

Cinética de proliferación en cultivos celulares MCF-7. II. Sincronización y reclutamiento celular hormonalmente-inducidos

N. Olea*, M. Villalobos, J. Thomas, 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)

N. OLEA, M. VILLALOBOS, J. THOMAS, J. D. LOPEZ-GONZALEZ, J. M. RUIZ DE ALMODOVAR and V. PEDRAZA. *Proliferation Kinetics in MCF-7 Cell Culture. II. Hormonal Induction of Cellular Synchronism and Recruitment.* Rev. esp. Fisiol., 43 (2), 215-222, 1987.

The culture of MCF-7 cells in well known experimental conditions and the analysis of the cellular uptake of $^3\text{HTdR}$ under the influence of estrogens ($17\text{-}\beta\text{-E}_2$) and antiestrogens (OH-TAM) at precise concentration levels ($10^{-6}/10^{-9}$ M) have made possible the study of the growing kinetic process of the cellular cultured population and the determination of the action of such hormonal preparations on the same process. The main findings are as follows: the growing rate of the cultured cells appears to slow down in presence of OH-TAM; the reason for this slowing growth seems to be the «blockade» of the cultured cells in the last part of G_1 phase, a phenomenon that has proved to be dose-dependent; by the stimulating effect of the $17\text{-}\beta\text{-E}_2$, the MCF-7 cells, synchronized in G_1 , progress simultaneously in their vital cycle during, at least, three divisory cycles; and this «recruitment» effect seems to be characteristic of the estrogen since the synchronization process fades or disappears when the $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ is absent from the culture medium.

Key words: Breast cancer MCF-7 cells, Estrogens, Antiestrogens, Cellular synchronization. Cellular recruitment.

La terapéutica del cáncer de mama se ha visto reforzada en la última década con la utilización de agentes farmacológicos de acción antiestrogénica (9). Los mecanismos que, a nivel molecular, explican la acción de los antiestrógenos empiezan a ser conocidos (6). El tamoxifeno y otros

agentes antiestrogénicos, como nafoxidina y trioxifeno, actúan sobre el ciclo divisorio de las células tumorales, bloqueándolo preferencialmente en fase G_1 (7, 10, 13, 15). Característica fundamental de este fenómeno es su reversibilidad. Los estrógenos pueden «rescatar» a las células pretratadas con tamoxifeno y hacerlas progresar «sincrónicamente» en el ciclo celular (4, 12).

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

Utilizando como modelo experimental cultivos celulares de MCF-7, procedente de un adenocarcinoma humano (11), hemos analizado el grado y la persistencia del sincronismo producido por el antiestrógeno hidroxitamoxifeno a través de la evolución en el tiempo de los índices de incorporación de timidina tritiada. Los resultados obtenidos para la captación de timidina por las células MCF-7, en presencia de dosis farmacológicas de estradiol, completan el protocolo de trabajo del presente estudio.

Material y Métodos

Cultivos celulares. — El cultivo celular se desarrolló según se ha descrito en un trabajo anterior (16).

Incorporación de timidina tritiada ($^3\text{HTdR}$). — La incubación celular con $^3\text{HTdR}$ (Amersham, Gran Bretaña) (1 $\mu\text{Ci/ml}$) se realizó en medio MEM no suplementado con FCS, limitando el tiempo de exposición de las células al precursor marcado a 1 h. Transcurrido este tiempo las células se lavaron con una solución salina, se eliminó el líquido de lavado y se trató el tapiz con ácido tricloroacético al 5% durante 30 min a la temperatura de 4°C. El procedimiento descrito se repitió dos veces más y a continuación el tapiz se lavó con etanol absoluto para eliminar la $^3\text{HTdR}$ no enlazada al DNA y fijar las células al soporte. Por último las células quedaron expuestas a la acción del NaOH 1N durante 45 minutos a 37°C (con lo que se solubilizó todo el material celular residual a las etapas de lavado previas) y una alícuota de esta solución, previamente neutralizada, se sometió a conteo utilizando como líquido de centelleo 4 ml de Normascint (Scharlau). El conocimiento del número de células o su contenido en DNA, facilitó la expresión de los resultados de incorporación de $^3\text{HTdR}$, bien de manera absoluta

(DPM/caja), o bien en forma relativa (DPM/ μg DNA).

Resultados

El crecimiento de las células MCF-7 en condiciones de cultivo estándar se ofrece en la figura 1 en la cual se incluye la curva de incorporación de $^3\text{HTdR}$ al tapiz celular para cada tiempo y los cambios de medio de cultivo.

La cinética de proliferación de grupos celulares expuestos a la acción del antiestrógeno OH-TAM, en relación a los datos de proliferación celular del grupo control se muestra en la fig. 2, en la que la cantidad de DNA se representa en función del tiempo. La inhibición del crecimiento celular del grupo tratado con OH-TAM se manifiesta por las diferencias que se alcanzan en los niveles de DNA medidos a las 144 h de cultivo celular entre los grupos OH-TAM y control.

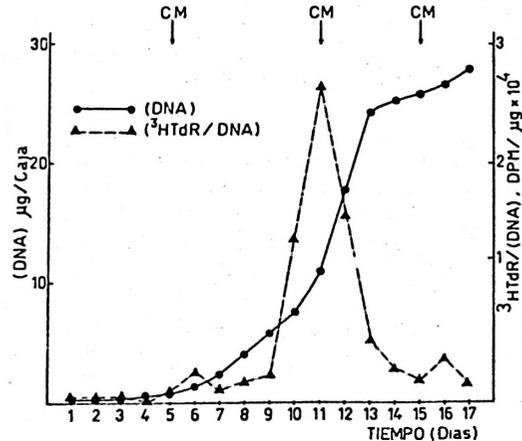


Fig. 1. Crecimiento celular de la línea MCF-7 en medio MEM suplementado con 10% de FCS. Las células son subcultivadas en cajas T-25 durante 17 días. Cada 24 horas se hace la determinación del DNA, representado en la gráfica en función del tiempo de cultivo. Se indican también los índices de incorporación de $^3\text{HTdR}$ expresados como DPM de $^3\text{HTdR}/\mu\text{g}$ de DNA. El cambio de medio nutriente se indica como CM en la gráfica.

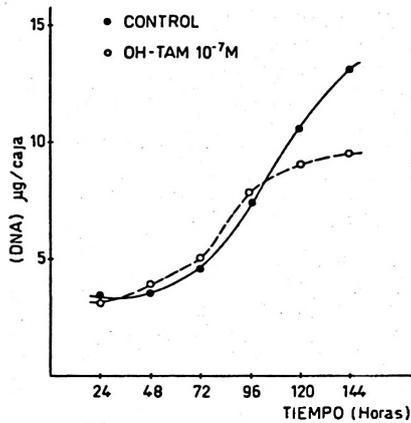


Fig. 2. Crecimiento celular de la línea MCF-7 en medio MEM+FCS (grupo control) y en medio MEM+FCS suplementado con OH-TAM, 10⁻⁷M (grupo OH-TAM).

Las células son subcultivadas durante 144 horas en discos de 35 mm de diámetro. Los resultados se expresan en µg de DNA/caja de cultivo. Cada valor representa la media de seis determinaciones.

Para valorar el carácter dosis-dependiente (3) de la acción de los antiestrógenos sobre la incorporación de ³HTdR a células MCF-7 hemos realizado determinados experimentos tratando de comparar las tasas de ³HTdR internalizadas en grupos celulares tratados con diferentes dosis de OH-tamoxifeno (10⁻⁶ a

Tabla I. Efecto del hidroxitamoxifeno (OH-TAM) sobre la incorporación de timidina tritiada (³HTdR) en grupos celulares (MCF-7) para subcultivos de 96 horas.

Se expresa el valor medio ± la desviación estándar (n = 6).

[OH-TAM]	³ HTdR (dpm. 10 ⁻³)
10 ⁻⁶ M	79.7 ± 3.1*
10 ⁻⁷ M	96.9 ± 4.7*
10 ⁻⁸ M	118.8 ± 8.7*
10 ⁻⁹ M	211.4 ± 2.9
CONTROL	224.1 ± 2.9

*Diferencias significativas respecto al control.

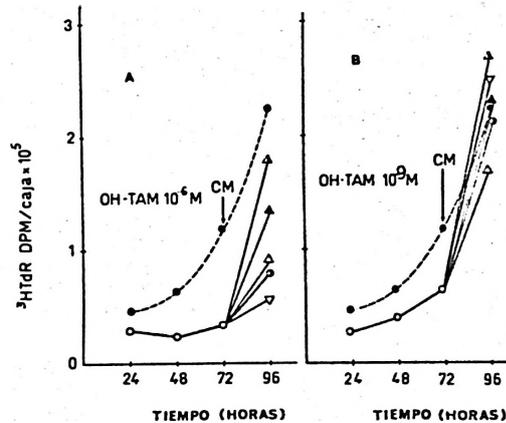


Fig. 3. Efecto del OH-TAM sobre la incorporación de ³HTdR en células MCF-7.

Las células son subcultivadas en medio MEM+FCS (grupo control, ●—●) durante 96 horas, con cambio de medio a las 72 horas y medida diaria de la incorporación de ³HTdR. Sobre grupos celulares tratados con OH-TAM a concentraciones de 10⁻⁶ M (A) y 10⁻⁹ M (B) se investiga la capacidad de incorporación de ³HTdR, durante la exposición al antiestrógeno (○—○) y tras el cambio de medio nutricional por MEM+FCS (●—●) o MEM+FCS+17-β-E₂ a diferentes concentraciones (Δ 10⁻⁶ M; ▲ 10⁻⁷ M; ▲ 10⁻⁸ M; ▽ 10⁻⁹ M).

10⁻⁹ M) con los resultados encontrados en cultivos no expuestos a la acción del antiestrógeno (tabla I). La figura 3 expresa la evolución en el tiempo de los índices de incorporación del precursor tritiado en una y otra situación. Los experimentos se completaron, por otra parte, procediendo tras 72 h de cultivo, al cambio del medio nutricional por otro conteniendo estradiol en concentraciones variables. Los resultados de la incorporación del ³HTdR a las 24 h de la renovación de nutrientes definen, a este respecto, el último punto de las gráficas anteriores.

Con idéntico protocolo experimental, es decir, exposición secuencial a antiestrógenos primero, durante las primeras 72 horas y estrógenos, o su vehículo (grupo control) después, hasta completar las 144

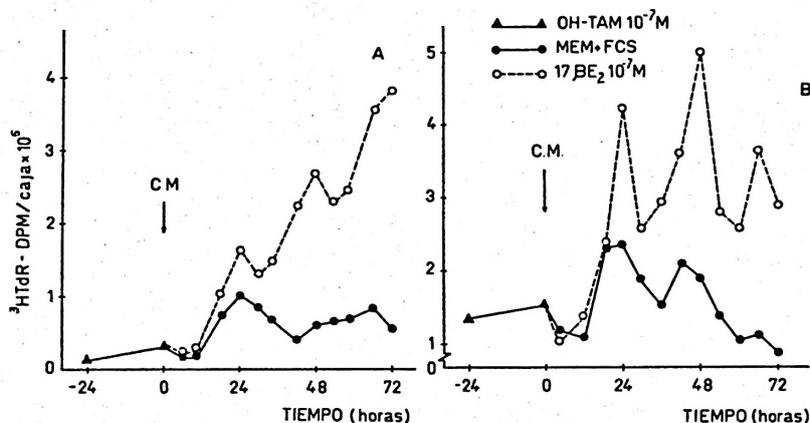


Fig. 4. Efecto de la exposición secuencial OH-TAM/17- β -E₂ sobre la incorporación de ³HTdR en células MCF-7 cultivadas en situación de baja (A) y alta (B) densidad de siembra inicial.

Las células son subcultivadas en cajas T-25, tratadas con OH-TAM, 10⁻⁷ M durante 72 horas, con medida diaria de la incorporación de ³HTdR. La gráfica incluye sólo las 24 horas finales del tratamiento (-24). Posteriormente, (Hora 0), se procede al cambio de medio nutriente (C.M.) y se definen grupos celulares cultivados en MEM+FCS+17- β -E₂ 10⁻⁷ M (grupo E₂) y MEM+FCS (grupo control). Cada 6 horas y hasta las 72 horas de cultivo se procede a la medida de la capacidad de incorporación de ³HTdR.

horas de cultivo y utilizando para ambas moléculas (OH-TAM y 17- β -E₂) igual concentración (10⁻⁷ M), se han determinado los índices de incorporación de timidina cada 6 horas. Los resultados obtenidos para dos situaciones experimentales distintas (baja densidad de siembra y alta densidad de siembra) se muestran en la figura 4.

Discusión

La medida de las tasas de incorporación de ³HTdR y la cuantificación simultánea del DNA, realizadas sobre células MCF-7 en cultivo, han hecho posible el estudio de la evolución en el tiempo, de los índices relativos de timidina ligada específicamente. En las fases iniciales de cultivo, cuando la densidad celular es baja, los índices de incorporación de ³HTdR permanecen constantes (Fase Lag). El crecimiento de la población, en términos absolutos, es escaso hasta el tercer día de subcultivo. El incremento del ritmo de

proliferación celular (fase exponencial de crecimiento), probablemente debido a los efectos mediados por factores de crecimiento segregados al medio de cultivo por las propias células (2, 5), se acompaña de un cambio manifiesto de la pendiente de la curva que relaciona el índice de incorporación de ³HTdR con el tiempo. El máximo de incorporación del precursor se alcanza en 11 días de subcultivo. A partir de aquí la reducción de la proporción de células en ciclo divisorio es progresiva y alcanza un valor mínimo, situado en torno al día 15 de cultivo, que resulta ser inferior al 10% del valor máximo. No obstante, si el medio de cultivo se renueva en este momento (día 15), vuelve a producirse un aumento del índice de incorporación de ³HTdR al DNA (día 16), fenómeno que puede estar en relación con la presencia en el medio fresco de factores promotores del crecimiento celular (10).

El efecto del hidroxitamoxifeno sobre la incorporación de ³HTdR al DNA de los componentes celulares de cultivo

MCF-7, puestos en contacto con el antiestrógeno, es un fenómeno que antecede a la objetivación de la disminución del crecimiento celular valorado mediante cuantificación del DNA. Los experimentos realizados por TAYLOR *et al.* (15) han demostrado, que el OH-TAM actúa como un agente fase dependiente, disminuyendo la proliferación celular por estancamiento de las células en fase G₁. Este mecanismo es responsable de la «sincronización» el cultivo celular y puede ser demostrado por la reducción que experimentan los niveles de síntesis del DNA en los grupos celulares tratados con OH-TAM (fig. 2). A las 24 h de subcultivo ya son evidenciables diferencias de ³HTdR incorporada por los grupos celulares OH-TAM y control (fig. 3). A las 96 h de subcultivo el DNA medido en grupos celulares OH-TAM y control es idéntico, mientras que las tasas de incorporación de ³HTdR son sensiblemente más bajas para el grupo tratado con OH-TAM (tabla I). Este fenómeno parece ser, por otra parte, dependiente de la dosis de antiestrógeno ensayada.

Para investigar el efecto del 17-β-E₂ sobre una población «sincronizada» se someten a la acción de concentraciones variables de 17-β-E₂, cultivos celulares previamente tratados durante 72 h con OH-TAM.

Puede demostrarse que el «reclutamiento» celular estradiol-inducido se desarrolla tras la exposición de las células MCF-7 al estrógeno, a través del análisis de la capacidad de incorporación de ³HTdR por el cultivo. Así, si transcurridas 72 h de subcultivo en presencia de OH-TAM, se cambia el medio celular por otro fresco que contenga concentraciones variables de 17-β-E₂ (10⁻⁶ a 10⁻⁹ M), o por medio no suplementado con estrógenos (control), es posible demostrar que la incorporación de ³HTdR está sometida a la influencia de los agentes hormonales ensayados en una forma dependiente de las dosis de antiestrógeno

y estrógeno utilizadas. El análisis de los resultados muestra que el simple cambio de medio del grupo celular MCF-7 sometido a la acción antiestrogénica, provoca un acusado incremento del índice proliferativo celular al mismo tiempo que las tasas de ³HTdR incorporada por cada grupo ensayado aparecen en estrecha relación, de una parte, con los niveles de concentración de OH-TAM puesto en el cultivo y de la otra con la presencia, mayor o menor, de 17-β-E₂ en el mismo. En el grupo OH-TAM 10⁻⁹ M, el índice de incorporación de ³HTdR es tres veces superior al encontrado en el grupo OH-TAM/10⁻⁶ M cuando la renovación del medio se efectúa utilizando MEM+FCS. La dependencia respecto de la dosis de OH-TAM apareció igualmente clara, resultando los índices de ³HTdR progresivamente crecientes de acuerdo con el siguiente orden de grupo (OH-TAM) = 10⁻⁶ M < (OH-TAM) = 10⁻⁷ M < (OH-TAM) = 10⁻⁸ M < (OH-TAM) = 10⁻⁹ M. Por otra parte, en todos los grupos celulares, el efecto del 17-β-E₂ fue positivo, alcanzando un máximo a concentraciones de estrógeno comprendidas entre 10⁻⁷ M y 10⁻⁸ M.

El grado de sincronización celular conseguido en líneas celulares hormonodependientes sometidas a la acción secuencial de antiestrógenos primero y estrógenos, después, es de tal magnitud que, para determinadas combinaciones de estas sustancias, la mayor parte de las células constituyentes de la población (aproximadamente del 85 al 90%) (12, 15), se encuentran en fase S tras 24 horas de tratamiento con E₂, cifra que concuerda con el valor de este mismo parámetro medido mediante el cálculo del tiempo de duplicación de células MCF-7 sincronizadas (16) y con el calculado mediante técnicas de citometría de flujo (15). De los resultados aquí expuestos se puede concluir que el fenómeno de sincronización celular provocado por el OH-TAM es real; que las células MCF-7, sensibles a la acción

del $17\text{-}\beta\text{-E}_2$, progresan tras el cambio de medio, de manera simultánea, en su ciclo vital, alcanzándose a las 24 horas un pico de máxima incorporación de $^3\text{HTdR}$ que corresponde a la fase S del mismo; que a el sincronismo se mantiene, al menos, a lo largo de tres períodos mitóticos siendo igual a 24 horas el tiempo calculado por la distancia entre picos, que separa 2 fases S consecutivas; que la sincronización se manifiesta, también, cuando al medio renovado no se adiciona E_2 , aunque la cantidad de timidina incorporada a este grupo celular es en estas condiciones, inferior a la que se enlaza en el grupo celular tratado con estradiol, hecho que puede interpretarse suponiendo que la cantidad de estradiol endógeno presente en el suero fetal sea insuficiente para «reclutar» a todas las células del cultivo que se encuentren en fase G_1 (la incorporación simultánea al ciclo celular de los elementos de este grupo fue, por otra parte, sólo parcial, fenómeno que se refleja, transcurridas las primeras 24 horas, en forma de pérdida del sincronismo celular).

La densidad de elementos celulares del cultivo o, lo que es igual la proximidad del mismo a la zona de confluencia celular influye sobre la magnitud de los procesos de sincronización y reclutamiento descritos. En efecto, para valores de densidad celular cercanos a la denominada «meseta» de crecimiento celular, la sincronización se mantiene sólo parcialmente y durante no más de dos ciclos divisorios completos. Las alturas relativas de los picos correspondientes a la máxima incorporación de $^3\text{HTdR}$ difieren del valor doble que debería separar el primer pico del segundo.

Resumen

El cultivo, en condiciones experimentales definidas, de células hormonodependientes MCF-7 y el análisis de los índices de incorporación del $^3\text{HTdR}$

por las mismas, en presencia de concentraciones conocidas ($10^{-9}\text{M}/10^{-6}\text{M}$) de estrógenos ($17\text{-}\beta\text{-E}_2$) y antiestrógenos, (OH-TAM), respectivamente permiten investigar la cinética del proceso de proliferación de los elementos celulares del cultivo y determinar la acción de los preparados hormonales descritos sobre dicho proceso. Los hallazgos más importantes del presente estudio se pueden resumir así: el crecimiento de la población celular en cultivo resulta enlentecido en presencia de OH-TAM. La causa de este enlentecimiento parece residir en el «bloqueo» de las células cultivadas en la fase final de G_1 , fenómeno que ha resultado ser, dosis-dependiente; por acción del $17\text{-}\beta\text{-E}_2$ las células, sincronizadas en G_1 , progresan simultáneamente en su ciclo vital manteniendo un sincronismo de fase durante, al menos, tres ciclos divisorios. Este efecto de «reclutamiento» celular estradiol-inducido parece característico del estrógeno toda vez que en su ausencia el sincronismo de fase, además de parcial, se atenúa o desaparece en breve tiempo.

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

Bibliografía

1. Burton, K. A.: *Biochem. J.*, 62, 315-323, 1956.
2. Jakesz, R., Smith, C. A., Aitkens, S., et al.: *Cancer Res.*, 44, 619-625, 1984.
3. Lippman, M., Bolan, G. y Huff, K.: *Cancer Res.*, 36, 4595-4601, 1976.
4. Lippman, M., Cassidy, J. y Wesley, M.: *J. Steroid Biochem.*, 23, 1173-1180, 1985.
5. Lippman, M., Dickson, R. B., Kasid, A., et al.: *J. Steroid Biochem.*, 24, 147-154, 1986.
6. Lippman, M. y Kasid, A.: *Cancer Treat. Rep.*, 68, 265-279, 1984.
7. Lykkesfeldt, A. D., Larsen, J. K. y Christensen, I. J.: *Br. J. Cancer*, 49, 717-722, 1984.
8. Maurer, H. R.: *Cell Tissue Kinet.*, 14, 111-115, 1981.
9. Mouridsen, H. T. y Palshof, T.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19, 1753-1770, 1983.
10. Osborne, C. K.: *Cancer Res.*, 43, 1244-1250, 1984.
11. Soule, J. D., Vázquez, J., Long, A., et al.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51, 1409-1416, 1973.
12. Sutherland, R. L., Hall, R. E. y Taylor, W.: *Cancer Res.*, 43, 3998-4006, 1983.
13. Sutherland, R. L., Reddel, R. R. y Green, M.

- D.: *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19, 309-320, 1983.
14. Stubblefield, E., Klevecz, R. y Deaven, L.: *J. Cell. Physiol.*, 69, 345-350, 1967.
15. Taylor, I. W., Hodson, P. J., Green, M. D. *et al.*: *Cancer Res.*, 43, 4007-4010, 1983.
16. Villalobos, M. Olea, N., Gorgojo, L. *et al.*: *Rev. esp. Fisiol.*, 43, 1987.
17. Wezsch, C. W., Calaf, G. y Brennan, M.: *Cancer*, 38, 1272-1281, 1976.

