

Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7.

I. Influencia relativa de los estrógenos y antiestrógenos sobre el crecimiento de la población celular

M. Villalobos, N. Olea*, L. Gorgojo, J. D. López-González, J. M. Ruiz de Almodovar y V. Pedraza

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

(Recibido el 9 de septiembre de 1986)

M. VILLALOBOS, N. OLEA, L. GORGOJO, J. D. LOPEZ-GONZALEZ, J. M. RUIZ DE ALMODOVAR and V. PEDRAZA. *Proliferation Kinetics in MCF-7 Cell Culture. I. Influence of Estrogens and Antiestrogens on Growth Cell.* Rev. esp. Fisiol., 43 (2), 209-214, 1987.

The cellular hormonodependent cell line MCF-7 is a tumoral model of mammary cancer the growth kinetics of which operating under the influence of varied and opposed hormonal factors (estrogens and antiestrogens at precise concentration levels) has provided the means of knowing the action mechanisms of such agents. In this study, carried out with cultured MCF-7 cells under well defined experimental conditions, it has been shown that: 1) antiestrogens (OH-TAM) seem to be opposed to the growing process of the cellular population the elements of which, under the influence of OH-TAM, double the value of the parameter T_D (Doubling Time); 2) estrogens ($17-\beta-E_2$) cancel out this effect and promote the growth of MCF-7 cells whether OH-TAM is previously or simultaneously added to the culture medium; 3) the observation of this estrogenic action needs accurate experimental conditions without which the effect may not be seen.

Key words: Breast Cancer MCF-7 cells, Cellular growth, Estrogens, Antiestrogens.

Los mecanismos de control hormonal tienen, a nivel molecular, una propiedad común básica: la interacción de la hormona con su receptor específico desencadena cierto tipo de acontecimientos bioquímicos que inducen determinados efectos objetivables a nivel celular y tisular. Así, en cáncer de mama hormonodependiente se sabe que el $17-\beta$ -estradiol (E_2) estimula la proliferación celular (22) aun-

que los procesos mediante los que se produce tal acción no son bien conocidos (8). Cuando se utilizan, como modelo biológico del cáncer de mama, líneas celulares tumorales establecidas (7), la demostración experimental del efecto proliferativo mediado por el estradiol tropieza con numerosas dificultades derivadas de la aparente contradicción de los resultados. En efecto, sobre la línea celular MCF-7, procedente de un adenocarcinoma mamario humano (20), mantenida en monocapa en condiciones de cultivo óptimas, el E_2 no

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

parece ejercer ninguna acción sobre la cinética de proliferación celular aunque la presencia de receptores estrogénicos (2, 10, 15), las alteraciones de la ultraestructura celular derivadas de la exposición al E_2 (24), la síntesis de proteínas estrógeno inducidas (18), o incluso el estímulo, estradiol-dependiente, del crecimiento de esta línea celular en condiciones de cultivo extremas (12), parecen demostrar la hormonodependencia del modelo tumoral.

En este trabajo se presenta un análisis cinético del crecimiento en monocapa de la línea celular MCF-7, se analiza la influencia que sobre este proceso ejercen determinadas moléculas y, finalmente, se ha tratado de demostrar —utilizando una metodología original— que el $17\text{-}\beta\text{-}E_2$ estimula de manera eficaz la proliferación de los elementos celulares de la línea celular en cuestión incluso en condiciones de cultivo estándar.

Material y Métodos

Reactivos químicos. — $17\text{-}\beta\text{-}E_2$ (Calbiochem), tamoxifeno (ICI-46474) e hidroxitamoxifeno (ICI-79280), estos últimos fueron suministrados por ICI-Pharma.

Cultivos celulares. — Las células MCF-7 ensayadas se mantuvieron en monocapa (Costar T-25), en atmósfera húmeda con 5% de CO_2 y 95% de aire $T = 37^\circ C$, y fueron cultivadas en Medio Esencial Mínimo, con sales de Earle (MEM), suplementado con un 10% de suero de ternera fetal inactivado térmicamente (FCS) y con determinados antibióticos (Penicilina 100 U/ml, Gentamicina 40 $\mu g/ml$).

Experimentos de crecimiento celular. — Las células, en situación preconfluente (cultivos de mantenimiento, cajas T-25), tratadas con una solución de tripsina-EDTA (tripsina 0,05% y EDTA 0,025%)

para despegarlas de la superficie del soporte, se sembraron en discos Petri de 35 mm de diámetro a una densidad de $3\text{-}6 \cdot 10^4$. La cinética de proliferación celular se estudió durante 144 horas en MEM+FCS, adicionando 24 horas después de la siembra y según los experimentos, $17\text{-}\beta\text{-}E_2$, tamoxifeno (TAM) e hidroxitamoxifeno (OH-TAM) en concentraciones comprendidas entre 10^{-5} a $10^{-9} M$, o el mismo volumen de disolvente (vehículo) para el experimento control. El crecimiento celular en función del tiempo se cuantificó mediante la determinación de DNA presente en los discos (3).

Resultados

Efecto sobre el crecimiento de las células MCF-7. — La presencia de concentraciones variables de $17\text{-}\beta\text{-}E_2$, TAM y OH-TAM en el medio de cultivo MCF-7 ha sido analizada a través de su efecto sobre el crecimiento celular. Grupos celulares de control se ensayaron en paralelo. La tabla I recoge la cantidad de DNA cuantificada a las 144 h de subcultivo, para cada uno de los 6 experimentos realizados; los datos representan el valor medio y su desviación estándar. La aplicación del test estadístico para diferencias entre medias demuestra la inhomogeneidad de los grupos sometidos a la acción de los antiestró-

Tabla I. Efecto del $17\text{-}\beta\text{-}E_2$ ($17\text{-}\beta\text{-}E_2$), tamoxifeno (TAM) e hidroxitamoxifeno (OH-TAM) sobre el crecimiento de las células MCF-7. Tiempo = 144 h; Media (μg DNA) $\pm$ DS; n = 6. Grupo control: $12,6 \pm 1,2 \mu g$ DNA.

M	$17\text{-}\beta\text{-}E_2$	TAM	OH-TAM
10^{-5}	—	$6,3 \pm 0,7^*$	$2,4 \pm 0,6^*$
10^{-6}	$11,1 \pm 2,1$	$9,3 \pm 1,2^*$	$5,4 \pm 1,4^*$
10^{-7}	$12,7 \pm 0,8$	$11,3 \pm 1,1$	$8,2 \pm 0,7^*$
10^{-8}	$12,8 \pm 1,2$	$12,9 \pm 0,9$	$9,1 \pm 1,2^*$
10^{-9}	$11,8 \pm 1,0$	$12,3 \pm 2,5$	$11,3 \pm 1,5$

* Diferencias significativas respecto al control (Test de Cochran).

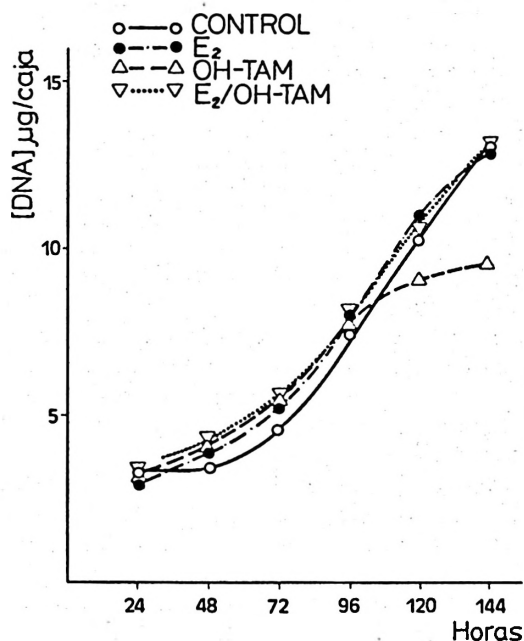


Fig. 1. Crecimiento celular de la línea MCF-7 en medio MEM+FCS (grupo control) y en medio MEM+FCS suplementado con $17\text{-}\beta\text{-E}_2$, 10^{-7} M (grupo E_2); OH-TAM, 10^{-7} M (grupo OH-TAM) y $17\text{-}\beta\text{-E}_2$, 10^{-7} M + OH-TAM, 10^{-7} M (grupo $\text{E}_2/\text{OH-TAM}$).

Las células son cultivadas durante 144 horas en discos de 35 mm de diámetro y los resultados se expresan en μg de DNA por caja. Cada medida representa la media de seis determinaciones.

genos, TAM y OH-TAM cuando su concentración en el medio de cultivo alcanza o supera el valor de 10^{-6} ó 10^{-8} M respectivamente, en relación a la serie control.

En la figura 1 se representa el crecimiento de las células MCF-7, expresado como μg de DNA en función del tiempo, para un experimento en la que las células se cultivan durante 144 horas en MEM+FCS (grupo control) o MEM+FCS suplementado con $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ 10^{-7} M , OH-TAM 10^{-7} M o ambas en idéntica concentración ($17\text{-}\beta\text{-E}_2$ + OH-TAM 10^{-7} M). El análisis estadístico de los

resultados demuestra la existencia de diferencias significativas entre los niveles de DNA observados en los grupos OH-TAM y Control.

Efecto de la combinación secuencial OH-TAM/ E_2 sobre el crecimiento de las células MCF-7. — La figura 2 ofrece, en representación semilogarítmica, los datos de crecimiento celular, expresados como μg de DNA, de un experimento en el que células MCF-7 (60.000 cel/ml) se sometieron 4 h después de la siembra, en discos de 35 mm de diámetro, a la acción secuencial de OH-TAM 10^{-7} M , durante las primeras 96 h y $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ 10^{-7} M , después, hasta alcanzar 192 horas de subcultivo.

Simultáneamente se realizó otro experi-

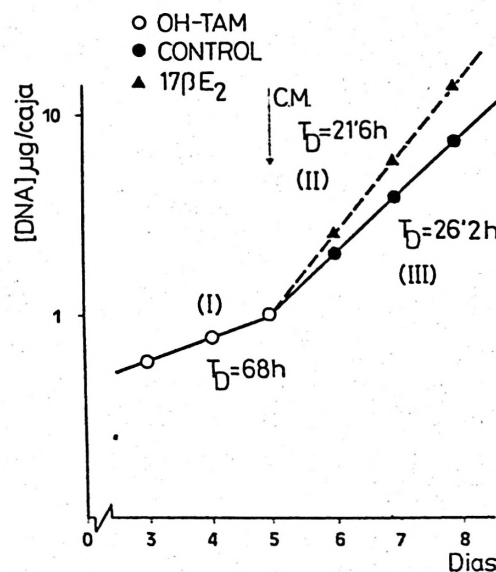


Fig. 2. Transformación semilogarítmica de la cinética de crecimiento celular MCF-7.

Las células cultivadas en presencia de OH-TAM, 10^{-7} M (I), al 5.º día de cultivo son expuestas a medio estándar, MEM+FCS (III) o medio MEM+FCS suplementado con $17\text{-}\beta\text{-E}_2$, 10^{-7} M , (II). Los resultados se expresan en μg de DNA por caja. Cada valor representa la media de seis determinaciones.

mento paralelo (grupo control) en el que, tras la acción del OH-TAM durante 96 horas, el medio de cultivo se substituyó por MEM+FCS sin $17\text{-}\beta\text{-E}_2$.

Discusión

El crecimiento de las células MCF-7 cultivadas en monocapa se ajusta a una curva sigmoidal típica. El tiempo empleado por una población celular para duplicar el número de sus elementos (T_D) puede ser deducido de la fase exponencial de la curva de crecimiento. En las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo, para la línea celular MCF-7, T_D ha resultado ser de $40,0 \pm 5,7$ h, cifra que concuerda con la referida por otros autores (1, 17, 27). Este parámetro cinético, T_D , no es necesariamente igual al Tiempo de Ciclo, T_C , empleado por cada uno de los elementos celulares del cultivo para llevar a cabo un ciclo divisorio completo. Para MCF-7, se ha podido demostrar que T_C es igual a 21,3 h (3). La existencia de elementos constituyentes de la población celular en fase no proliferativa del ciclo (fase G_0) y la presencia de subpoblaciones celulares con T_C mayores (21, 23) pueden explicar la disparidad entre ambos parámetros.

La adición de cantidades variables de $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ al medio de cultivo en el que se mantuvieron las células MCF-7 permite demostrar que, tanto a dosis farmacológicas ($10^{-6}/10^{-7}$ M) como a niveles fisiológicos ($10^{-8}/10^{-9}$ M) (tabla I), el estrógeno no tiene efecto sobre la proliferación celular. Por otra parte, el tiempo empleado por ambas poblaciones celulares —la sometida al efecto del estradiol y el grupo control (fig. 1)— para duplicar el número de sus elementos resultó ser idéntico (T_D Grupo $17\text{-}\beta\text{-E}_2 = 40,3 \pm 3,9$ h = T_D grupo control).

Este fenómeno, aparentemente paradójico, es un hallazgo común en muchos laboratorios que utilizan como modelo

tumoral la línea MCF-7 (4, 6, 17, 19, 26) y puede ser explicado considerando que, en las condiciones de cultivo celular en medio suplementado con un 10% de FCS, existen hormonas esteroideas libres (9) o bien derivados sulfo-glucoconjugados —si el suero ha sido tratado con DDC (25)— que pueden ser utilizadas directamente o previa transformación enzimática por las células MCF-7. En esta situación la capacidad proliferativa celular es máxima y ningún estímulo hormonal consigue inducir un crecimiento superior al que poseen los grupos control. No obstante, ciertas modificaciones de las condiciones de cultivo como la adaptación celular a medio libres de suero (1, 12), la utilización de éste en porcentajes distintos al de mantenimiento (12, 17, 19) o el empleo de suero humano fresco (5, 17) permiten poner de manifiesto el efecto proliferativo del E_2 .

Los antiestrógenos (AE) del grupo tri-feniletileno que se han estudiado en este trabajo inhiben la proliferación celular MCF-7 en una relación dosis-dependiente (tabla I). El tamoxifeno y su derivado el hidroxitamoxifeno se enlazan al receptor estrogénico compitiendo con el $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ (11, 13). De la afinidad de este enlace depende la acción antihormonal y como consecuencia de ella es posible observar una acusada disminución de la proliferación de las células MCF-7 (14) encontrándose, en estas condiciones (OH-TAM 10^{-7} M) (fig. 2), valores del T_D de la población celular de hasta 70 horas.

Teniendo en cuenta la inhibición del enlace entre el receptor y el estradiol ocasionada por los antiestrógenos, la formación del complejo Receptor-AE, la reversibilidad de este enlace y la afinidad relativa de una y otra molécula (E_2 y AE) por el receptor, es fácil suponer que la presencia simultánea de AE y E_2 en el medio de cultivo celular conduzca a la formación predominante del complejo E_2 -RE y al desarrollo de la acción metabólica de la hormona. Este hecho puede analizarse a

través del estudio de la cinética de proliferación celular. En efecto, como puede comprobarse en la experiencia en la que las células MCF-7 fueron sometidas a la acción conjunta de $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ y OH-TAM 10^{-7} (fig. 1), el crecimiento celular viene impuesto por el estrógeno, obteniéndose, en estas condiciones, niveles finales de DNA y tiempos de duplicación idénticos a los encontrados en el grupo $17\text{-}\beta\text{-E}_2$. Este fenómeno de «rescate estrogénico» resulta también dependiente de la dosis de E_2 y AE (16) y parece determinado por la afinidad que estrógeno y AE presentan por la macromolécula receptora.

El fenómeno de rescate estrogénico puede observarse igualmente cuando el esquema de combinación estrógeno/antiestrógeno y su acción sobre el cultivo no se realiza de manera simultánea sino secuencial. La presencia de OH-TAM, durante 72 horas, a concentraciones finales de 10^{-7} M (fig. 2) origina una disminución de la proliferación celular por enlentecimiento o bloqueo de la fase G_1 (14, 23), efecto que se demuestra claramente por la disminución del tiempo de duplicación celular ($T_D = 68,0 \pm 7,1$ horas). Como consecuencia de esta acción se produce una «sincronización» del cultivo celular y cuando, alcanzada la misma, las células se liberan del OH-TAM por simple cambio de medio (utilizando MEM+FCS o MEM+FCS+ $17\text{-}\beta\text{-E}_2$) es posible poner de manifiesto determinados efectos celulares cuando las experiencias se realizan sobre células no sincrónicas. En efecto, los valores del tiempo de duplicación encontrados para los grupos de control (MEM+FCS) y estradiol (MEM+FCS+ $17\text{-}\beta\text{-E}_2$) fueron, 26,2 y 21,6 h respectivamente, resultados que se corresponden con el valor encontrado para el tiempo mínimo de ciclo de las células MCF-7. Ello hace pensar que la progresión del grupo celular a lo largo del ciclo ocurre simultáneamente y que la proliferación de sus componentes viene condicionada por la renovación de nu-

trientes. Finalmente, como quiera que las diferencias entre los valores del parámetro que define la fase exponencial del crecimiento celular de uno y otro grupo se traducen, el cabo de 72 h, por una densidad de elementos celulares superior en el grupo tratado con $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ que en el grupo control es evidente que esta molécula estimula eficazmente el proceso de proliferación celular de la línea hormonodependiente MCF-7.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. G. Leclercq, del Institut Jules Bordet (Bruselas), la cesión de la línea celular MCF-7.

Resumen

La línea celular hormonodependiente MCF-7 constituye un modelo tumoral de cáncer mamario cuya cinética de proliferación, sometida a influencias hormonales diversas y antagónicas entre sí (estrógenos y antiestrógenos, respectivamente) permite conocer algunos de los mecanismos de acción de tales sustancias. En el presente trabajo, llevado a cabo tras el cultivo de células MCF-7 en condiciones experimentales precisas, se demuestra que los antiestrógenos se oponen al crecimiento de la población cultivada, cuyos elementos celulares, en presencia de OH-TAM, duplican prácticamente el valor del parámetro T_D (Tiempo de Duplicación); que el estradiol anula este efecto estimulando, clara y positivamente, el crecimiento de la población, tanto si el antiestrógeno se administra a los cultivos celulares previa o simultáneamente al mismo; y que la observación experimental de la acción estrogénica exige, por último, de condiciones o medios de cultivos determinados sin los cuales sus efectos pueden no quedar de manifiesto.

Palabras clave: Células MCF-7, Crecimiento celular, Estrógenos, Antiestrógenos.

Bibliografía

1. Barner, D. y Sato, G.: *Nature*, 281, 388-389, 1979.

2. Brooks, S. C., Locke, E. R. y Soule, H. D.: *J. Biol. Chem.*, 248, 6521-6523, 1973.
3. Burton, K.: *Biochem. J.*, 62, 315-323, 1956.
4. Butler, W. B., Kelsey, W. H. y Goran, N.: *Cancer Res.*, 41, 82-88, 1981.
5. Devleeschouwer, N., Olea-Serrano, N., Leclercq, et al.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 464, 493-495, 1986.
6. Edwards, D. P., Murphy, S. R. y McGuire, W.: *Cancer Res.*, 40, 1722-1726, 1980.
7. Engel, L. W. y Young, N. A.: *Cancer Res.*, 38, 4327-4339, 1978.
8. Greene, G. L. y Press, M. F.: *J. Steroid. Biochem.*, 24, 1-7, 1986.
9. Hoffmann, B., Wagner, W. C. y Giménez, T.: *Biol. Reprod.*, 15, 126-133, 1976.
10. Horwitz, K. B., Koseki, Y. y McGuire, W. L.: *Endocrinology*, 90, 1071-1078, 1978.
11. Jordan, V. C.: *Breast Cancer Res. Treat.*, 2, 123-138, 1982.
12. Lippman, M. E., Dickson, R. B., Kasid, A., et al.: *J. Steroid Biochem.*, 24, 147-154, 1986.
13. Lippman, M. y Kasid, A.: *Cancer Treat. Rep.*, 68, 265-279, 1984.
14. Lykkesfeldt, A. E., Larsen, J. K. y Christensen, I. J.: *Br. J. Cancer*, 49, 717-722, 1984.
15. Olea, N., Devleeschouwer, N. y Leclercq, G.: *Rev. esp. Fisiol.*, 41, 373-380, 1985.
16. Osborne, C. K.: *Cancer Res.*, 44, 1433-1439, 1984.
17. Page, M. J., Field, J. K. y Everett, N. P.: *Cancer Res.*, 43, 1244-1250, 1985.
18. Rochefort, H., Capony, F., García, M. et al.: En «Clinical Interest of steroid hormone receptors in Breast Cancer» (G. Leclercq, S. Toma, R. Paridans y J. C. Heuson. eds.). Springer-Verlag, Berlín, 1984, 289-294.
19. Soto, A. M. y Sonnenchein, C.: *J. Steroid. Biochem.*, 23, 87-94, 1985.
20. Soule, H. D., Vázquez, J. Long, A. et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 1409-1416, 1973.
21. Sutherland, R. L., Hall, R. E. y Taylor, W.: *Cancer Res.*, 43, 3988-4006, 1983.
22. Sutherland, R. L., Reddel, R. R. y Green, M. D.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19, 309-320, 1983.
23. Taylor, I. W., Hodson, P. J., Green, M. D. et al.: *Cancer Res.*, 43, 4007-4010, 1983.
24. Vic, P., Vignon, F., Derocq, M. et al.: *Cancer Res.*, 42, 667-673, 1982.
25. Vignon, F., Terqui, M., Westley, B. et al.: *Endocrinology*, 106, 1079-1086, 1980.
26. Villalobos, M.: Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina de Granada, 1986.
27. Weichselbaum, R. R., Hellman, S., Piro, A. J. et al.: *Cancer Res.*, 38, 2339-2342, 1978.