

Liberación de antígeno polipeptídico tisular y proliferación de células MCF-7 tras sincronización con hidroxitamoxifeno y rescate con estradiol*

J. M. Ruiz de Almodóvar, J. D. López-González, R. del Moral, J. C. Fernández, L. Gorgojo, N. Olea y V. Pedraza**

Departamento de Radiología
Hospital Clínico Universitario
Facultad de Medicina
Universidad de Granada
18012 Granada (España)

(Recibido el 8 de enero de 1990)

J. M. RUIZ DE ALMODÓVAR, J. D. LÓPEZ-GONZÁLEZ, R. DEL MORAL, J. C. FERNÁNDEZ, L. GORGOJO, N. OLEA, and V. PEDRAZA. *Tissular Polypeptide Antigen Release and MCF-7 Cell Proliferation after Synchronization with Tamoxifen and Rescue with Estradiol*. Rev. esp. Fisiol., 46 (2), 205-210, 1990.

The kinetic of release of the tissular polypeptide antigen (TPA) by MCF-7 cells synchronised by sequential treatment with hydroxytamoxifen (OH-TAM) and 17β -estradiol has been studied. The present findings confirm the proliferative effect of estradiol on MCF-7 cells, with a shortening of the doubling time (T_D) (22.2 h versus 24.8 h) and an increase in the growing fraction (F_c) (94 % versus 81 %) when compared with the same parameters measured in cells rescued from OH-TAM but not treated with estradiol. In addition, the action of estradiol was followed by a simultaneous increase in the amount of TPA in the culture medium related with the phases G_2/M and G_1 of the mitotic cycle. This phenomenon seems to be the reason for the steplike shape of the TPA released curves. The experimental results suggest that in MCF-7 cells the sequential combination of antiestrogenic agents and estrogens leads to a cellular synchronization. Furthermore this synchronization is maintained for at least 3 cycles of cell division.

Key words: MCF-7 cells, TPA release, Synchronization with tamoxifen, Rescue with estradiol.

Los efectos del tamoxifeno (TAM) sobre células hormonodependientes pueden ser reversibles con estradiol o irreversibles dependiendo del nivel de concentración de

antiestrógeno utilizado (8). Los efectos reversibles se asocian con la acumulación de las células en la fase G_0/G_1 del ciclo mitótico. Los efectos irreversibles predominan a elevadas concentraciones de antiestrógeno, por las que ejerce una acción citotóxica que induce la muerte celular. Existe, por último, un tercer mecanismo

* Trabajo realizado con una ayuda de investigación de la «Comisión Asesora para la Investigación Científica y Técnica (CAYCIT: PA85-0326).

** A quien debe dirigirse la correspondencia.

inhibitorio del crecimiento, que parece no necesitar del concurso del receptor estrogénico y que, aunque no conduce a la citólisis celular, resulta irreversible al estradiol (11). Este hecho sugiere que ciertas acciones del TAM pueden ser independientes del carácter receptor estrogénico positivo o negativo de la línea celular —o el tumor clínico— sometida a tratamiento, habiéndose demostrado (5), sobre líneas celulares con receptor estrogénico negativo, que el TAM produce inhibición del crecimiento celular.

Estudios sobre cinética del ciclo celular en células MCF-7 han puesto de manifiesto que, cuando los experimentos se inician con células selectivamente colectadas en fase de mitosis (15, 16), la mayor parte del cultivo (90-95 % respecto al total de células) se encuentra en fase G_1 , 1 hora después de la selección mitótica. Pasadas 7 horas, las células empiezan a abandonar este compartimento y entran progresivamente en fase de síntesis, alcanzando, en fase S, un valor cercano al 80 % respecto al total de células. La mayor parte de los elementos celulares ha completado la fase de síntesis en un tiempo de 16 a 20 horas después de la selección. El período G_2/M finaliza 4-6 h más tarde. El tiempo medio de cada una de las fases del ciclo celular es de 9, 9,3 y 3 horas para G_1 , S y G_2/M , respectivamente y 21,3 h es la duración media del tiempo necesario para que transcurra un ciclo mitótico completo (T_C) (14).

Junto a esta población de células de rápida cinética, existe otra que no prolifera o lo hace muy lentamente. La proporción de elementos de cinética lenta en el conjunto de la población es del orden del 15 % (14).

La población celular de MCF-7 sincronizada con TAM es parcialmente sensible a la acción del antiestrógeno cuando el cultivo se encuentra justamente en fase G_1 (4 horas después de M). El período de máxima sensibilidad tiene una duración comprendida entre 2 y 4 horas y fuera del mis-

mo el TAM ejerce una acción mínima. El tiempo de tránsito por la fase G_1 para la subpoblación celular de cinética lenta se ha estimado en torno a las 30 horas (12). Cuando el antiestrógeno se ensaya a bajas concentraciones induce una alteración del equilibrio de distribución de las células MCF-7 entre los compartimentos cinéticos lento y rápido, haciendo predominante el número de células con largo tiempo de G_1 (12). Como resultado de este proceso tiene lugar la inhibición del crecimiento celular y la acumulación de células en fase G_1 . Esta «sincronización» es máxima a los tres días de tratamiento con TAM (8).

En un trabajo anterior hemos establecido que el antígeno polipeptídico tisular (TPA), podía ser detectado por radio-inmunoanálisis en el medio nutriente de los cultivos de células MCF-7. Su nivel de concentración ha resultado estar directamente relacionado con el número de elementos celulares presentes en el cultivo y, como consecuencia de la inhibición del crecimiento producida por el antiestrógeno, los niveles de TPA en el medio nutriente resultan también inhibidos. El TPA «marca», por tanto, el proceso de proliferación celular *in vitro* (7).

El tratamiento secuencial del cultivo de células MCF-7 con OH-TAM 10^{-7} M durante 72 horas, seguido del tratamiento con 17β -estradiol 10^{-7} M después, constituye un procedimiento experimental mediante el cual es posible demostrar el efecto proliferativo que ejerce el estradiol sobre los elementos celulares del cultivo (9, 17, 18).

En este trabajo se estudia la cinética de liberación del TPA en cultivos de células MCF-7, cuyo crecimiento ha sido sincronizado mediante OH-TAM y 17β -estradiol.

Material y Métodos

Cultivos celulares. — Como modelo experimental de cáncer de mama con carác-

ter receptor estrogénico positivo, se ha utilizado la línea celular tumoral mamaria MCF-7 establecida por SOULE *et al.* (3, 10), a partir de una enferma postmenopáusica afecta de carcinoma ductal infiltrante metastásico de mama.

La línea celular se ha cultivado en monocapa utilizando como medio nutriente Mínimo Medio Esencial con sales de Earle (MEM), suplementado con 10 % de suero de feto de ternera inactivado térmicamente (FCS) y antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y gentamicina 40 µg/ml). Las condiciones experimentales del cultivo han sido las habituales: atmósfera saturada de humedad con 5 % de CO₂ y 95 % de aire, a 37 °C.

La cuantificación del número de células presentes en el cultivo se ha efectuado determinando la cantidad de ácido desoxirribonucleico (DNA) mediante el método de BURTON (4).

Hormonas. — Como sustancia de acción antiestrogénica, para conseguir la sincronización parcial del cultivo, se ha utilizado hidroxitamoxifeno (OH-TAM) (Ici-Farma) 10⁻⁷ M en MEM + FCS.

El rescate de la población celular parcialmente sincronizada se ha realizado con 17,β-estradiol (17β-E₂) (Sigma) 10⁻⁷ M en MEM + FCS.

Liberación de TPA en cultivos de células parcialmente sincronizadas. — La concentración de antígeno polipeptídico tisular presente en el medio de cultivo ha sido determinada por radio-inmunoanálisis (Santeg Medical).

Las células MCF-7 han sido tratadas con OH-TAM 10⁻⁷ M durante 72 horas para conseguir la inhibición del crecimiento celular por bloqueo en la fase G₁ del ciclo mitótico (6, 9, 17). La eliminación del medio de cultivo que contiene OH-TAM y su sustitución por MEM + FCS (grupo control) o MEM + FCS + 17,β-E₂ (grupo estradiol) rescata a las células MCF-7 sensibles al antiestrógeno que, de

forma simultánea, inician un nuevo ciclo mitótico (17).

Las determinaciones analíticas de TPA y DNA se han realizado a las 72 h de iniciada la exposición celular al OH-TAM (punto inicial del experimento), y a las 24, 48 y 72 h siguientes al rescate.

La liberación de TPA respecto a la fase del ciclo celular en la población MCF-7 previamente sincronizada se ha investigado realizando determinaciones de este antígeno cada 6 horas tras el rescate, hasta completar las 72 h. El DNA se ha determinado simultáneamente en los mismos períodos de tiempo.

Resultados

Liberación de TPA por células MCF-7 parcialmente sincronizadas. — El tratamiento con OH-TAM 10⁻⁷ M durante 72 h, y el rescate de la población celular MCF-7 con 17β-E₂ o mediante simple cambio de medio, permite estudiar la proliferación celular en condiciones próximas al crecimiento sincronizado de todos los elementos existentes en el cultivo. Los resultados obtenidos del crecimiento celular y de la liberación de TPA al medio nutriente, se recogen en la tabla I.

Cinética de liberación de TPA en células MCF-7 parcialmente sincronizadas. —

Tabla I. MCF-7: Proliferación celular y liberación de TPA

Grupo	Tiempo (h)	DNA (µg)	TPA (U)
Basal (*)	0	1,0	4,33
Control	24	2,1 ± 0,4	7,32
	48	4,0 ± 0,8	10,37
	72	7,6 ± 0,5	16,17
Estradiol	24	2,7 ± 0,5	7,32
	48	5,7 ± 0,4	11,30
	72	9,6 ± 0,4	21,65

(*) Inicio del experimento.

Los resultados del crecimiento celular y de la liberación de MCF-7 sometida a sincronización con OH-TAM 10^{-7} M durante 72 h, y posteriormente rescatada con MEM + FCS + 17β -E₂ 10^{-7} M, se ofrecen en las figuras 1 y 2, respectivamente. De la transformación semilogarítmica

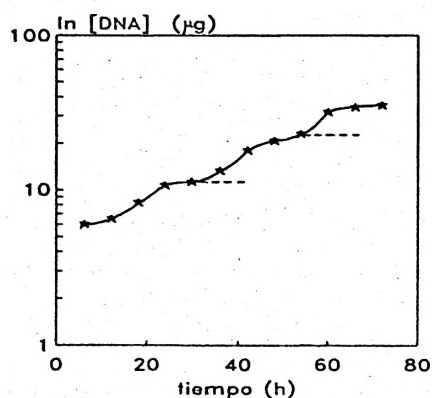


Fig. 1. Proliferación de MCF-7 tras sincronización con OH-TAM y rescate con 17β -estradiol.

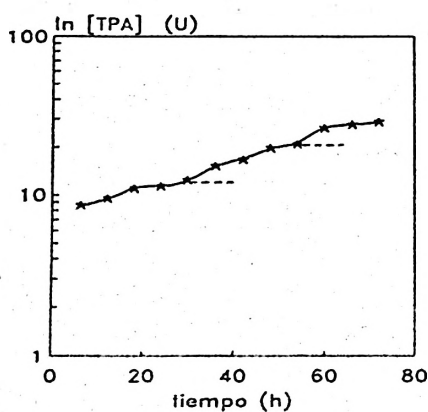


Fig. 2. Liberación de TPA al medio de cultivo de MCF-7 tras sincronización con OH-TAM y rescate con 17β -estradiol.

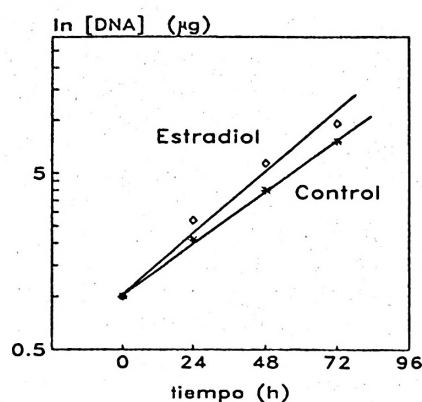


Fig. 3. Proliferación de MCF-7 tras sincronización con OH-TAM.

de los datos de crecimiento celular (fig. 3), es posible deducir los parámetros que caracterizan la cinética de este proceso. La ecuación que liga la cantidad de DNA presente en el cultivo celular con el tiempo [DNA $f(t)$], resulta ser para el grupo control:

$$\ln [\text{DNA}] = 1,03 + 0,67 \cdot t \quad (r = 0,999)$$

y, para el grupo estradiol

$$\ln [\text{DNA}] = 1,13 + 0,75 \cdot t \quad (r = 0,990)$$

Los tiempos de duplicación (T_D) obtenidos para uno y otro grupo han sido los siguientes: 24,8 h (grupo control) y 22,2 h (grupo estradiol). Ambos datos difieren claramente del valor de 40,2 h, descrito para células MCF-7 cultivadas en condiciones estandar (18).

Calculando el valor teórico correspondiente a la fracción de crecimiento (F_C) de cada uno de los grupos estudiados (11), obtenemos: 0,81 para el grupo control y 0,94 para el grupo estradiol.

Estos resultados demuestran que el «rescate» de los elementos celulares de la población MCF-7 previamente tratados con OH-TAM, ya sea utilizando MEM +

FCS (grupo control) o MEM + FCS + 17β -E₂ (grupo estradiol) es muy eficaz.

Discusión

El análisis de los resultados obtenidos en este trabajo confirman que el estradiol ejerce un efecto proliferativo neto sobre los cultivos de células MCF-7 sincronizados por la acción antiestrogénica del OH-TAM (tabla I). Del estudio parece deducirse que entre el grupo de células tratado con 17β -E₂ 10^{-7} M y el grupo control, existen ciertas diferencias cuya comparación estadística ($p < 0,02$) permite afirmar que el número de células existentes, a las 72 horas del cambio de medio, es superior en el grupo tratado con 17β -E₂ que en el grupo control.

Por otra parte, las diferencias encontradas para el valor de F_C en este experimento respecto al dato de F_C obtenido en condiciones estándar (7) (F_C /MCF-7/ = 0,45) confirman las ideas de SUTHERLAND y MURPHY (13) acerca de la acción de los estrógenos sobre la cinética del ciclo celular. Según estos autores, las células hormonosensibles a la acción del estradiol incrementan su actividad proliferativa a través de los mecanismos siguientes: 1) incrementando su fracción de crecimiento mediante el reclutamiento de las células quiescentes de la población, 2) acortando el tiempo de duración del ciclo celular por vía, fundamentalmente, de la reducción de la fase G₁; y 3) disminuyendo la muerte celular.

La demostración experimental de una fracción de crecimiento del 94 % para el grupo tratado con 17β -E₂ y del 81 % para el grupo control (no olvidemos la presencia de esteroides endógenos en el FCS que se añade como suplemento) y la obtención de tiempos de duplicación cercanos al del ciclo (22,2 y 24,8 h para los grupos estradiol y control, respectivamente, y 21,3 h para el T_C), constituyen, sin duda, una fuerte evidencia en favor de la operatividad de, al menos, dos de los efectos anteriormente mencionados.

En la población MCF-7 sincronizada por la acción del OH-TAM, el 17β -E₂ exógeno adicionado al cultivo induce un acortamiento suplementario del tiempo de duplicación (T_D) (22,2 *versus* 24,8 h) y un incremento discreto, pero real, de la fracción de crecimiento (94 % frente a 81 %) respecto a los observados en la población celular liberada de la influencia del OH-TAM, pero no sometida a la acción del estradiol exógeno. El incremento de la fracción de crecimiento responde a la potenciación del mecanismo de reclutamiento antes descrito. La disminución del tiempo de duplicación celular observado resulta ser simple consecuencia del incremento y la progresión sincronizada de las células integrantes de la fracción de crecimiento de la población.

La figura 1 muestra el crecimiento de las células MCF-7 sincronizadas con OH-TAM. De su análisis se desprende que la cantidad de DNA crece escalonadamente con el tiempo. En efecto, es posible definir tres ondas sucesivas que deben corresponder a tres ciclos de división celular completos. La fase de meseta que separa cada una de las zonas de pendiente positiva define el intervalo G₂/M-G₁ del ciclo mitótico. Los resultados de este experimento demuestran también que el crecimiento celular de la población secuencialmente tratada con OH-TAM y 17β -E₂ ocurre de manera sincrónica al menos durante los tres primeros ciclos divisorios.

La demostración de la presencia de TPA en el medio de cultivo de las células sometidas a estudio (fig. 2) parece demostrativa de que el proceso de liberación de TPA, cuando las células progresan simultáneamente, tiene lugar en una fase concreta del ciclo mitótico. Ello da origen probablemente, a la aparición de escalones sucesivos. Nuestros resultados confirman los obtenidos por BJÖRKLUND (2) al estudiar la cinética de liberación de TPA al cultivo de células HeLa. Se ha demostra-

Rev. esp. Fisiol., 46 (2), 1990

do, en efecto, que la fase en la que tiene lugar este proceso se inicia cuando las células han terminado la síntesis de DNA (fase G₂/M) y termina antes de que los elementos celulares comiencen a reduplicar el material genético (fase S). Por otra parte el contenido intracelular de TPA alcanza su nivel máximo cuando las células están, precisamente en fase M (1).

Resumen

Se estudia la cinética de liberación del antígeno polipeptídico tisular (TPA) en cultivos de células MCF-7 sincronizadas mediante tratamiento secuencial con OH-TAM y 17 β -estradiol. Los resultados confirman el efecto proliferativo que ejerce el estradiol sobre la población celular tratada, demostrándose un acortamiento del tiempo de duplicación (T_D) (22,2 h versus 24,8 h) y un incremento de la fracción de crecimiento (F_C) (94 % versus 81 %) respecto a los valores obtenidos en la población liberada de la influencia del OH-TAM, pero no sometida a la acción del estradiol exógeno. La acción del estradiol se traduce, asimismo, en un incremento de los niveles de TPA en el medio de cultivo, particularmente en el período correspondiente a las fases G₂/M y G₁ del ciclo mitótico. Esto da origen, probablemente a la aparición de escalones sucesivos en las curvas. De nuestros resultados experimentales se concluye que la combinación secuencial de antiestrógenos-estrógenos sobre cultivos celulares hormonodependientes da lugar a una población que progresa sincrónicamente a lo largo del ciclo vital y que este sincronismo se mantiene, al menos durante tres ciclos mitóticos.

Palabras clave: Células MCF-7, Liberación de TPA, Sincronización con hidroxitamoxifeno, Rescate con estradiol.

Bibliografía

1. Björklund, B.: En «Protides Biol. Fluids Proc. Colloc.» (Peeters, H., ed.). Pergamon Press, Oxford, 1983, pp. 425-430.
2. Björklund, B. y Björklund, V., En «Human Tumors Marker» (Nieburgs, M. E., Birkmayer, G. D. y Klavins, J. V. eds.). Liss Inc., New York, 1983, pp. 41-50.
3. Broocks, S. C., Locke, E. R. y Soule, H. D.: *J. Biol. Chem.*, 248, 6521-6523, 1973.
4. Burton, K.: *Biochemistry*, 62, 315-323, 1956.
5. Green, M., Whybourne, A. y Taylor, I.: En «Non Steroidal Antiestrogens» (Sutherland, R. y Jordan, V., eds.). Academic Press, Sidney, 1981, pp. 319-412.
6. Lippman, M., Bolan, G. y Huff, K.: *Cancer Res.*, 36, 4595-4601, 1976.
7. López-González, J. D., del Moral, R., Olea, N. *et al.*: *Rev. esp. Fisiol.*, 45, 227-234, 1989.
8. Lykesfeldt, A., Larsen, J., Christensen, I., *et al.*: *Br. J. Cancer*, 49, 717-722, 1984.
9. Olea, N., Villalobos, M., Thomas, J., *et al.*: *Rev. esp. Fisiol.*, 43, 215-222, 1987.
10. Soule, H. D., Vázquez, J., Long, A., *et al.*: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 1409-1416, 1973.
11. Sutherland, R. L., Green, M., Hall, R., *et al.*: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19, 615-621, 1983.
12. Sutherland, R. L., Hall, R. y Taylor, W.: *Cancer Res.*, 43, 3998-4006, 1983.
13. Sutherland, R. L. y Murphy, L. C.: *Eur. J. Cancer*, 16, 1141-1149, 1980.
14. Taylor, I., Hodson, P., Green, M. *et al.*: *Cancer Res.*, 43, 4007-4010, 1983.
15. Terasima, T. y Tolmach, L. J.: *Nature*, 190, 1210-1215, 1961.
16. Terasima, T. y Tolmach, L. J.: *Exp. Cell Res.*, 30, 344-362, 1963.
17. Villalobos, M.: Memoria de licenciatura, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 1987.
18. Villalobos, M., Olea, N., Gorgojo, L., *et al.*: *Rev. esp. Fisiol.*, 43, 209-214, 1987.