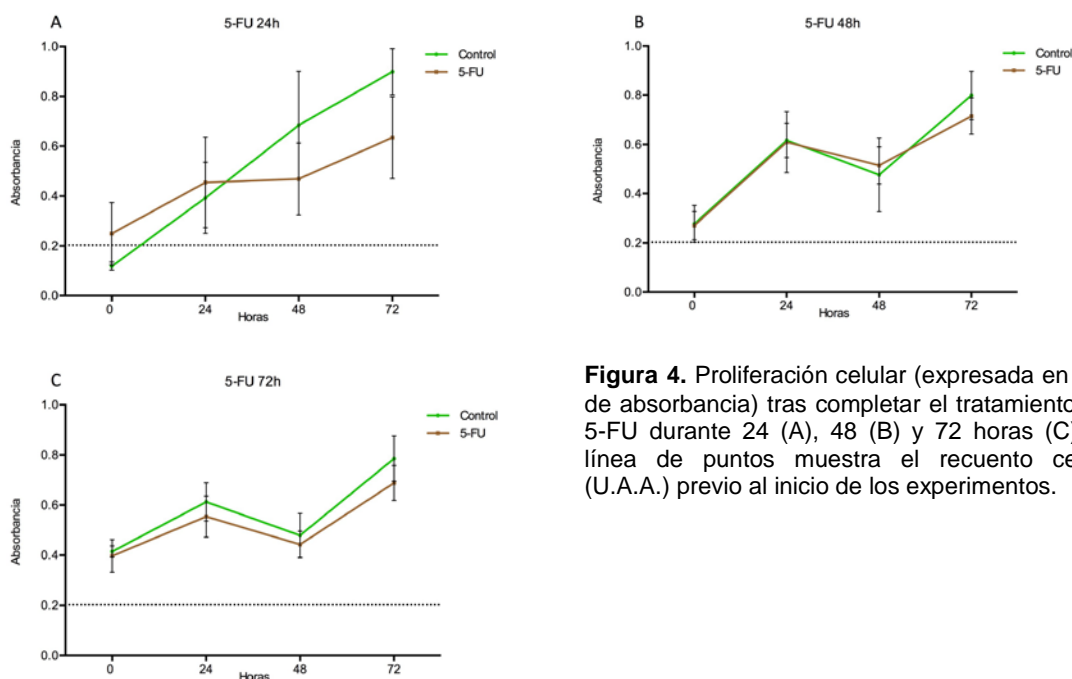
El segundo grupo dentro de este apartado se ocupa de la experiencia llevada a cabo para valorar el efecto producido por la adición de 5-FU 0,25  $\mu\text{g/ml}$  a nuestros cultivos. Como en el apartado anterior, hemos considerado tres experiencias, según la exposición al fármaco haya durado uno, dos o tres días.

En general, el efecto antiproliferativo ha sido menos marcado que con el ATRA, y lo que es más llamativo, solo ha sido realmente significativo con la menor exposición al fármaco (fig. 4).

Así, en los cultivos expuestos durante tan sólo 24 horas (fig. 4A), se ha producido un efecto meseta entre las 24 y 48 horas, durante las cuales la proliferación celular ha estado detenida ( $0,454 \pm 0,18$  vs  $0,468 \pm 0,14$ ;  $p > 0,05$ ). De tal manera que al final de dicho periodo la absorbancia en los tratados se situaba a un 70% de la de los controles ( $0,684 \pm 0,22$  vs  $0,468 \pm 0,14$ ;  $p < 0,001$ ). La diferencia fue todavía mayor en números absolutos al finalizar el experimento, si bien calculada como porcentaje respecto al control siguió en torno a ese 70% ( $0,898 \pm 0,09$  vs  $0,634 \pm 0,16$ ;  $p < 0,0001$ ).

En los cultivos tratados durante 48 horas (fig. 4B), el comportamiento de los cultivos tratados ha coincidido prácticamente con el de los controles, hasta las últimas 24 horas del experimento; momento en el cual el ritmo proliferativo ha sido ligeramente menor en los tratados ( $0,80 \pm 0,1$  vs  $0,72 \pm 0,07$ ;  $p < 0,05$ ).

Por último, en los cultivos tratados durante 72 horas (fig. 4C), el crecimiento celular sigue la misma tendencia que en los controles no tratados, aunque con valores ligeramente inferiores. Al final del experimento la diferencia fue muy parecida a la observada en los cultivos expuestos a 5-FU durante sólo 48 horas ( $0,79 \pm 0,09$  vs  $0,69 \pm 0,07$ ;  $p < 0,01$ ).



**Figura 4.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con 5-FU durante 24 (A), 48 (B) y 72 horas (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

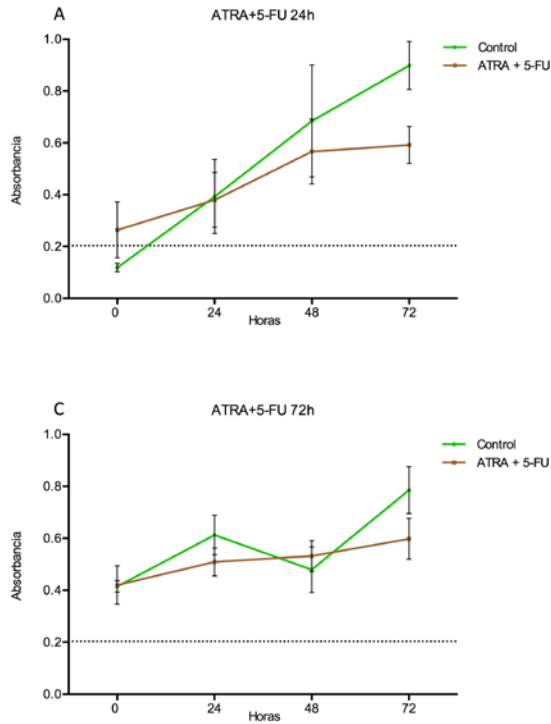
### Acido All-trans-retinoico con 5-Fluor Uracilo

Por último, abordamos la presentación de los resultados obtenidos al asociar los dos fármacos quimioterápicos en los cultivos (ATRA  $10 \mu\text{M}$  + 5-FU  $\mu\text{g/ml}$ ). En general, podría decirse que el resultado de la experiencia difiere poco de lo observado al utilizar únicamente ATRA.

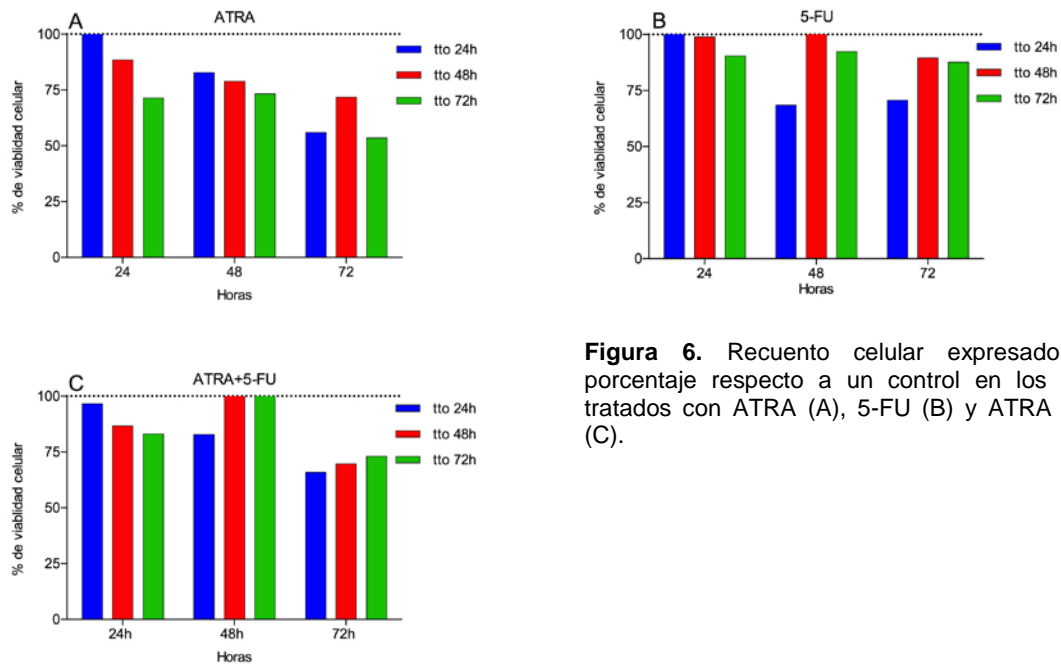
Así, en los cultivos tratados durante 24 horas, se observa inicialmente una pendiente ligeramente disminuida en los cultivos tratados, si los comparamos frente a los controles. En cambio, una vez transcurridas 48 horas, al igual que ocurría al tratar sólo con ATRA, se puede apreciar un aplanamiento de la curva (fig. 5A). De tal manera, que al finalizar el experimento en los cultivos tratados se recogen unos niveles medios de absorbancia que se quedan a un 66% del valor medio de los controles ( $0,90 \pm 0,09$  vs  $0,59 \pm 0,07$ ;  $p < 0,001$ ).

En el caso de los tratamientos durante 48 y 72 horas, al igual que comentamos en los ensayos con ATRA, se observa un valle inesperado a las 48 horas de experiencia (fig. 5B). Y de nuevo, en las últimas 24 horas, los controles retoman la proliferación a un ritmo normal, mientras que los cultivos tratados lo hacen de manera muy escasa

(tratados 72 horas) o nula (tratados 48 horas). De tal manera que al terminar la experiencia, los cultivos tratados muestran una reducción del 75% en los primeros ( $0,79 \pm 0,009$  vs  $0,598 \pm 0,08$ ;  $p < 0,0001$ ) y del 70% en los segundos ( $0,80 \pm 0,1$  vs  $0,56 \pm 0,08$ ;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 5.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con ATRA y 5-FU, durante 24 horas (A), 48 horas (B) y 72 horas (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.



**Figura 6.** Recuento celular expresado como porcentaje respecto a un control en los cultivos tratados con ATRA (A), 5-FU (B) y ATRA + 5-FU (C).

Finalmente, al representar el número de células viables de los cultivos tratados con los quimioterápicos como porcentaje con respecto al valor correspondiente en el cultivo control (fig. 6), se observa de forma más clara el efecto antiproliferativo de los fármacos estudiados.

Se confirma además el efecto antiproliferativo leve mencionado anteriormente para el 5-FU (fig. 5B), apenas alterando la diferencia entre el cultivo tratado y el control. En los casos de ATRA y la combinación de ATRA y 5-FU, se observa un mayor efecto de ambos tratamientos principalmente con el tratamiento durante 24 horas, confirmando lo observado anteriormente en las curvas de crecimiento.

### **Efecto de la hipertermia sobre cultivos expuestos a quimioterápicos**

A continuación se muestran los resultados de las experiencias llevadas a cabo para conocer el efecto que el tratamiento con hipertermia tiene sobre cultivos celulares sometidos a los dos agentes quimioterapéuticos utilizados, ATRA y 5-FU y a ambos juntos.

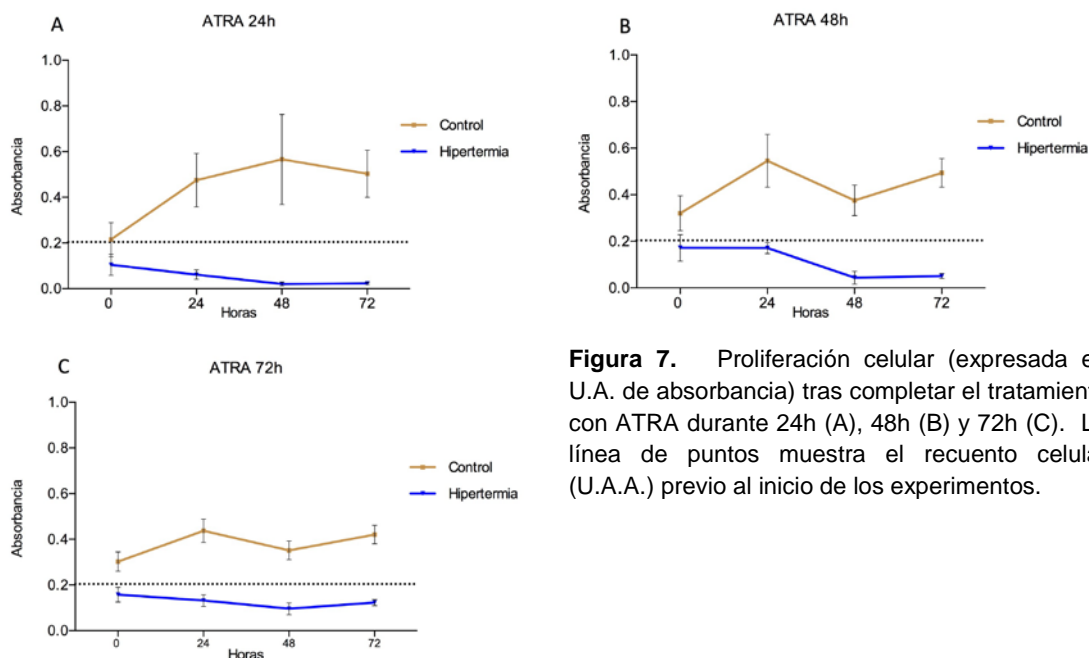
#### **Ácido All-trans-retinoico**

La exposición a hipertermia de los cultivos tratados con ATRA 10  $\mu$ M tiene un claro efecto sobre la viabilidad celular.

Tras una exposición al ATRA durante 24 horas (fig. 7A), se observa que los cultivos sometidos a hipertermia sufrieron una reducción significativa de la viabilidad celular inmediatamente después de la finalización del insulto térmico ( $0,104 \pm 0,04$  v.  $0,215 \pm 0,07$ ;  $p < 0,01$ ). Esta reducción continúa hasta las 48 horas, alzando el mínimo valor de absorbancia recogido ( $0,02 \pm 0,008$  vs  $0,566 \pm 0,19$ ;  $p < 0,0001$ ).

En el experimento realizado con 48 horas de exposición al ATRA (fig. 7B) vuelve a haber un comportamiento inadecuado de los cultivos, ya que en ambas condiciones, sometidos a hipertermia o no, el número de células en el cultivo se reduce entre las 24 y las 48 horas. A pesar de esto, también se observan claras diferencias entre ambos grupos desde el momento inmediatamente posterior al insulto térmico, siendo la absorbancia medida en los cultivos sometidos a hipertermia casi un 50% inferior a la de los cultivos no sometidos ( $0,171 \pm 0,05$  vs  $0,32 \pm 0,07$ ;  $p < 0,001$ ). Entre las 0 y las 24 horas después del shock térmico, los cultivos expuestos a la temperatura muestran una detención de su crecimiento, siendo los valores obtenidos en este tiempo ya muy inferiores a los cultivos sometidos únicamente al ATRA (30%). Como ocurre en el experimento anterior, 48 después de la hipertermia se alcanzan los mínimos valores

de absorbancia registrados ( $0,04 \pm 0,02$ ). 24 horas después, los cultivos expuestos a hipertermia registran similares valores ( $0,05 \pm 0,01$ ), sin embargo el control experimenta un incremento en la proliferación celular ( $0,0493 \pm 0,06$ ) ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 7.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con ATRA durante 24h (A), 48h (B) y 72h (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

En último lugar (fig. 7C), en los cultivos expuestos durante 72 horas al ATRA, la exposición al insulto térmico, redujo a la mitad el recuento celular ( $0,157 \pm 0,03$  vs.  $0,302 \pm 0,04$ ;  $p < 0,0001$ ). El número de células en los cultivos sometidos a hipertermia se mantuvo constante hasta el fin del experimento a las 72 horas, siendo de media un 75 % inferior a la viabilidad del tratamiento con ATRA  $10 \mu\text{M}$  durante 72 horas.

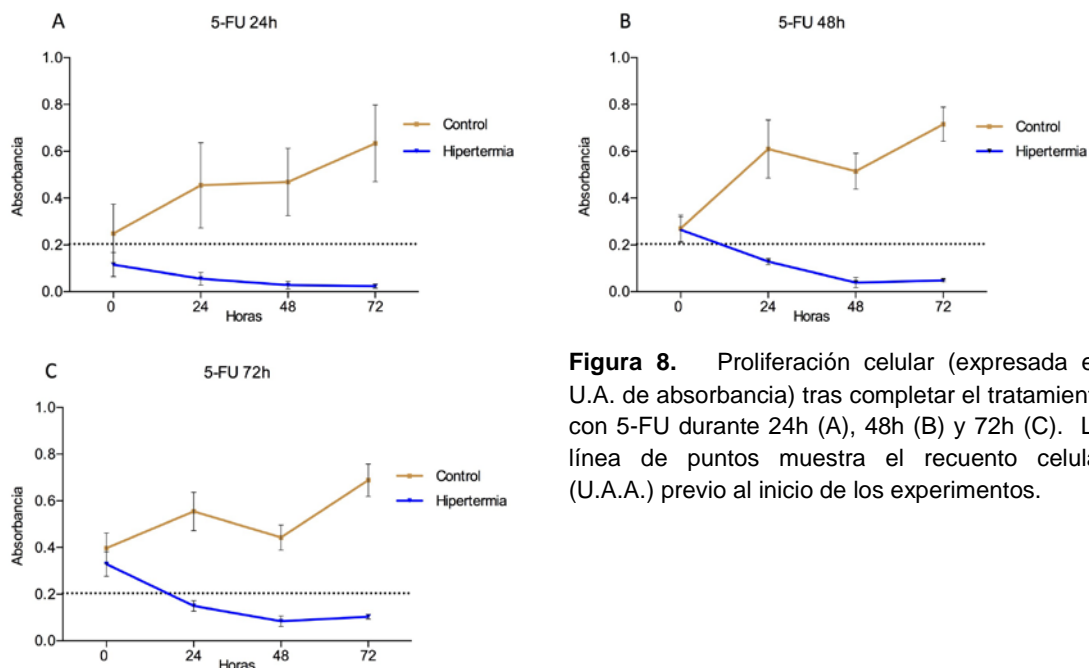
### 5-Fluor Uracilo

Los cultivos tratados con 5-FU ( $0,25 \mu\text{g/ml}$ ) e hipertermia sufren una marcada reducción en el número de células tras 24, 48 y 72 horas de exposición al tóxico.

Tras la exposición durante 24 horas (fig. 8A), se observan diferencias en los cultivos sometidos a hipertermia inmediatamente después del insulto térmico ( $0,111 \pm 0,05$  vs  $0,249 \pm 0,12$ ;  $p < 0,01$ ). Los cultivos sometidos a hipertermia muestran una reducción lineal en el recuento celular, llegando a las 72 horas a unos valores de absorbancia de  $0,02 \pm 0,008$  vs  $0,634 \pm 0,16$  ( $p < 0,0001$ ).

En los cultivos expuestos durante 48 horas al 5-FU (fig. 8B), los efectos de la hipertermia tardan 24 horas en aparecer ( $0,13 \pm 0,01$  vs  $0,609 \pm 0,12$ ;  $p < 0,0001$ ), observándose el máximo efecto sobre los cultivos a las 48 horas, cuando prácticamente no quedan células ( $0,03 \pm 0,02$  vs  $0,514 \pm 0,07$ ;  $p < 0,0001$ ). En las

siguientes 24 horas, se observa un incremento en los cultivos control ( $0,715 \pm 0,07$ ), algo que no sucede en los además a hipertermia, ( $0,04 \pm 0,004$ ;  $p < 0,0001$ ).



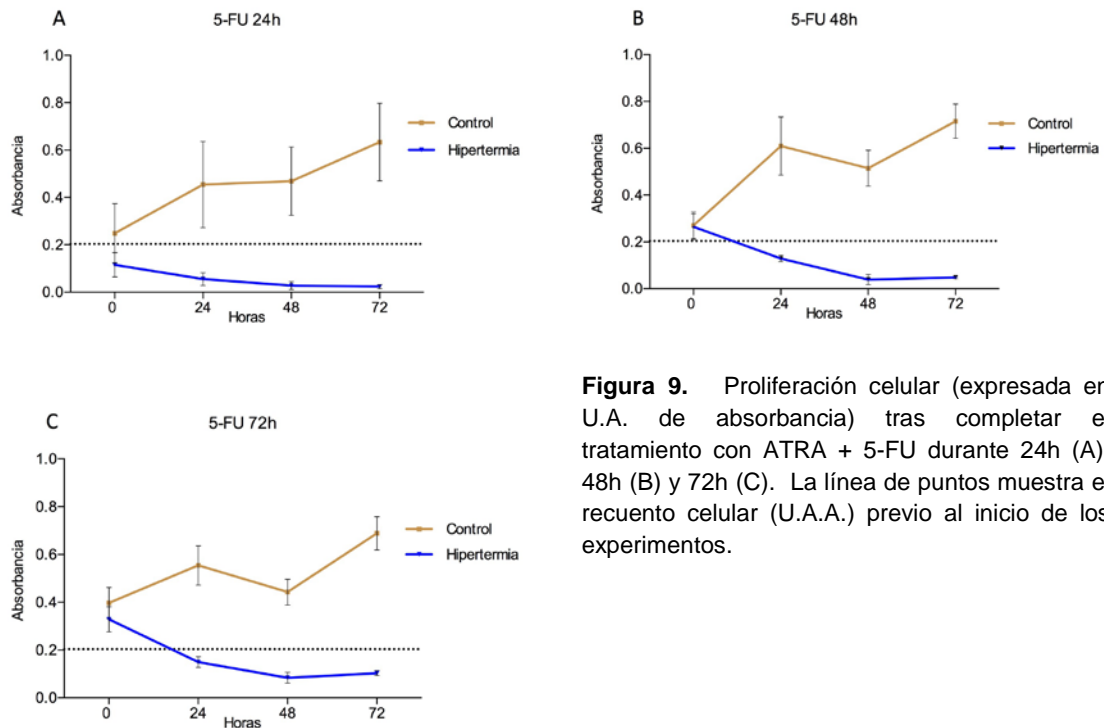
**Figura 8.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con 5-FU durante 24h (A), 48h (B) y 72h (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

Por último, con 72 horas de exposición al 5-FU (fig. 7C), no se observa un efecto inmediato de la hipertermia frente a los cultivos expuestos solamente al fármaco ( $0,33 \pm 0,05$  vs  $0,39 \pm 0,07$ ). A las 24 horas, en cambio, sí que hay un efecto claro de la hipertermia ( $0,149 \pm 0,02$  vs  $0,554 \pm 0,08$ ;  $p < 0,0001$ ). Al igual que en el experimento anterior, 48 horas después del shock térmico hay un comportamiento anómalo de los cultivos. Sin embargo, cabe destacar que a las 72 horas en los cultivos control hay un repunte del 40% de la absorbancia medida ( $0,688 \pm 0,06$ ), algo que no ocurre en los cultivos expuestos a hipertermia ( $0,103 \pm 0,01$ ;  $p < 0,0001$ ).

### Acido All-trans-retinoico con 5-Fluor Uracilo

Por último, en éste apartado, se analizan los efectos de la exposición combinada de cultivos tratados con ATRA  $10 \mu\text{M}$  y 5-FU  $0,25 \mu\text{g/ml}$  con la exposición a  $47^\circ\text{C}$  (fig. 9).

Tras una exposición durante 24 horas a ambos tóxicos (fig. 9A), los cultivos sometidos a hipertermia mostraron, inmediatamente después, una disminución significativa del número de células ( $0,108 \pm 0,04$  vs  $0,264 \pm 0,107$ ;  $p < 0,0001$ ), alcanzándose el mayor efecto sobre el recuento celular a las 24 horas y manteniéndose en el tiempo a las 48 y 72 horas ( $0,032 \pm 0,01$ ;  $0,0312 \pm 0,014$ ;  $0,026 \pm 0,011$ , respectivamente). El recuento celular se redujo un 90%, 95% y 97% respectivamente.



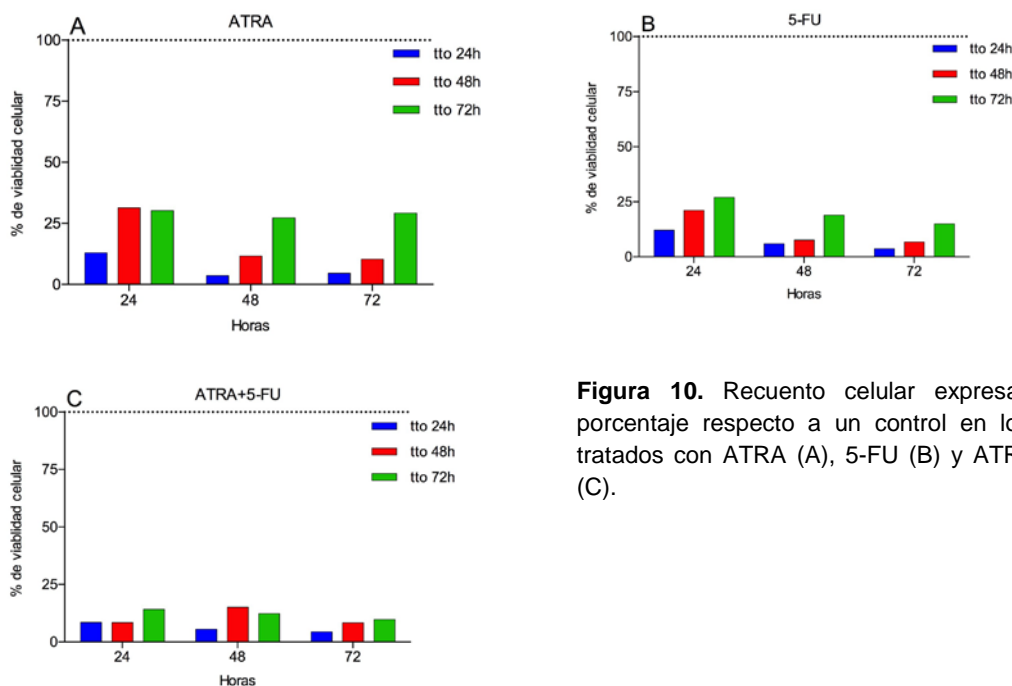
**Figura 9.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con ATRA + 5-FU durante 24h (A), 48h (B) y 72h (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

La aplicación de hipertermia a cultivos suplementados con ambos quimioterápicos durante 48 horas (fig. 9B) hace disminuir el recuento celular en el momento inmediatamente posterior a la aplicación de la hipertermia ( $0,245 \pm 0,05$  vs  $0,415 \pm 0,09$ ;  $p < 0,0001$ ). 24 horas después, los valores de absorbancia disminuyen drásticamente en los cultivos expuesto a  $47^{\circ}\text{C}$  pero no en el control ( $0,04 \pm 0,01$  vs  $0,535 \pm 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ). A las 48 de la hipertermia, hay un aumento en la viabilidad de los cultivos sometidos al insulto térmico. Sin embargo este incremento es claramente menor que el experimentado por los cultivos control ( $0,09 \pm 0,03$  vs  $0,6 \pm 0,12$ ;  $p < 0,0001$ ). A las 72 horas, ambos sufren un descenso de los valores de absorbancia siendo significativamente menores en los cultivos que recibieron la hipertermia ( $0,046 \pm 0,006$  vs  $0,557 \pm 0,08$ ;  $p < 0,0001$ ).

Por último, los cultivos expuestos 72 horas al 5-FU y ATRA y posteriormente a hipertermia sufrieron una reducción significativa en la viabilidad celular a partir de las 0 horas (60%), manteniéndose a las 24 (86%), 48 (88%) y 72 horas (91%) (fig. 9C).

Finalmente, al representar el recuento celular de los cultivos tratados con los fármacos e hipertermia como porcentaje de viabilidad respecto al control, se observa claramente que la hipertermia potencia el efecto citotóxico de los fármacos, reduciendo la viabilidad del cultivo. Podemos ver que el tratamiento combinado de ATRA e hipertermia (fig. 10A) y 5-FU e hipertermia (fig. 10B) tienen efectos similares sobre los cultivos 24, 48 y 72 horas después de la hipertermia. La aplicación de hipertermia a

cultivos tratados con ambos fármacos tiene mayores efectos sobre la viabilidad celular que los expuestos a cada tóxico e hipertermia por separado (fig. 10C)



**Figura 10.** Recuento celular expresado como porcentaje respecto a un control en los cultivos tratados con ATRA (A), 5-FU (B) y ATRA + 5-FU (C).

## Efecto de la quimioterapia sobre la proliferación celular en cultivo tratado con hipertermia

Por último, en este apartado se analizará el efecto combinado de la hipertermia junto con la quimioterapia sobre la proliferación celular en cultivo. Las células tratadas con ATRA 10  $\mu$ M, 5-FU 0,25  $\mu$ g/ml o la combinación de ambas durante distintos periodos de tiempo, se sometieron a hipertermia y se midió la viabilidad celular de los cultivos a distintos tiempos tras el insulto térmico.

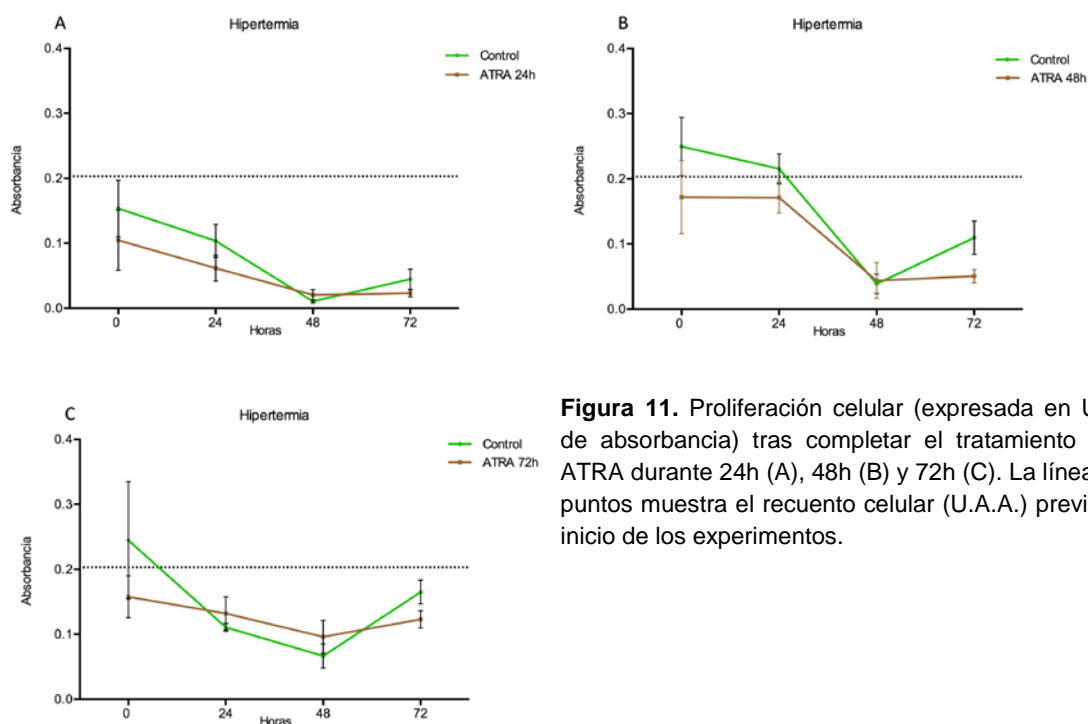
### Ácido All-trans-retinoico

La combinación del tratamiento con ATRA y la hipertermia, mostró una mayor atenuación en la proliferación de los cultivos con respecto a los tratados únicamente con hipertermia.

Los cultivos expuestos a hipertermia y tratados además con ATRA durante 24 horas (fig. 11A) muestran una de crecimiento similar al control. Se produce un descenso en el recuento de células hasta las 48 horas después de la aplicación de la hipertermia, alcanzando los valores mínimos en ambos grupos ( $0,01 \pm 0,001$  vs  $0,02 \pm 0,002$ ;  $p < 0,05$ ). 24 horas después, los cultivos control experimentan un leve repunte en el



recuento celular ( $0,04 \pm 0,005$ ), sin embargo, los cultivos tratados con ATRA permanecen estables y no experimentan variaciones en el número de células ( $0,02 \pm 0,001$ ).



**Figura 11.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con ATRA durante 24h (A), 48h (B) y 72h (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

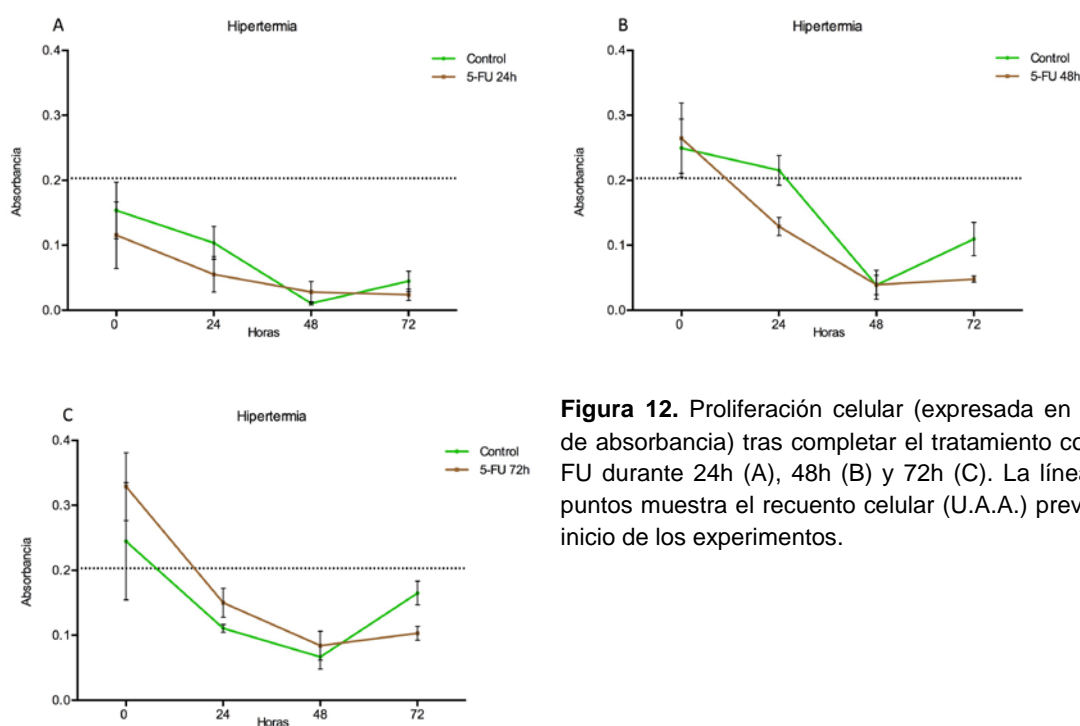
La combinación del tratamiento con ATRA durante 48 horas y la hipertermia (fig. 11B) hace disminuir la proliferación celular a las 0 y 24 horas respecto al control ( $0,171 \pm 0,021$  vs  $0,25 \pm 0,01$ ;  $p < 0,01$ ) y ( $0,171 \pm 0,007$  vs  $0,215 \pm 0,006$ ;  $p < 0,001$ ). A las 48 horas, no existen diferencias entre ambos grupos ( $0,042 \pm 0,007$  vs  $0,038 \pm 0,007$ ;  $p > 0,05$ ). Los cultivos control sufren un repunte en el crecimiento celular a las 72 horas, mientras que los tratados además con ATRA mantienen estables los valores alcanzados 24 horas antes ( $0,05 \pm 0,003$  vs  $0,109 \pm 0,008$ ;  $p < 0,0001$ ).

El tratamiento con ATRA durante 72 horas y a la aplicación del insulto térmico, hace que el recuento celular tras la aplicación de la hipertermia sea menor respecto al control no tratado con ATRA ( $0,157 \pm 0,1$  vs  $0,244 \pm 0,03$ ;  $p < 0,05$ ) (fig. 11C). Transcurridas 24, no se aprecian diferencias significativas en el recuento celular de ambos grupos. A las 48 horas de la aplicación de calor, se obtienen mayores valores de absorbancia en los cultivos tratados con ATRA e hipertermia ( $0,096 \pm 0,008$  vs  $0,067 \pm 0,007$ ;  $p < 0,05$ ). 72 horas después de la hipertermia, los cultivos sometidos a ATRA se mantienen estables mientras que el control sufrió un aumento en el recuento celular ( $0,123 \pm 0,005$  vs  $0,165 \pm 0,006$ ;  $p < 0,001$ ).

## 5-Fluor Uracilo

El tratamiento con 5-FU 0,25  $\mu\text{g/ml}$  combinado con hipertermia ha mostrado tener un menor efecto sobre la proliferación celular, tal y como se muestra en la figura 12.

Los cultivos expuestos durante 24 horas a 5-FU y a hipertermia (fig. 12A) han seguido una tendencia similar al control, aunque con diferencias estadísticamente significativas a las 24 ( $0,055 \pm 0,009$  vs  $0,103 \pm 0,008$ ;  $p < 0,01$ ) y 72 horas ( $0,023 \pm 0,002$  vs  $0,045 \pm 0,005$ ;  $p < 0,001$ ). Ambos sufren una disminución del número de células durante las 48 primeras hora. Las últimas 24 horas muestran una recuperación del control, así, a las cultivo con 5-FU presenta un 52% menos de viabilidad que el control ( $0,023 \pm 0,002$  vs  $0,044 \pm 0,005$ ;  $p < 0,001$ ).



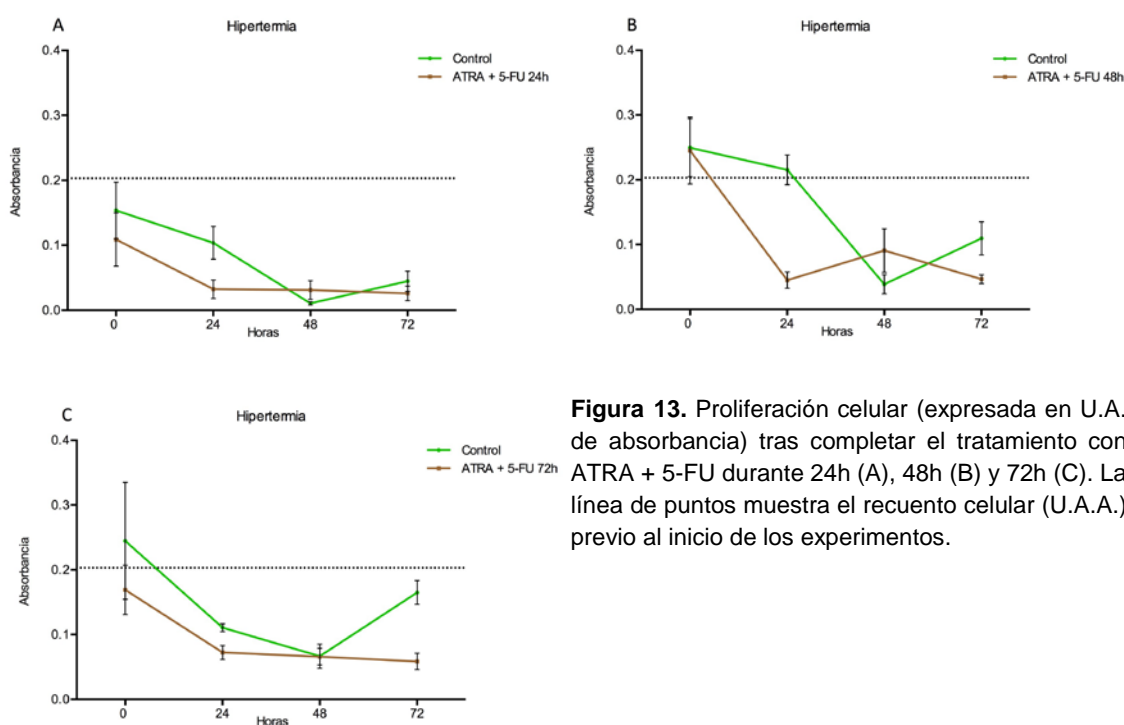
**Figura 12.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con 5-FU durante 24h (A), 48h (B) y 72h (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

En cuanto a la exposición a 5-FU durante 48 (fig. 12B) y 72 horas (fig. 12C), ambos grupos sufren una caída en el recuento celular hasta 48 horas después de la hipertermia. En las siguientes 24 horas ambos cultivos experimentan una mejora en el recuento celular, si bien los sometidos a 5-FU son un 50% menores para las 48 horas de tratamiento ( $0,11 \pm 0,025$  vs  $0,05 \pm 0,005$ ;  $p < 0,05$ ) y un 38% para las 72 ( $0,16 \pm 0,02$  vs  $0,10 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ).

### All-trans-retinoico con 5-Fluor Uracilo

En la figura 13 se muestra el efecto que ejerce sobre la proliferación celular el tratamiento combinado de ATRA + 5-FU e hipertermia, el cual ha mostrado tener un mayor efecto antiproliferativo sobre las células.

En el experimento realizado con 24 horas de exposición a ambos fármacos (fig. 13A) seguido del insulto térmico, se han encontrado diferencias significativas entre los cultivos expuestos a los quimioterápicos y los control. Ambos presentaron una disminución progresiva del número de células, con una caída más rápida del número de células en el cultivo tratado respecto al control a las 24 horas ( $0,03 \pm 0,014$  vs  $0,10 \pm 0,025$ ;  $p < 0,05$ ). El valor medido en los cultivos tratados se mantiene estable hasta las 72 horas. En las últimas 24 horas hay un incremento en el número de células del control cultivo, siendo 35% a la del cultivo tratado ( $0,04 \pm 0,015$  vs  $0,026 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ).



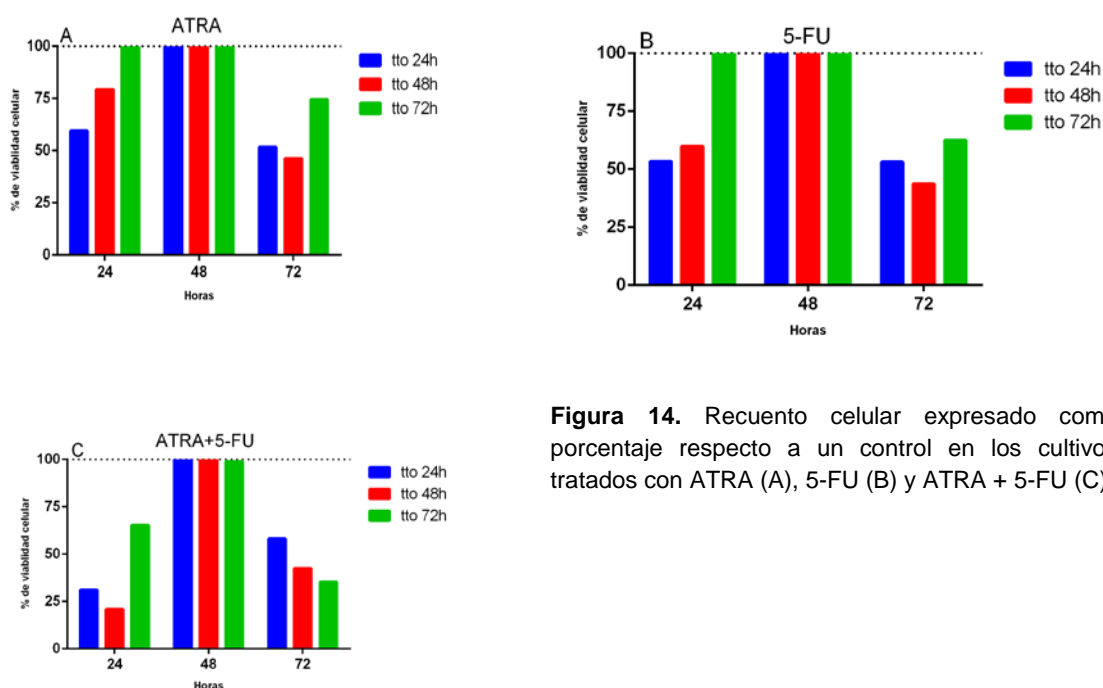
**Figura 13.** Proliferación celular (expresada en U.A. de absorbancia) tras completar el tratamiento con ATRA + 5-FU durante 24h (A), 48h (B) y 72h (C). La línea de puntos muestra el recuento celular (U.A.A.) previo al inicio de los experimentos.

Los cultivos tratados durante 48 horas con la combinación de quimioterápicos y con hipertermia (fig. 13B) mostraron de nuevo una disminución más rápida del número de células del cultivo, al reducirse en un 80% con respecto al control a las 24 horas ( $0,22 \pm 0,02$  vs  $0,045 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ). A continuación, las curvas de ambos cultivos siguen una tendencia similar hasta el final del experimento, remarcando de nuevo la parada de la proliferación celular de los cultivos tratados hasta el final del experimento,

además de la proliferación celular observada en las últimas 24 horas en el cultivo control.

El tratamiento con ATRA + 5-FU durante 72 horas seguido del insulto térmico (fig. 13C), produce una disminución del número de células presentes tanto en el cultivo control como en el tratado, siendo más rápida en este último. Es a las 48 horas cuando ambos cultivos alcanzan valores similares en el número de células en cultivo (no hay diferencias estadísticamente significativas). En las últimas 24 horas se destaca un nuevo crecimiento celular en los cultivos control de un 62% respecto a los tratados, en los que desde las 24 horas no hay proliferación celular ( $0,16 \pm 0,02$  vs  $0,06 \pm 0,01$ ;  $p < 0,05$ ).

Para poder analizar de forma más detallada el efecto de los tratamientos sobre la proliferación celular, se representa el número de células viables de los cultivos sometidos a hipertermia como porcentaje del correspondiente control tratados únicamente con quimioterapia (fig. 14). Este análisis confirma las observaciones realizadas previamente y permite ver que los cultivos tratados con la combinación de fármacos e hipertermia pierden capacidad proliferativa respecto al control sometido a hipertermia. Éste hecho es independiente del quimioterápico empleado y del tiempo de exposición a éste, sin embargo no lo es respecto al tiempo tras la hipertermia, ya que 48 horas después de la agresión térmica, el tratamiento con cualquiera de los fármacos o la combinación de ambos no tiene efectos contra la viabilidad celular.



**Figura 14.** Recuento celular expresado como porcentaje respecto a un control en los cultivos tratados con ATRA (A), 5-FU (B) y ATRA + 5-FU (C).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de un pulso de hipertermia a los cultivos coincide con nuestra hipótesis inicial basada en la mayor sensibilidad que las células tumorales humanas han demostrado frente a la hipertermia <sup>45</sup>. Incluso, el hecho de que no haya habido grandes diferencias entre los distintos tiempos previos de cultivo a la agresión térmica parece indicar que el efecto del insulto térmico es independiente del tiempo de cultivo y del número de células presentes en el mismo (fig. 2).

Por otra parte, el hecho de que las pocas células que sobreviven a la agresión térmica sean capaces de reanudar la proliferación después de 48 horas, hace que nuestro modelo experimental resulte similar a lo que ocurre *in vivo*. Es decir, tras una “resección” que parece “completa”, queda un “pool” de células capaces de recidivar la lesión tumoral <sup>5-8,13</sup>.

Esto hace que dispongamos de una buena herramienta con la que estudiar la utilidad de combinaciones terapéuticas fundadas en el abordaje multidisciplinar de la enfermedad neoplásica. Así, en este trabajo hemos combinado hipertermia y quimioterapia, para analizar si es beneficioso, perjudicial o indiferente aplicarlas de manera simultánea.

Así, hemos podido observar como el pretratamiento durante 24 horas (tiempo de exposición más efectivo) con ATRA o ATRA en combinación con 5-FU bloquea el reinicio de la proliferación observado tras 48 horas (fig. 3 y 5). A diferencia de lo esperado, el tratamiento con 5-FU no ha mostrado tener la capacidad antineoplásica observada en otros trabajos <sup>65,66</sup>. Una explicación a esta ausencia de efecto podría radicar en que la concentración del fármaco en el cultivo no sea adecuada (fig. 4).

La combinación de la exposición de ATRA o 5-FU (o la combinación de ambos) durante 24 horas con la hipertermia da lugar a un bloqueo más marcado y rápido, que además se prolonga hasta el final de la experiencia. De esta manera también se consigue reducir notablemente la población de células tumorales de los cultivos tratados (fig. 11, 12 y 13). Por ello, podríamos asumir que esta parte de quimioterapia neoadyuvante, que ha demostrado una utilidad en clínica humana cuando se asocia a cirugía <sup>14-22</sup>, también resultaría beneficiosa en el caso de tratamientos basados en una agresión térmica dirigida contra el tumor, como se postula en los tratamientos de Tanis E. *et al.* y Brouquet A. *et al.*, con sondas de microondas, antenas de radiofrecuencia, nanopartículas magnéticas o perfusión hipertérmica de órgano aislado <sup>67,68</sup>.

Habría sido sin duda interesante conocer la utilidad de la quimioterapia como tratamiento complementario (posterior en el tiempo) de la hipertermia; sin embargo, debido a las peculiaridades de la dinámica de proliferación de las células tumorales en cultivo, el modelo no parece viable. Para añadir al cultivo los fármacos sería necesario cambiar el medio; y esto supondría un fuerte freno para la dinámica proliferativa de las células, interfiriendo así en el estudio.

Por último, nos parece oportuno destacar que el tratamiento ensayado no se basa en la destrucción tisular por calor (coagulación del tejido) sino en la lesión estructural de las células afectas por la exposición a una temperatura excesiva durante un periodo de tiempo limitado. Esto abre las puertas a técnicas orientadas al tratamiento de células tumorales individuales o microfocos; dianas hasta ahora no abordables en terapéuticas físicas. La vehiculización de nanopartículas magnéticas hacia dianas específicas de las membranas de las células de la metástasis (bien tumorales o bien de un estroma) permitirá (mediante cambios rápidamente variables de radiofrecuencias) generar incrementos muy focalizados de temperatura que sean tolerables por los tejidos próximos, pero induzcan la muerte de las células marcadas por las nanopartículas.

## CONCLUSIONES

La exposición a hipertermia de las células de adenocarcinoma de colon CC-531 ha mostrado tener un efecto inhibitorio sobre su proliferación en cultivo.

El tratamiento con quimioterápicos previo a la hipertermia ha bloqueado el reinicio de la proliferación del cultivo que se producía a las 48 horas.

De las tres pautas de tratamiento quimioterápico ensayadas, la exposición durante 24 horas ha sido más eficaz.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jaume Galceran, Alberto Ameijide, Marià Carulla, Antonio Mateos, José Ramón Quirós, Araceli Alemán, Dolores Rojas, Ana Torrella, Matilde Chico, Marisa Vicente, José María Díaz, Nerea Larrañaga, Rafael Marcos-Gragera, María José Sánchez, Josefina Perucha, R. P. B. Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. *Red Española Regist. Cáncer* (2014).
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
3. Adson, M. A., van Heerden, J. A., Adson, M. H., Wagner, J. S. & Ilstrup, D. M. Resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *Arch. Surg.* **119**, 647–651 (1984).
4. Gayowski, T. J. *et al.* Experience in hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of clinical and pathologic risk factors. *Surgery* **116**, 703–710; discussion 710–711 (1994).
5. Schindel, D. T. & Grosfeld, J. L. Hepatic resection enhances growth of residual intrahepatic and subcutaneous hepatoma, which is inhibited by octreotide. *J. Pediatr. Surg.* **32**, 995–998 (1997).
6. Nicolson, G. L. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **12**, 325–343 (1993).
7. Menter, D. G., Herrmann, J. L. & Nicolson, G. L. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **13**, 67–88 (1995).
8. Radinsky, R. Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **12**, 345–361 (1993).
9. Hughes, K. S. *et al.* Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of patterns of recurrence. *Surgery* **100**, 278–284 (1986).
10. Schlag, P., Hohenberger, P. & Herfarth, C. Resection of liver metastases in colorectal cancer—competitive analysis of treatment results in synchronous versus metachronous metastases. *Eur. J. Surg. Oncol.* **16**, 360–365 (1990).
11. Rosen, C. B. *et al.* Perioperative blood transfusion and determinants of survival after liver resection for metastatic colorectal carcinoma. *Ann. Surg.* **216**, 493–504; discussion 504–505 (1992).
12. Fong, Y., Fortner, J., Sun, R. L., Brennan, M. F. & Blumgart, L. H. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann. Surg.* **230**, 309–318; discussion 318–321 (1999).
13. Kornasiewicz, O. *et al.* Serum levels of HGF, IL-6, and TGF- $\alpha$  after benign liver tumor resection. *Adv. Med. Sci.* **60**, 173–177 (2015).
14. Portier, G. *et al.* Multicenter randomized trial of adjuvant fluorouracil and folinic acid compared with surgery alone after resection of colorectal liver metastases: FFCD ACHBTH AURC 9002 trial. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4976–4982 (2006).
15. Mity, E. *et al.* Adjuvant chemotherapy after potentially curative resection of metastases from colorectal cancer: A pooled analysis of two randomized trials. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4906–4911 (2008).
16. Ychou, M. *et al.* A randomized phase III study comparing adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid with FOLFIRI in patients following complete resection of liver metastases from colorectal cancer. *Ann. Oncol.* **20**, 1964–1970 (2009).
17. Nordlinger, B. *et al.* Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* **371**, 1007–1016 (2008).
18. Kemeny, N. *et al.* Intrahepatic or systemic infusion of fluorodeoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **107**, 459–465 (1987).
19. Chang, A. E. *et al.* A prospective randomized trial of regional versus systemic continuous 5-fluorodeoxyuridine chemotherapy in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann. Surg.* **206**, 685–693 (1987).
20. Rougier, P. *et al.* Hepatic arterial infusion of floxuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma: long-term results of a prospective randomized trial. *J. Clin. Oncol.* **10**, 1112–1118 (1992).
21. Kemeny, N. *et al.* Randomized trial of hepatic arterial floxuridine, mitomycin, and carmustine versus floxuridine alone in previously treated patients with liver metastases from colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **11**, 330–335 (1993).
22. Meta-Analysis Group in Cancer. Re: Reappraisal of hepatic arterial infusion in the treatment of nonresectable liver metastases from colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**, 838–839 (1996).
23. Leonard, G. D., Brenner, B. & Kemeny, N. E. Neoadjuvant chemotherapy before liver resection for patients with unresectable liver metastases from colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2038–2048 (2005).



24. Rossi, S. *et al.* Percutaneous Treatment of Small Hepatic Tumors by an Expandable RF Needle Electrode. *Am. J. Roentgenol.* 1015–1022 (1998).
25. Solbiati, L. *et al.* Percutaneous radio-frequency ablation of hepatic metastases from colorectal cancer: long-term results in 117 patients. *Radiology* **221**, 159–166 (2001).
26. Lencioni, R. *et al.* Radio-frequency thermal ablation of liver metastases with a cooled-tip electrode needle: results of a pilot clinical trial. *Eur. Radiol.* **8**, 1205–1211 (1998).
27. Curley, S. a *et al.* Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann. Surg.* **230**, 1–8 (1999).
28. Oshowo, a., Gillams, a., Harrison, E., Lees, W. R. & Taylor, I. Comparison of resection and radiofrequency ablation for treatment of solitary colorectal liver metastases. *Br. J. Surg.* **90**, 1240–1243 (2003).
29. Livraghi, T. *et al.* Percutaneous radiofrequency ablation of liver metastases in potential candidates for resection: The 'test-of-time' approach. *Cancer* **97**, 3027–3035 (2003).
30. Pawlik, T. M., Izzo, F., Cohen, D. S., Morris, J. S. & Curley, S. A. Combined resection and radiofrequency ablation for advanced hepatic malignancies: results in 172 patients. *Ann. Surg. Oncol.* **10**, 1059–1069 (2003).
31. Mark, M., Ghyselinck, N. B. & Chambon, P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e002 (2009).
32. Travis, G. H., Golczak, M., Moise, A. R. & Palczewski, K. Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 469–512 (2007).
33. Hogarth, C. & Griswold, M. The key role of vitamin A in spermatogenesis. *J. Clin. ...* **120**, (2010).
34. Kennedy, K. A. M. *et al.* Retinoic acid enhances skeletal muscle progenitor formation and bypasses inhibition by bone morphogenetic protein 4 but not dominant negative beta-catenin. *BMC Biol.* **7**, 67 (2009).
35. Collins, S. J. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 346–351 (2008).
36. Duester, G. Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* **134**, 921–931 (2008).
37. Lotan, R. Retinoids and apoptosis: implications for cancer chemoprevention and therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 1655–1657 (1995).
38. Hansen, L. A. *et al.* Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* **21**, 1271–1279 (2000).
39. Hellemans, K. *et al.* Differential modulation of rat hepatic stellate phenotype by natural and synthetic retinoids. *Hepatology* **39**, 97–108 (2004).
40. Garcia-Alonso, I. *et al.* Effects of all-trans retinoic acid on tumor recurrence and metastasis. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **97**, 240–248 (2005).
41. Ocker, M., Herold, C., Ganslmayer, M., Hahn, E. G. & Schuppan, D. The synthetic retinoid adapalene inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells in vitro. *Int. J. Cancer* **107**, 453–459 (2003).
42. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 330–338 (2003).
43. Diasio, R. B. & Harris, B. E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* **16**, 215–237 (1989).
44. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet* **345**, 939–944 (1995).
45. Van der Zee, J. Heating the patient: A promising approach? *Ann. Oncol.* **13**, 1173–1184 (2002).
46. Hildebrandt, B. *et al.* The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **43**, 33–56 (2002).
47. Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **3**, 487–497 (2002).
48. Falk, M. H. & Issels, R. D. Hyperthermia in oncology. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Gr.* **17**, 1–18 (2001).
49. Feldman, A. L. *et al.* Analysis of factors associated with outcome in patients with malignant peritoneal mesothelioma undergoing surgical debulking and intraperitoneal chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **21**, 4560–4567 (2003).
50. Chang, E. *et al.* Laparoscopic continuous hyperthermic peritoneal perfusion. *J. Am. Coll. Surg.* **193**, 225–229 (2001).
51. Echevarria-Uraga, J. J. *et al.* Study of the intra-arterial distribution of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles in a model of colorectal neoplasm induced in rat liver by MRI and spectrometry. *Int. J. Nanomedicine* **7**, 2399–2410 (2012).
52. Vertree, R. A., Leeth, A., Girouard, M., Roach, J. D. & Zwischenberger, J. B. Whole-body hyperthermia: a review of theory, design and application. *Perfusion* **17**, 279–290 (2002).

53. Hokland, S. L. *et al.* MRI-guided focused ultrasound: Methodology and applications. *IEEE Trans. Med. Imaging* **25**, 723–731 (2006).
54. Day, E. S., Morton, J. G. & West, J. L. Nanoparticles for thermal cancer therapy. *J. Biomech. Eng.* **131**, 074001 (2009).
55. Lepock, J. R. Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Gr.* **19**, 252–266 (2003).
56. Strom, R., Crifo, C., Rossi-Fanelli, A. & Mondovi, B. Biochemical aspects of heat sensitivity of tumour cells. *Recent results cancer Res. Fortschritte der Krebsforsch. Prog. dans les Rech. sur le cancer* 7–35 (1977).
57. Streffer, C. [Radiation effects of exposure during prenatal development]. *Radiologe* **35**, 141–147 (1995).
58. Dickson, J. A. & Shah, D. M. The effects of hyperthermia (42 degrees C) on the biochemistry and growth of a malignant cell line. *Eur. J. Cancer* **8**, 561–571 (1972).
59. Christophi, C., Winkworth, A., Muralidharan, V. & Evans, P. The treatment of malignancy by hyperthermia. *Surgical Oncology* **7**, 83–90 (1998).
60. Bull, J. M. An update on the anticancer effects of a combination of chemotherapy and hyperthermia. *Cancer Res.* **44**, 4853s–4856s (1984).
61. Dahl, O. Interaction of hyperthermia and chemotherapy. *Recent results cancer Res. Fortschritte der Krebsforsch. Prog. dans les Rech. sur le cancer* **107**, 157–169 (1988).
62. Engelhardt, R. Hyperthermia and drugs. *Recent results cancer Res. Fortschritte der Krebsforsch. Prog. dans les Rech. sur le cancer* **104**, 136–203 (1987).
63. Hahn, G. M. & Li, G. C. Interactions of hyperthermia and drugs: treatments and probes. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **61**, 317–323 (1982).
64. I. García-Alonso, D. Sáenz de Urturi, JJ. Echevarría-Uraga, C. Acebal, A. Santamaría, B. H. de la P. Hyperthermia hinders the proliferation of CC-531 cells. *Br. J. Surg.* 531 (2014).
65. Tang, X., Zhu, Y., Tao, W., Wei, B. & Lin, X. Synergistic effect of triptolide combined with 5-fluorouracil on colon carcinoma. *Postgrad. Med. J.* **83**, 338–343 (2007).
66. Alonso-Varona, a., Caramés, M., García-Alonso, I. & Palomares, T. 241 L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate reverses the growth-promoting effect of growth factors, improving the oxaliplatin antitumour response in WiDr colon cancer cells. *Eur. J. Cancer Suppl.* **8**, 63 (2010).
67. Tanis, E. *et al.* Local recurrence rates after radiofrequency ablation or resection of colorectal liver metastases. Analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer #40004 and #40983. *Eur. J. Cancer* **50**, 912–9 (2014).
68. Brouquet, A., Andreou, A. & Vauthey, J. N. The management of solitary colorectal liver metastases. *Surgeon* **9**, 265–272 (2011).