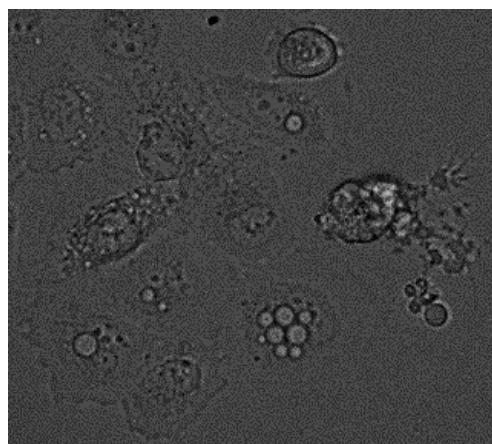




Trabajo de Fin de Grado

Grado de Biotecnología

# **EFECTO DE TRATAMIENTOS COMBINADOS CON HIPERTERMIA SOBRE LA FUNCIÓN OXPHOS EN CÉLULAS TUMORALES**



***“Effect of treatments combined with hyperthermia on OXPHOS function in tumor cells”***

Autora:

Rocío Vázquez Martínez

Directores:

**Dra. Raquel Moreno Loshuertos**

**Dr. Patricio Fernández Silva**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Grupo GENOXPHOS

Curso académico: 2023/2024



## *Agradecimientos*

*A Raquel y Patricio, por abrirme las puertas del departamento y ofrecerme un lugar seguro en el que aprender, equivocarme y disfrutar. Hasta este año seguía sin estar segura si el laboratorio era mi lugar, si había escogido bien. Ahora puedo decir con sonrisas y lágrimas, que estoy en el lugar correcto y que me habéis dado simplemente el lugar perfecto para descubrirlo. Sois unos grandes profesores e investigadores, trabajáis duro cada día y os dais a los alumnos. Gracias por enseñarme tanto incondicionalmente. Me queda todavía muchísimo por aprender y espero que parte de ese aprendizaje siga siendo a vuestro lado.*

*A Ángel, por ver la ilusión en los ojos de una niña que quería aprender y decidir que valía la pena darme una oportunidad. Gracias por nutrir mi curiosidad y por darme alas para volar alto.*

*A mi familia, mis padres y mi hermana. Gracias por apoyarme siempre en seguir mis sueños y aquello que me hace feliz. Soy consciente que no entendíais la mitad de las cosas que os contaba de lo que estaba haciendo, pero gracias por seguir escuchándome. Gracias por estar orgullosos de mí.*

*A los amigos que me aceptaron el primer año de la carrera sin tener ni idea de lo que se les venía encima y a todos los que han venido después. Gracias por dejarme ser real y aceptarme así. Os merecéis todo lo bueno que os vaya a llegar. A Silvia y Ainielle por siempre estar y jamás iros de mi lado. A los físicos por aceptarme durante mis eternos tiempos de incubación y no cambiar de pasillo. A los geólogos por esperarme a comer a pesar de que las células tardarán una hora más de lo acordado.*

*A las chicas del laboratorio. Gracias por crear un ambiente cómodo en el que poder trabajar. Gracias por estar pendientes, por sonreír y por ayudarme siempre que lo necesitaba.*

*Y finalmente, a mí misma, por seguir el sueño de tu niña interior, luchar por aquello que creías y no rendirte nunca.*



## Abreviaturas

<u>Acetil-CoA</u>	Acetylcoenzima A	<u>MOPS</u>	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
<u>ATF4</u> activador 4	Factor de transcripción	<u>MTT</u>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
<u>ATP</u>	Trifosfato de Adenosina	<u>mRNA</u>	RNA mensajero
<u>BN-PAGE</u>	<i>Blue Native polyacrylamide gel electrophoresis</i>	<u>NADPH</u>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<u>C</u>	Complejo	<u>NBT</u>	Nitroazul de tetrazolio
<u>cDNA</u>	DNA complementario	<u>NP(s)</u>	Nanopartícula(s)
<u>CIBA</u> Biomédica de Aragón	Centro de Investigación	<u>Nrf2</u>	Factor nuclear eritroide similar al factor 2
<u>CoQ</u>	Coenzima Q	<u>Opa1</u> como GTPasa	Dinamina mitochondrial OPA1
<u>DMEM</u> <i>Medium</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>	<u>OXPHOS</u> oxidativa	Sistema de fosforilación
<u>DMSO</u>	Dimetilsulfóxido	<u>PBS</u>	Tampón de fosfato salino
<u>DNA</u>	Ácido Desoxirribonucleico	<u>pO2</u>	Presión de oxígeno
<u>Drp1</u>	Proteína 1 relacionada con la dinamina	<u>PMSF</u>	Fluoruro de fenilmetsulfonilo
<u>EDTA</u>	Ácido etilendiaminotetraacético	<u>PR</u>	Progesterona
<u>ER</u>	Receptor de estrógenos	<u>PVDF</u>	Fluoruro de polivinilideno
<u>HER2</u>	Factor de crecimiento	<u>qPCR</u> <i>Chain Reaction</i>	<i>Quantitative Polymerase</i>
<u>HIF</u>	Factores inducibles de hipoxia	<u>RNA</u>	Ácido ribonucleico
<u>HIF-1α</u>	Factor 1 alfa inducible por hipoxia	<u>ROS</u>	Especies reactivas de oxígeno
<u>HSP</u>	Proteínas de shock térmico	<u>SCs</u>	Supercomplejos
<u>HT</u>	Hipertermia	<u>SFB</u>	Suero Fetal Bovino
<u>IFP</u>	Presión intravascular	<u>SDS</u>	Dodecil sulfato de sodio
<u>ICAM-1</u> intracelular 1	Molécula de adhesión	<u>T</u>	Tween20
<u>IGA</u>	<i>In Gel Activity</i>	<u>UPR</u> desplegadas	Respuesta a proteínas
<u>Mdivi-1</u>	<i>Selective Dynamin-Related Protein 1 (Drp1) inhibitor</i>	<u>WB</u>	<i>Western Blot</i>



## Índice

1.	Resumen / Abstract.....	9
1.1.	Resumen.....	9
1.2.	Abstract.....	9
2.	Introducción.....	10
2.1.	Mitocondrias y su metabolismo en el cáncer .....	11
2.2.	Terapias anticancerígenas y resistencias .....	12
2.3.	Hipertermia .....	12
2.4.	Perspectivas futuras de la terapia de hipertermia.....	13
3.	Objetivos.....	14
4.	Materiales y métodos.....	15
4.1.	Cultivos celulares.....	15
4.1.1.	Líneas celulares.....	15
4.1.2.	Mantenimiento y expansión de los cultivos celulares .....	15
4.1.3.	Congelación y descongelación celular .....	15
4.1.4.	Cuantificación de la densidad celular mediante conteo con cámara Neubauer .....	16
4.2.	Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR) .....	16
4.3.	Extracción de mitocondrias.....	17
4.4.	Electroforesis en Gel Blue Native-PAGE (BN-PAGE).....	17
4.4.1.	Ensayo de actividad en gel.....	18
4.4.2.	Electrotransferencia e inmunodetección por <i>Western Blot</i> .....	18
4.5.	Ensayos de citotoxicidad mediante reducción de MTT .....	19
4.6.	Análisis estadístico.....	19
5.	Resultados y discusión.....	20
5.1.	Efecto de la temperatura sobre el sistema OXPHOS: Análisis del ensamblaje de SCs mediante Gel Blue Native-PAGE con <i>Western Blot</i> e <i>In Gel Activity</i> .....	20
5.2.	Efecto de la temperatura en la expresión de mRNA: Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR) .....	22
5.3.	Ensayo de la sinergia entre hipertermia y otros tratamientos: Análisis de la actividad metabólica mediante MTT .....	27
5.4.	Análisis del efecto del tratamiento de hipertermia en la morfología celular .....	28
6.	Conclusiones / Conclusions.....	30
6.1.	Conclusiones.....	30
6.2.	Conclusions.....	31
7.	Perspectivas futuras .....	31
8.	Bibliografía.....	31



## **1. Resumen / Abstract**

### **1.1. Resumen**

Poner a punto una nueva terapia anticancerígena ayudaría a combatir la alarmante tasa de mortalidad del cáncer y el desarrollo de resistencias frente a los tratamientos actuales. Para ello, es esencial conocer los mecanismos de la transformación tumoral. Entre estos, destaca la reprogramación metabólica donde sobresale el papel mitocondrial presente en todos los pasos de la oncogénesis. Una propuesta terapéutica prometedora es la hipertermia. La biología tumoral hace que las células cancerosas sean más vulnerables a los efectos del estrés térmico. A pesar de haberse demostrado la efectividad de esta terapia, por el momento la mayoría de los mecanismos mediante los que actúa son desconocidos. Por ello es necesaria más investigación básica para comprender su modo de acción. En este trabajo se ha estudiado como la hipertermia afecta a la organización y actividad del sistema OXPHOS, la expresión génica y estabilidad celular en tres modelos celulares de cáncer de mama que representan diferentes fenotipos tumorales. Todos los resultados obtenidos apuntan a un efecto beneficioso de esta terapia en la lucha contra el cáncer, especialmente para la línea MDA-MB-231. Por otro lado, el impacto de la hipertermia en el microambiente tumoral convierte el calor en un excelente radiosensibilizador y quimiosensibilizador, siendo usada muchas ocasiones como terapia adyuvante para mejorar la eficacia de los tratamientos tradicionales. Se ha tratado de estudiar la sinergia entre la hipertermia y el fármaco Mdiv1 sin obtener resultados prometedores acerca de un efecto positivo en el uso combinado de ambas terapias. Las modalidades actuales de aplicación de hipertermia tradicional presentan desventajas como son la termotolerancia, calentamiento de tejidos adyacentes y la falta de reproducibilidad. Como perspectiva futura surge la hipertermia magnética intracelular basada en el uso de nanopartículas funcionalizadas dirigidas principalmente a la mitocondria, dada su estrecha relación con el proceso oncogénico y la termogénesis celular.

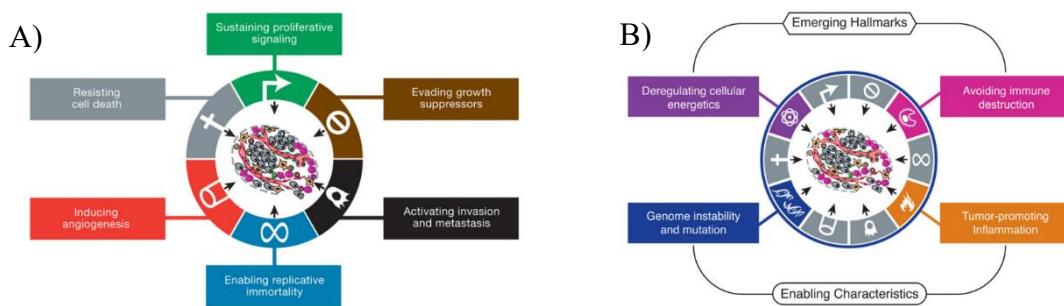
### **1.2. Abstract**

Developing a new anticancer therapy would help face the alarming cancer mortality rate and the development of resistance to current treatments. To do so, it is essential to understand the mechanisms of tumor transformation. Among these mechanisms, metabolic reprogramming stands out, with the mitochondrial role being prominent in all steps of oncogenesis. A promising therapeutic proposal is hyperthermia. The biology of the tumor makes cancer cells more vulnerable to heat. Despite the effectiveness of this therapy being proven, most of the mechanisms by which it acts are currently unknown. Therefore, basic research is needed to understand its mode of action. In this work, the effects of hyperthermia on the organization and activity of the OXPHOS system, gene expression, and cellular stability were studied in three breast cancer cell models representing different tumor phenotypes. All the results obtained point to a beneficial effect of the therapy in the fight against cancer, especially for the MDA-MB-231 cell line. Moreover, the impact of hyperthermia on the tumor microenvironment makes heat an excellent radiosensitizer and chemosensitizer, often used as an adjuvant therapy to improve the efficacy of traditional treatments. The synergy between hyperthermia and the drug Mdiv1 was studied without obtaining promising results regarding a positive effect from the combined use of both therapies. Current modalities of traditional hyperthermia application present disadvantages such as thermotolerance, heating of adjacent tissues, and lack of reproducibility. As a future perspective we find intracellular magnetic hyperthermia based on the use of functionalized nanoparticles mainly targeting the mitochondria, given their close relationship with the oncogenic process and cellular thermogenesis.

## 2. Introducción

Hasta la fecha, el cáncer continúa siendo un problema de salud global. A pesar de los constantes avances en investigación, la tasa de mortalidad por recurrencia y metástasis es elevada. (1)

A lo largo de la historia, se ha tratado de descifrar el origen y mecanismo de la trasformación tumoral teniendo en cuenta que las células cancerosas no inventan nuevos mecanismos, sino que manipulan las vías moleculares existentes para lograr su desarrollo. En 1924, Otto Warburg describió por primera vez cómo las células cancerosas exhiben un metabolismo alterado, metabolizando la glucosa anaeróbicamente, incluso en presencia de oxígeno. (2) Con el paso de los años se han ido desentrañando más rasgos del metabolismo tumoral. En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron seis características distintivas del cáncer que han sido ampliamente aceptadas: mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión de los supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis y activación de invasión y metástasis (*Figura 1 A*). Unos años más tarde, en una nueva revisión, los mismos autores plantearon dos nuevos rasgos: desregulación del metabolismo energético y evasión del ataque inmune; y, tratando de explicar cómo las células adquirían estos, definieron dos capacidades habilitantes: por un lado, la inestabilidad genómica que permite la acumulación de mutaciones y, por otro, la promoción de la inflamación (*Figura 1 B*). (3,4)



**Figura 1.** A) Representación de las seis características distintivas del cáncer propuestas en la perspectiva del año 2000. (3)  
B) Representación de las señales de identidad emergentes sugeridas en la revisión de la primera propuesta, así como las dos características habilitantes del desarrollo tumoral. (4)

Conforme avanzan los conocimientos y las técnicas, se pone de manifiesto la complejidad de la enfermedad y surgen nuevas teorías. Es más, en los últimos años, se ha consolidado la idea de que para entender la biología tumoral no se deben considerar únicamente los rasgos de las células cancerosas, sino que hay que tener en cuenta las contribuciones del “microambiente tumoral” y las interacciones entre ambos. (5)

Las regiones tumorales se caracterizan por un escaso flujo sanguíneo y, unido a ello, una baja presión de oxígeno ( $pO_2$ ) característica de regiones hipóticas y un ambiente acídico. (6,7) Además, presentan una presión intravascular (IFP) más alta como consecuencia de la estructura vascular desorganizada, vasos irregulares, tortuosos y las condiciones alteradas del drenaje linfático.(8) Dentro de los efectos por la condición de hipoxia se encuentra la expresión de los factores inducibles de hipoxia (HIF). Estos factores de transcripción se encargan de modular los genes en respuesta a baja concentración de oxígeno para permitir la supervivencia de las células. Se ha demostrado que, en los tumores, HIF ejerce control sobre la angiogénesis, el metabolismo, la intravasación, la metástasis, las células madre cancerosas, resistencia terapéutica y la evasión inmune. (6,7,9,10) Respecto al bajo pH extracelular, está causado por la alteración del metabolismo de la glucosa que, preferentemente, sufre conversión a lactato

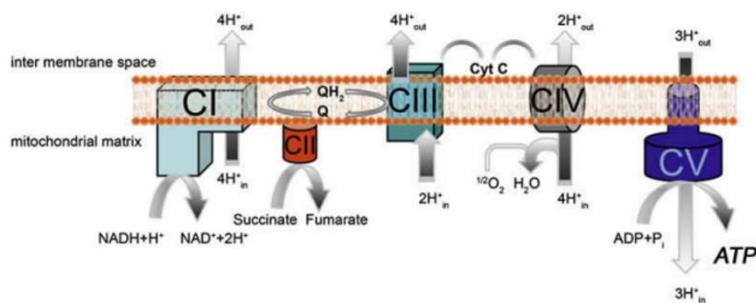
generando en el proceso iones de hidrógeno. Estos iones se acumulan en la región tumoral en vez de eliminarse debido al flujo sanguíneo inadecuado originando el ambiente acídico. (6,7)

## 2.1. Mitocondrias y su metabolismo en el cáncer

La elevada proliferación celular durante el proceso tumoral exige gran demanda de lípidos, aminoácidos y nucleótidos para cuya síntesis se requiere ATP, Acetil-CoA y NADPH. (11) De acuerdo con este punto de vista, son esenciales mitocondrias funcionales para el crecimiento tumoral, en contraste con la observación de Warburg de la posible disfuncionalidad de estos orgánulos en el cáncer. (2)

Las mitocondrias presentan dos membranas, la externa e interna, quedando entre ambas el espacio intermembrana. La membrana interna forma unas invaginaciones conocidas como crestas mitocondriales donde se encuentra el sistema OXPHOS (*Figura 2*). Los componentes de este sistema son: cuatro complejos respiratorios (CI-IV), transportadores móviles de electrones (coenzima Q (CoQ) o ubiquinona y citocromo C), ATP-sintasa (CV) y factores y proteínas mitocondriales adicionales que contribuyen al funcionamiento correcto del sistema. (12)

La forma en la que estos elementos se organizan ha sido extensamente estudiada. Durante un tiempo convivieron dos propuestas de modelos antagónicas. Por un lado, el modelo rígido (1947) que describe el sistema como una entidad fija compuesta por los diferentes complejos respiratorios; y, por otro lado, el modelo de fluidos (1961) en el que los complejos se distribuyen al azar disfrutando de libertad de movimiento dentro de la membrana. Sin embargo, debido a que surgieron nuevas observaciones que no podían ser justificadas con ninguno de los modelos expuestos, se propuso un modelo original denominado modelo de plasticidad (2008). Esta nueva visión acepta la coexistencia de complejos individuales y formando parte de supercomplejos que mantienen un estado dinámico permitiendo cambios en las asociaciones y proporciones según el estado metabólico y el tipo celular, con el objetivo de optimizar el uso de los sustratos disponibles para obtener energía. (13,14)



**Figura 2.** Modelo de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y la ATP-Sintasa (sistema OXPHOS) (14)

Las mitocondrias son cruciales en muchas funciones celulares, principalmente la generación de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa, pero también en otros mecanismos como el estado de oxidación-reducción, niveles de calcio citosólico, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de precursores biosintéticos para diferentes rutas bioquímicas, así como la iniciación de la apoptosis. (12) Dada la importancia de las mitocondrias para los procesos celulares vitales, no es sorprendente que las funciones mitocondriales estén implicadas en todos los pasos de la oncogénesis, incluyendo iniciación, crecimiento, metástasis y respuesta al tratamiento. (2) Para satisfacer los requerimientos metabólicos de las células cancerosas, las mitocondrias actúan en todos los niveles mencionados, incluyendo la producción de oncoproteínas y oncometabolitos, al igual que en la respuesta inflamatoria e inmune. Contribuyendo a esta idea, se ha observado que la eliminación del DNA mitocondrial de las

células cancerosas reduce su tasa de crecimiento y compromete la tumorigénesis. (11,15) En conclusión, las mitocondrias desempeñan un papel central y multifuncional en la progresión de tumores malignos y, dirigirse a las mitocondrias como diana puede proporcionar nuevas oportunidades terapéuticas. (15)

## **2.2. Terapias anticancerígenas y resistencias**

El objetivo principal de los tratamientos contra el cáncer consiste en la erradicación de las células malignas. Durante muchos años, los pacientes tenían pocas alternativas de tratamiento, entre los que se incluían cirugía, radioterapia y quimioterapia, ya sea individualmente o en combinación. Estas terapias se enfrentan a múltiples desafíos como son la administración prolongada, efectos secundarios derivados de la toxicidad celular en las células sanas y desarrollo de resistencias. (16–19)

Las resistencias derivan tanto de la heterogeneidad del tumor, en el que pueden existir subpoblaciones capaces de establecer mecanismos de escape, así como de las propias características del microambiente tumoral. (17) Por ejemplo: i) el escaso flujo sanguíneo reduce la eficacia con la que los agentes quimioterápicos alcanzan la región tumoral; ii) la baja presión de oxígeno limita el efecto de la radioterapia mediado por la producción de ROS que ocasionan daño en el DNA tras irradiar las células, al igual que el mecanismo de acción primario de muchos quimioterápicos ya que las células cancerosas hipóxicas se dividen con menor rapidez; iii) el pH bajo se ha asociado con el deterioro de la función de las células inmunitarias generando una inmunosupresión que permite el crecimiento sin control de los tumores. Además, el ambiente acídico compromete la eficacia terapéutica de muchos agentes quimioterápicos que, al ser bases débiles, se cargan en presencia de pH ácido, lo que les impide cruzar fácilmente la membrana celular; y iv) los tumores con elevada IFP responden menos a la radioterapia, aunque se desconoce la razón. (6,7)

## **2.3. Hipertermia**

Debido a las limitaciones de las terapias actuales, es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos más eficaces, precisos y mínimamente invasivos. (16) Una propuesta prometedora es la hipertermia (HT). Esta estrategia surge a finales del siglo XIX, cuando se reportó una regresión espontánea de tumores malignos en pacientes que sufrián fiebres altas debido a infecciones bacterianas. (20) Desde entonces, se han desarrollado técnicas de calentamiento terapéutico para aplicar al tejido tumoral. (21,22)

Debido a la biología de los tumores, su respuesta fisiológica a la hipertermia no es la misma que la del resto de los tejidos y, de forma natural, las células cancerosas son más vulnerables al estrés por calor que las normales. Los tejidos tumorales se caracterizan por vasos sanguíneos inmaduros con su consecuente reducción del flujo sanguíneo, de forma que no son capaces de disipar el calor aplicado con tanta efectividad, llevando a una acumulación de calor en la región tumoral. Además, la condición de hipoxia y acidosis hace que las células tumorales sean más sensibles al daño térmico. (23–25)

La hipertermia consiste en incrementar la temperatura del tejido tumoral por encima de los 42.5 °C, lo que induce una serie de eventos que llevan a la muerte o sensibilización de las células cancerosas para otras terapias. El proceso de destrucción celular ocasionado por el choque térmico no se comprende perfectamente, pero parece combinar apoptosis, necrosis y catástrofe mitótica.(6) Esto depende en gran medida del tipo celular y de la temperatura aplicada. A pesar de ello, en la literatura se establece un mecanismo que se podría considerar consenso. El calor aplicado genera alteraciones en la estructura del citoesqueleto y en la permeabilidad de la membrana que resulta en un incremento del calcio intracelular. A su vez, la membrana mitocondrial se despolariza, lo que lleva a la generación de especies reactivas de oxígeno. Este cambio en el estado redox junto a la elevada temperatura alteran la estabilidad de las proteínas, por lo que son susceptibles a desplegarse y agregarse. Dentro de las proteínas afectadas se encuentran aquellas que participan en el metabolismo del DNA. Estas incluyen el mecanismo de

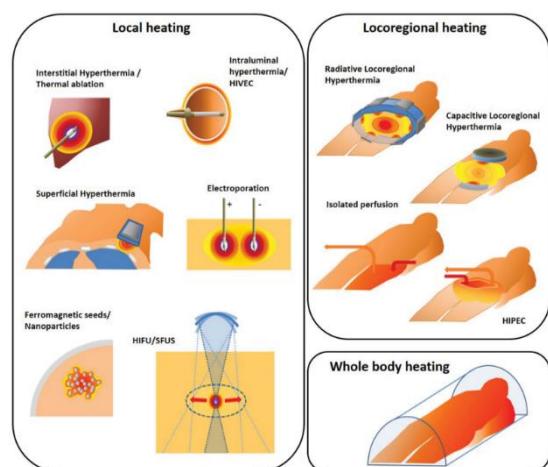
reparación del daño del DNA que, una vez inhibido, provoca aberraciones cromosómicas e inestabilidad genómica. Finalmente, todos estos eventos convergen en la muerte de las células cancerosas. (18,19,25,26)

La hipertermia, además de destruir las células cancerígenas, también genera cambios en el microambiente tumoral. Se ha demostrado que esta terapia tiene el potencial de aumentar el flujo sanguíneo en un intento por disipar el calor aplicado. Este efecto está mediado por el incremento en los niveles de óxido nítrico (NO) que estimulan la vasodilatación. Como respuesta al aumento en el flujo se producen cambios fisiológicos significativos. Estos incluyen: aumento de la oxigenación, restablecimiento de las condiciones normales del pH fisiológico, aumento de la permeabilidad vascular y disminución de la presión del líquido intersticial. (6,7) Además, se ha visto que la hipertermia es capaz de atraer células inmunitarias al área del tumor. (27)

El conjunto de todos los efectos en el ambiente tumoral e interior celular convierte al calor en un excelente radiosensibilizador y quimiosensibilizador. Debido a ello, la hipertermia se utiliza la mayoría de las ocasiones como terapia adyuvante mejorando la eficacia de las terapias anticancerígenas tradicionales. (17,19)

Respecto a las modalidades de tratamiento convencionales para suministrar calor a un tumor, existen tres categorías principales: hipertermia de cuerpo entero, regional y localizada. La elección del método depende principalmente de la localización del tumor. (21) En hipertermia local se emplean sondas que generan calor, cuando el tumor está localizado en una cavidad corporal, o aplicadores superficiales de calor, cuando el tumor está ubicado en la piel o debajo de la piel. La hipertermia regional se utiliza cuando hay que aplicar calor a regiones grandes del cuerpo. En este caso, el procedimiento más común

consiste en la perfusión de líquido caliente a los órganos o extremidades afectadas. Se extrae sangre del paciente, se calienta ex vivo y se bombea de nuevo a la región corporal que contiene el tumor. Finalmente, la hipertermia de cuerpo entero se emplea, sobre todo, en tumores metastásicos. Para lograr el incremento de la temperatura global corporal se usan cámaras térmicas o mantas de agua caliente (*Figura 3*). (21,28,29)



**Figura 3.** Representación gráfica de los diferentes métodos de calentamiento según las modalidades de tratamiento de hipertermia. (21)

Uno de los problemas de la hipertermia es la termotolerancia. Este término hace referencia a los mecanismos de resistencia que pueden proteger a las células sanas del estrés térmico e incrementar su capacidad para recuperarse, como las proteínas de shock térmico (HSP). (30) Las HSP son una familia de proteínas con propiedades de chaperonas que previene el plegamiento incorrecto y la agregación de proteínas durante las respuestas al estrés, por lo que su expresión favorece la recuperación de las células frente al choque térmico. (17)

Otro problema de los métodos de aplicación de hipertermia es que no son específicos para el tumor, son invasivos y difíciles de realizar repetidamente logrando niveles de calentamiento reproducibles. (28,29)

#### 2.4. Perspectivas futuras de la terapia de hipertermia

Dados todos estos retos, a pesar de que la hipertermia ha sido clínicamente aprobada para el tratamiento de algunos tipos de cánceres, es raramente utilizada. (24) Con el objetivo de superar los obstáculos para

usar la hipertermia en la lucha contra el cáncer, surge una nueva visión de terapia basada en la combinación de termometría y nanotecnología. Esta modalidad terapéutica se conoce como hipertermia magnética. Generalmente, se suelen basar en el uso de nanopartículas magnéticas (NPs) de óxido de hierro, principalmente de magnetita,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . (31) El tratamiento implica la inyección de las NPs en la masa tumoral para posteriormente inducir un aumento de la temperatura con aplicación de campos magnéticos alternos. Sin embargo, este sistema presenta desventajas como son el bajo poder de calentamiento intrínseco y efectos secundarios en los tejidos circundantes. Una estrategia para superar estas limitaciones es diseñar las plataformas incluyendo su funcionalización para dirigirlas a orgánulos específicos. Así, se abre una nueva dimensión en el tratamiento contra el cáncer: terapias orgánulo-dirigidas. (32)

Hay ciertos compartimentos celulares que son mejores candidatos como dianas para los tratamientos tumorales, entre los que destaca la mitocondria. Este orgánulo es escogido por su asociación tan cercana con la función celular, la termogénesis y el cáncer; y, en el contexto de hipertermia magnética, porque este orgánulo es altamente sensible a la hipertermia y a las ROS. (32,33) La mitocondria es la fábrica principal del ATP celular y, dado que, su eficacia no es del 100% la energía restante es disipada en forma de calor. Este proceso genera un incremento en la temperatura intracelular local, por lo que se le relaciona directamente con la termogénesis celular. Por si no fuera suficiente, cuando se habla de cáncer, se ha reportado que las mitocondrias de las células cancerosas presentan una temperatura más elevada a las normales. Esto convierte a este orgánulo en una mejor diana, ya que la brecha de temperatura que se tiene que superar para generar daño es menor y, por tanto, más fácil de alcanzar. (29,33) Finalmente, como previamente se ha comentado, la función de las mitocondrias está involucrada en todos los procesos de la oncogénesis. Por todas estas razones, resulta justificado que la mitocondria sea considerada un objetivo crítico en la terapia contra el cáncer. (9)

### 3. Objetivos

En el proceso de búsqueda de nuevas terapias para luchar contra el cáncer se requiere una profunda labor de investigación para conocer sus mecanismos de acción. En este trabajo se pretende estudiar cómo actúa el tratamiento de hipertermia y si existen diferencias en la respuesta al mismo según el tipo de línea celular de tumor de mama. Se ha prestado especial atención a cómo afecta en la función mitocondrial dada su estrecha relación con la tumorigénesis y la termogénesis celular. Este objetivo se ha abordado mediante la consecución de varios objetivos específicos:

- Evaluar qué efecto ejerce la hipertermia sobre la organización de los complejos y supercomplejos de la cadena respiratoria mitocondrial y su actividad, según la línea celular y temperatura aplicada.
- Estudiar cómo la HT influye en la expresión génica de acuerdo con el tratamiento térmico realizado y el tipo celular.
- Analizar cómo repercute la interacción entre el tratamiento de hipertermia y el fármaco Mdiv1 sobre la actividad metabólica celular en las tres líneas celulares, combinando diferentes temperaturas y concentraciones.
- Caracterizar morfológicamente la evolución de las células tras someterlas a un estrés térmico.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Cultivos celulares

#### 4.1.1. Líneas celulares

Se han escogido tres líneas celulares comerciales para el estudio del cáncer de mama: MCF7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231. Todas ellas fueron obtenidas a partir de tejido pleural de tumores mamarios con diferente fenotipo, pudiendo estudiar diferentes tipos de cánceres de mamá.

MDA-MB-231 representa el fenotipo más agresivo siendo triple negativo (no presenta receptores para receptor de estrógenos (ER), progesterona (PR), ni sobreexpresa el factor de crecimiento HER2). Se caracteriza por un metabolismo muy glucolítico, crecimiento rápido y gran capacidad metastásica.

MCF7 representa el fenotipo menos agresivo. Son células triple positivas y se caracterizan por un metabolismo glucolítico y ser la menos invasiva.

MDA-MB-468 con una agresividad intermedia y un fenotipo que tiende a OXPHOS.

#### 4.1.2. Mantenimiento y expansión de los cultivos celulares

El medio de cultivo usado fue DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con alto contenido en glucosa (Gibco<sup>TM</sup> ThermoFisher). Este medio contiene: 4,5 g/L glucosa, L-glutamina 584 mg/L, piruvato de sodio 1 mM y se suplementa con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>TM</sup> ThermoFisher), 1 % de antibiótico (penicilina G 5000 U/mL y estreptomicina (5 µg/mL) (Gibco<sup>TM</sup> ThermoFisher) y 0,1 % de antifúngico (Fungizone Gibco<sup>TM</sup>).

Las células se cultivaron en placas de p60, p100 y p150 (TPP) en función de la cantidad de células necesarias. Todas las manipulaciones celulares se realizaron en campana de flujo laminar vertical (NuAire – Biological Safety Cabinets) que, previa y posteriormente a trabajar en ella, se desinfecta con un periodo de luz UV y limpieza con etanol 70 % de la superficie y material a utilizar. Además, todos los medios de cultivo y productos que iban a ser usados con las células se atemperaron precalentándose en el baño de agua a 37 °C (Selecta). Todos los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatizado (NuAire – Biological) a 37 °C, con un 5 % de CO<sub>2</sub> y aire saturado de humedad.

Diariamente se comprobó el estado de los cultivos empleando un microscopio invertido (Leica) determinando tanto la presencia de posibles contaminaciones como su grado de confluencia. Y, en caso de tomar fotografías durante el seguimiento, se utilizó el microscopio invertido ZOE Fluorescent Cell Image. Cuando se alcanzaba entre un 70-80 % de confluencia se procedía a realizar pasajes usando la tripsinización. Para ello se retira el medio de cultivo, se hace un lavado con tampón de fosfato salino (PBS) (Gibco<sup>TM</sup> ThermoFisher) y se añade tripsina (Sigma Aldrich) 0,05 % EDTA (Panreact) 0,02 % en PBS para despegar las células incubando 5-10 minutos a 37 °C. Una vez pasado el tiempo, se añade medio de cultivo y se recogen las células distribuyéndolas en las placas que se consideren adecuadas según el experimento a realizar y la cantidad celular.

#### 4.1.3. Congelación y descongelación celular

Para llevar a cabo la congelación de células, estas son tripsinizadas, recogidas en 5 mL PBS 10 % SFB y centrifugadas (Nahita Blue) a 1500 rpm 4 min. Tras ello, se retira el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en medio DMEM completo que se añade en un tubo criogénico (TPP) con 10 % de DMSO (dimetilsulfóxido), solvente orgánico que actúa como agente criopreservante (Sigma-Aldrich). Estos viales se depositan en un contenedor de congelación con isopropanol para permitir un enfriamiento

uniforme (descenso de 1 °C/min) que se almacena a -80 °C. Tras 24 horas, los criotubos se almacenan en N<sub>2</sub> líquido hasta su uso.

Para la descongelación de células se diluye el contenido del criotubo en medio DMEM para reducir el efecto tóxico del DMSO. Se siembran inicialmente en placas de 100 mm y tras 24 horas se cambia el medio para retirar completamente el DMSO.

#### 4.1.4. Cuantificación de la densidad celular mediante contejo con cámara Neubauer

Este método se utilizó cuando se requería utilizar una cantidad concreta de células como, por ejemplo, en los ensayos de MTT. Primero se debe obtener el *pellet* celular siguiendo el mismo procedimiento que en la congelación. El *pellet* se resuspende en 1 mL de medio DMEM del que se toma una alícuota de 50 µl a la que se adicionan 50 µl de azul tripano al 0,4 % en NaCl 15 mM. (Fluka). Este compuesto se trata de un colorante vital capaz de introducirse únicamente en las células que presentan la membrana dañada y, por tanto, se consideran no viables; mientras que las vivas quedan brillantes. El contejo se realiza con la cámara de Neubauer y la densidad celular se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad celular } \left( \frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Nº de células viables} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4}{\text{Nº de cuadrantes contados}}$$

## **4.2. Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)**

Con el objetivo de comparar la expresión de diferentes genes con la temperatura y línea celular se realizó una PCR cuantitativa. El tratamiento de hipertermia consistió en incubar 1 hora a 43 °C, 45 °C o 47 °C, dejando como control 37 °C. Tras ello, se recogieron las células por tripsinización, el *pellet* se lavó dos veces con PBS y se guardó a -80 °C hasta su uso.

Para aislar el RNA total se utilizó el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Una vez se consiguió el *pellet* se resuspendió en agua estéril libre de RNasas. Para determinar la concentración y pureza del RNA obtenido se empleó el espectofotómetro NanoValue™. El cDNA se sintetizó, a partir de 1 µg de RNA utilizando el kit NZY First-Strand cDNA synthesis Kit de NZTtech, siguiendo las introducciones del fabricante. Finalmente, la reacción de qPCR se realizó en el equipo QuantStudio 5 en el servicio de secuenciación del CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón) en un volumen de reacción final de 10 µl: 1 µl cDNA (dilución 1/5), 5 µl master mix (Thermo Fisher Scientific), 3,5 µl H<sub>2</sub>O Gibco® y 0,5 µl primers mix (directo y reverso, 5 µM cada uno) (primers usados especificados en *Tabla 1*) (Sigma-Aldrich). El nivel relativo de mRNA se calculó mediante el método  $2^{-\Delta \Delta C_t}$ .

**Tabla 1.** Tabla de los primers utilizados en la qPCR indicando la referencia de GenBank, posición y secuencia.

Gen	Referencia GenBank	Cebador	Posición	Secuencia
HIF-1α	NM_001530	HIF-1α RTF	271-287	ACATCGCGGGGACCGAT
		HIF-1α RTR	534-511	TCAATATCCAATACCAGCATCC
ICAM-1	NM_000201	ICAM-1 RTF	194-213	TGTGACCAGCCCAGTTGTT
		ICAM-1 RTR	434-415	TAAGGTTCTTGCCCCACTGGC
ATF4	NM_001675	ATF4 RTF	140-159	ATGGGTTCTCCAGCGACAAG
		ATF4 RTR	237-218	GAAGGCATCCTCCTTGCTGT
p53	NM_000546	p53 RTF	713-734	CCTCAGCATTATCCGAGTGG
		p53 RTR	840-819	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
Drp1	NM_012062	Drp1 RTF	1447-1469	GATGCCATAGTTGAAGTGGTGAC
		Drp1 RTR	1580-1558	CCACAAGCATCAGCAAAGTCTGG

Nrf2	NM_006164	Nrf2 RTF	422-444	CACATCCAGTCAGAAACCAGTGG
		Nrf2 RTR	533-512	GGAATGTCTGCGCCAAAAGCTG
Opal	NM_130837	Opa1 RTF	1212-1233	GTGGTTGGAGATCAGAGTGCTG
		Opa1 RTR	1341-1320	GAGGACCTTCACTCAGAGTCAC
hActb	NM_001101	Actin RTF	419-438	CGCGAGAAGATGACCCAGAT
		Actin RTR	489-468	ACAGCCTGGATAGCAACGTACA

#### 4.3. Extracción de mitocondrias

Con el objetivo de comparar el ensamblaje y estabilidad de los complejos y supercomplejos mitocondriales con la temperatura y línea celular se realizó la extracción y purificación de mitocondrias para posteriormente llevar a cabo electroforesis en gel Blue Native con la que se realizó un ensayo de actividad en gel (IGA) e inmunodetección con *Western Blot* (WB).

El tratamiento de hipertermia consistió en incubar 1 hora a 45 °C y 47 °C y, como control se tomó 37 °C. Tras el tratamiento se obtuvieron los *pellets* celulares siguiendo el procedimiento de congelación y se lavaron dos veces con PBS antes de congelar a -80 °C hasta su uso. La congelación no sirve solo para conservar la muestra, sino también para facilitar la ruptura posterior de las células.

Para proceder con la extracción de mitocondrias se debe descongelar el *pellet* celular lentamente en hielo. Una vez descongelado, se resuspende en un tampón hipotónico (sacarosa 83 mM, MOPS 10 mM, pH 7,2), cuyo volumen dependerá de la cantidad de células que se tenga en cada caso (7 volúmenes tampón hipotónico:1 volumen *pellet* celular). Se incuba durante 2 minutos en hielo y, a continuación, se homogeniza mediante 10 “pops”. Inmediatamente después se añade 1 volumen de tampón hipertónico (sacarosa 250 mM, MOPS 30 mM, pH 7,2), se mezcla y se centrifuga a 1.000 g durante 5 minutos a 4 °C para eliminar núcleos y células no rotas. Se recoge el sobrenadante en tubos eppendorf (donde se encuentra la fracción mitocondrial) y se centrifuga a 12.500 g durante 2 minutos en una microfuga a 4 °C. El *pellet* resultante (fracción mitocondrial) se resuspende en medio A (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se vuelve a centrifugar a 12.500 g, 2 min, 4 °C. Tras eliminar el sobrenadante, según el tamaño del *pellet* se resuspende en el volumen adecuado de medio BN *sample buffer* (50 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 2 mM ácido aminocaproico, 1 mM EDTA pH = 7,0) para que la concentración final de proteínas sea de 10 mg/mL. A continuación, se añade digitonina, que es un detergente suave para lisar las mitocondrias y que permite ver la formación de supercomplejos (10 % en 50 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 5 mM ácido aminocaproico, 4 mM PMSF) en una proporción de 4 g por g de proteína mitocondrial (0,4 mL/mL de suspensión mitocondrial). Se incuba en hielo durante 5 minutos, se centrifuga a 13.600 g, 22 minutos, 4 °C y se recoge el sobrenadante al que se añade 1/3 del volumen final de tampón de carga Coomassie brilliant Blue G-250 (G-250) al 5 %.

#### 4.4. Electroforesis en Gel Blue Native-PAGE (BN-PAGE)

A partir de las muestras obtenidas tras el proceso de extracción de mitocondrias se montan dos geles BN-PAGE (NativePAGE™ 3 a 12 %, Bis-Tris, 1,0 mm; Invitrogen™) en el soporte y se añade los tampones del cátodo A (NativePAGE™, 1X de Cathode Buffer Additive, Invitrogen™) (50 mM Tricine, 15 mM Bis-Tris pH = 7,0 (4 °C), 0,02 % G-250) y del ánodo (NativePAGE™, 1X de Running Buffer, Invitrogen™) (50 mM Bis-Tris, pH = 7,0). Tras ello, se procede a cargar los geles: uno es para realizar ensayo de actividad en gel en el que se añaden 12,5 µl/pocillo; y otro para hacer inmunodetección con *Western Blot* frente a diferentes anticuerpos, en el que se cargan 10 µl/pocillo.

La electroforesis se realiza en la cámara fría (4-8 °C). Los primeros 30 minutos se deja correr a 80 V, tras lo que se aumenta el voltaje a 155 V limitando la corriente a 12 mA/gel durante otros 30 minutos. Pasado este tiempo, se sustituye el tampón del cátodo A por el B (NativePAGE™, 0,1X de Cathode

Buffer Additive, Invitrogen<sup>TM</sup>) (50 mM tricine, 15 mM Bis-Tris pH = 7,0 (4 °C), 0,02 % G-250), que se caracteriza por tener un 10 % menos de G-250 que el tampón del cátodo A, y se deja correr hasta que el frente llega abajo, aproximadamente hora y media más.

#### 4.4.1. Ensayo de actividad en gel

Tras la separación de los supercomplejos de la cadena respiratoria mediante la electroforesis BN-PAGE se puede evaluar la funcionalidad de estos incubando con la solución adecuada. En este caso, se analizó la actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa) sumergiendo el gel en una solución específica 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 junto con NADH (0,1 mg/mL) y NBT (2,5 mg/mL) protegido de la luz. A los pocos minutos ya se puede observar señal.

#### 4.4.2. Electrotransferencia e inmunodetección por *Western Blot*

Una vez terminada la electroforesis, se realizó un *Western Blot* usando anticuerpos frente a los diferentes complejos mitocondriales (anticuerpos utilizados especificados en *Tabla 2*). El primer paso es transferir las proteínas desde el gel a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Hybond-P de Amersham, Cytiva) utilizando el sistema Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell de Bio-Rad. Para preparar la membrana se debe cortar un trozo de membrana similar al gel que se activa sumergiéndola en metanol 100 % durante 10 segundos; tras ello, se lava en agua destilada por 5 minutos y, finalmente, se equilibra sumergiéndola en tampón de transferencia BSN (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol 20 % (v/v), SDS 0,038 %) durante 10 minutos. Simultáneamente, se sumerge el gel en el mismo tampón por 10 minutos. Una vez los materiales están preparados, se procede a montar el sistema de electrotransferencia en una bandeja llena de BSN, en orden: cara negra del sándwich, esponja, 2 papeles Whatman, gel, membrana, 2 papeles Whatman, esponja y la cara transparente. Los papeles Whatman deben ser previamente humedecidos en BSN y hay que asegurar que no quedan burbujas entre las diferentes capas. Cerrado el sistema se coloca en el soporte con los electrodos y esto en la cubeta a la que se añade un núcleo magnético, un bloque de hielo y se llena con BSN. La electrotransferencia se lleva a cabo en la cámara fría (4-8 °C) con agitación durante 2 horas a 80 V, 1 hora a 100 V o toda la noche a 30 V. Terminada la transferencia, se fijan las proteínas incubando la membrana en metanol 100 % 10 segundos. Tras lo cual se deja sumergida en PBS-T (Tween20 al 0,1 % en PBS) (4 °C) hasta su uso.

Antes de comenzar la inmunodetección, se debe bloquear la membrana mediante incubación en una disolución de 5 % leche desnatada en polvo PBS-T durante al menos 1 hora, con agitación, a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C. Se elimina el exceso de agente bloqueante con lavados cortos en PBS-T y se procede con la inmunodetección. El anticuerpo primario se diluye a la concentración recomendada (*Tabla 2*) en 0,25 % leche desnatada en polvo PBS-T y se incuba 1-4 horas a temperatura ambiente con agitación o toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se retira la solución anterior y se lava la membrana 2 veces con PBS-T durante 10 minutos. Se diluye el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (Invitrogen<sup>TM</sup>) 1:5000 en 0,1 % leche desnatada en polvo PBS-T y se incuba 45-60 minutos con agitación a temperatura ambiente. Se descarta la solución y se lava con PBS-T un lavado de 15 minutos y 3 de 5 minutos.

Para llevar a cabo la detección de proteínas se mezclan dos volúmenes iguales de los reactivos de revelado (Thermo Fisher Scientific). La mezcla se añade sobre la membrana distribuyendo la mezcla uniformemente y se deja incubar 1 minuto. Finalmente, se coloca la membrana entre dos plásticos y se revela usando el instrumento (Amersham Imager 600). Para cuantificar la intensidad de las bandas se utiliza el programa disponible dentro del instrumento.

Con el objetivo de reutilizar la membrana para varias inmunodetecciones se pueden eliminar los anticuerpos previamente usados sumergiendo la membrana en solución de *stripping* (2-mercaptoetanol

100 mM, SDS 2 %, Tris-HCl 1 M pH = 6,7) durante 30 minutos a 58 °C, agitando cada 10 minutos. Tras ello, se lava varias veces con PBS-T a temperatura ambiente y agitación con lo que la membrana se podrá volver a usar.

**Tabla 2.** Tabla de los anticuerpos utilizados en Western Blot indicando la casa comercial, concentración usada y anticuerpo secundario correspondiente.

Complejo	Anticuerpo	Casa comercial	Concentración	Anticuerpo secundario	Casa comercial
I	α-NDUFB6 anticuerpo monoclonal de ratón	Invitrogen™	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen™
II	α-SDHA anticuerpo monoclonal de ratón	Invitrogen™	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen™
III	α-UQCRC2 anticuerpo monoclonal de ratón	Invitrogen™	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen™
IV	α-CO1 anticuerpo monoclonal de ratón	Invitrogen™	1:5000	Anti-IgG de ratón	Invitrogen™

#### 4.5. Ensayos de citotoxicidad mediante reducción de MTT

Para estudiar como interaccionan la combinación de hipertermia y el efecto del fármaco Mdivi1 (Sigma-Aldrich) sobre las tres líneas celulares de trabajo, se realizaron ensayos de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difeniltetrazolio) (34) con los que se puede conocer la actividad metabólica celular.

Se evaluaron dos condiciones diferentes. En la primera se realizó el tratamiento de hipertermia que consistió en dos horas a 43 °C o una hora a 45 °C, tomando 37 °C como control. Tras la incubación se retiró el medio y se añadieron las concentraciones a estudiar del fármaco: 10 µM, 20 µM y 40 µM y, con controles sin tratar, que se dejaron 48 horas actuar. En la segunda condición se invirtió el orden de aplicación, primero se incubó 48 horas con Mdivi1 y tras ello se realizó el tratamiento de hipertermia midiendo inmediatamente después. Para llevar a cabo los ensayos se utilizaron, en cada caso, 3 placas de 96 pocillos una para cada temperatura.

Al finalizar los tratamientos, se retira el contenido de todos los pocillos y se añaden 200 µl de medio DMEM y 50 µl del compuesto MTT (Sigma-Aldrich, 5 mg/mL) dejando las placas a 37 °C entre 1-6 horas. Transcurrido el tiempo, se vacían los pocillos, se adicionan 200 µl de DMSO y se agitan las placas para que los cristales de formazán se disuelvan completamente y la solución quede homogénea. Finalmente, se procede a la lectura de la placa mediante espectrometría midiendo absorbancia a 550 nm con el lector de placas (Biochrom™ EZ Reader 400 Microplate Reader – Fisher scientific). Los datos son obtenidos a partir del software ADAP.

#### 4.6. Análisis estadístico

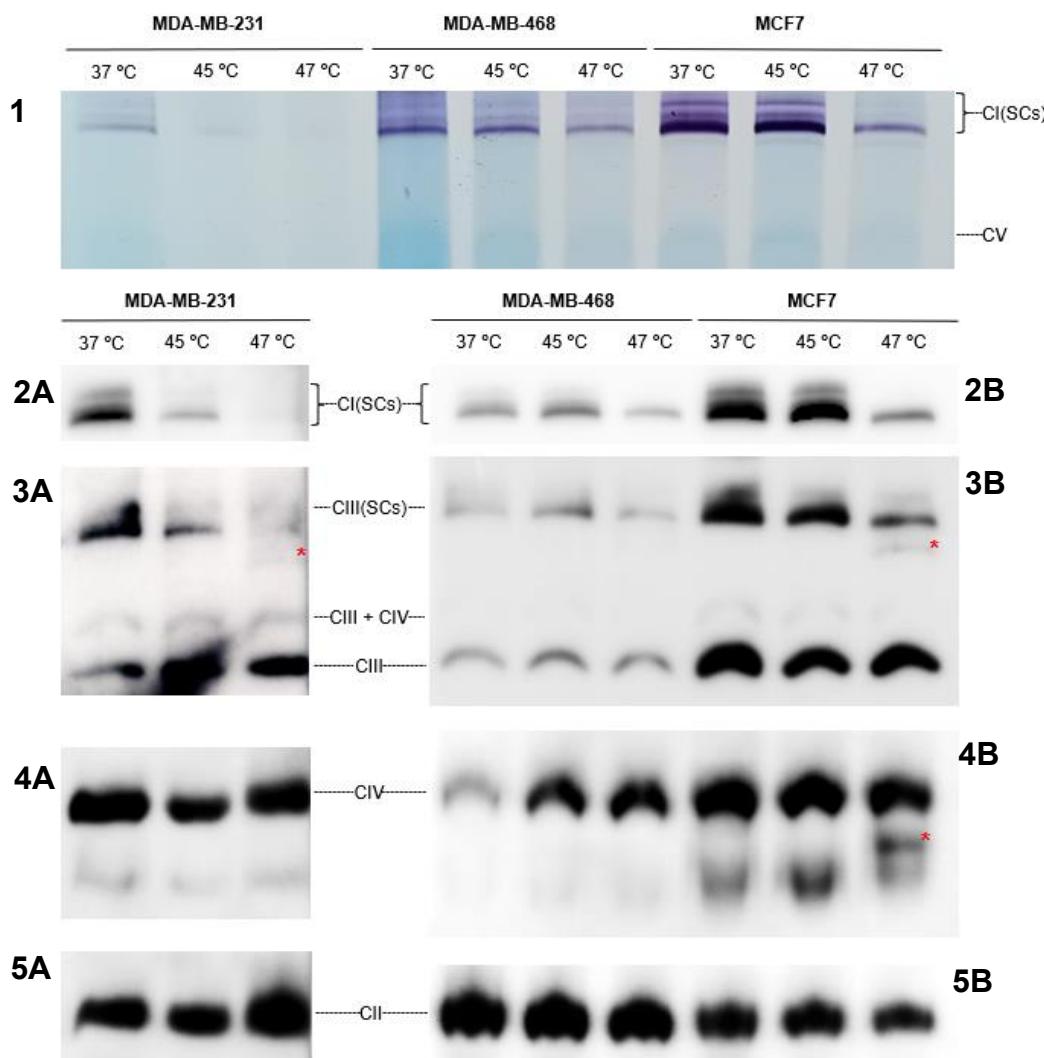
El análisis estadístico de los resultados obtenidos en los diferentes experimentos se realizó mediante el programa GradhPad Prism 8.0.1. Todos los resultados están expresados como medias ± SEM. Para las comparaciones se realizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) bilateral y se han determinado los siguientes criterios para considerar estadísticamente significativo: \* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01 y \*\*\* = p < 0,0001.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Efecto de la temperatura sobre el sistema OXPHOS: Análisis del ensamblaje de SCs mediante Gel Blue Native-PAGE con *Western Blot* e *In Gel Activity*

Con el objetivo de explorar la eficacia de la hipertermia como terapia contra el cáncer y estudiar las posibles diferencias en el efecto del tratamiento según la línea celular, se evaluó la organización y actividad del sistema OXPHOS a 37 °C (control), 45 y 47 °C en tres líneas diferentes de cáncer de mama. Para ello, tras las incubaciones, se obtuvieron los extractos mitocondriales, se solubilizaron con digitonina y se realizaron electroforesis en geles Blue Native que permiten separar los complejos individuales y supercomplejos respiratorios manteniendo su funcionalidad. Seguidamente, se realizaron ensayos de *In Gel Activity* (IGA) y *Western Blot* (WB).

Para estos experimentos no se ha estudiado el efecto de 43 °C, ya que la experiencia previa del grupo de investigación ha mostrado que a esta temperatura el efecto es muy poco notable. (35)



**Figura 4.** 1) Resultados del ensayo de *In Gel Activity* y 2A-5B) la inmunodetección de los diferentes complejos y supercomplejos respiratorios mediante *Western Blot*. Las muestras corresponden a las mitocondrias aisladas de las diferentes líneas celulares tras el correspondiente tratamiento de hipertermia durante 1 hora.

En cuanto al *In Gel Activity* (Figura 4.1) se observa un patrón aparentemente similar en las tres líneas celulares; aunque presentan diferentes intensidades que podrían reflejar la diferente abundancia y/o

actividad de los supercomplejos que contienen CI, asumiendo una carga de material equivalente entre las distintas muestras (ver más adelante). En orden de mayor a menor intensidad se encuentran MCF7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231, destacando por su baja señal las muestras de la línea MDA-MB-231. Esto podría asociarse a las diferentes capacidades respiratorias entre las líneas, siendo MDA-MB-231 la más glucolítica de las tres, aunque, de nuevo, sería necesario normalizar por alguna proteína que indique la cantidad de material cargado. Por tanto, tendría sentido que, al hacer menor uso del sistema OXPHOS, MDA-MB-231 presente menor actividad que MDA-MB-468 y MCF7 que se caracterizan por un metabolismo OXPHOS más marcado.

Respecto al efecto del tratamiento hipertérmico en la organización de CI (SCs) se observa, de forma general, una disminución en la intensidad de las bandas conforme aumenta la temperatura en todas las líneas celulares. En MCF7 y MDA-MB-468 la señal detectada a 37°C y 45°C es bastante similar, destacando una gran caída a 47 °C; en MDA-MB-231 el efecto en el descenso de la señal ya es observable a 45 °C llegando a casi desaparecer a 47 °C. La aparente mayor afectación en la línea MDA-MB-231 podría ser porque a 37 °C la intensidad ya es muy débil o porque es más sensible a la temperatura que el resto de las líneas celulares.

Se pueden llegar a las mismas conclusiones acerca del efecto de la hipertermia en la organización del CI (SCs) con los resultados del *Western Blot* (*Figura 4. 2A y 2B*). Es cierto que, en este caso, en la línea MDA-MB-468 (*Figura 4. 2B*) parece observarse un aumento en la intensidad de la banda a 45 °C respecto a 37 °C. Esta diferencia no parece muy significativa y podría deberse a que se ha cargado diferente cantidad de material o una transferencia no homogénea. Acerca de la línea MDA-MB-231 (*Figura 4. 2A*), para una mejor observación, se expusieron las membranas por separado y durante más tiempo. Cuando se revelaban todas las líneas celulares juntas se veía la diferencia de señal comentada en *In Gel Activity* (*Figura 4.1*).

En el caso del CIII (*Figura 4. 3A y 3B*), conforme incrementa la temperatura se observa un descenso en la señal detectada en las bandas de SCs. Este efecto se compensa con un incremento en la intensidad del CIII libre. Por lo que, una mayor temperatura parece inducir el desensamblaje de los supercomplejos pasando el CIII generado a formar parte de la fracción de complejo III libre. En la línea MDA-MB-468, nuevamente, a 45 °C se ve un incremento de la intensidad en comparación con el control que se podría explicar de igual forma que en el caso del CI (SCs).

Examinando las señales en el control, en el CI no se observa presencia libre mientras que en el CIII sí. Además, el aumento en la cantidad de complejo libre con la hipertermia tampoco se observa en el caso del CI, donde la pérdida de intensidad del supercomplejo no lleva a la aparición de una nueva banda que represente el CI libre. Se ha descrito que en células humanas el CI libre es muy poco abundante y resultados previos del grupo indican que este es particularmente sensible al aumento de temperatura (35). Por tanto, parece que el desensamblaje del CI de los SCs con la temperatura lleva a la degradación paralela de este, a diferencia de lo que ocurre en el caso del CIII.

Respecto a la banda correspondiente a CIII + CIV no se aprecia ninguna diferencia significativa con la temperatura. Únicamente, remarcar que no se detecta en la línea MDA-MB-468 aunque podría ser un problema relacionado con la cantidad de material cargado.

Finalmente, cabe destacar la aparición de una banda extra (*Figura 4. 3A y 3B, marcada con un asterisco*) a 47 °C en las líneas MDA-MB-231 y MCF7 justo debajo de la señal del CIII (SCs) que no está presente en controles ni se aprecia a 45 °C. La aparición de esta banda se ha reportado en trabajos previos del grupo de investigación (35). Se cree que podría ser un producto de degradación de la banda superior resultado del efecto de la temperatura, donde se han eliminado algunas de las subunidades que estaban

formando parte del supercomplejo. La pérdida de elementos lleva a una reducción en el peso molecular que explica por qué aparece debajo de la banda original.

Acerca de la señal detectada por el CIV (*Figura 4. 4A y 4B, banda superior*), en las líneas MDA-MB-231 y MCF7 no se aprecia cambio sustancial con el incremento de la temperatura; mientras que, en la línea MDA-MB-468 sí que se observan diferencias, especialmente un aumento en la señal al pasar de 37 °C a 45 °C y 47 °C. Hay que destacar nuevamente la aparición de una banda extra bajo la principal en la línea MCF7 (*Figura 4. 4B, marcada con un asterisco*) a la que se le atribuye la misma explicación que en el caso de la banda extra descrita para el CIII.

La imagen del CII (*Figura 4. 5A y 5B*) se ha utilizado como control interno de carga ya que, al no estar tan afectado por la temperatura, permite que su señal se use para normalizar la del resto de complejos, aunque lo ideal sería disponer de una proteína que no pertenezca al sistema OXPHOS y cuyos niveles no cambien con los tratamientos.

Las diferencias que se ven en la estabilidad de los complejos y supercomplejos con el incremento de la temperatura pueden ser debidas a una sensibilidad diferente a la hipertermia o a fuerzas de unión más fuertes/débiles entre las subunidades que forman los complejos y en las interacciones entre estos en los SCs.

En conclusión, estos hallazgos muestran que a temperaturas superiores a 37 °C los complejos y supercomplejos respiratorios se ven afectados, tanto a nivel organizativo como funcional. De forma que, el tratamiento de hipertermia parece comprometer la organización del sistema OXPHOS y con ello la función mitocondrial.

## 5.2. Efecto de la temperatura en la expresión de mRNA: Evaluación de la expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR)

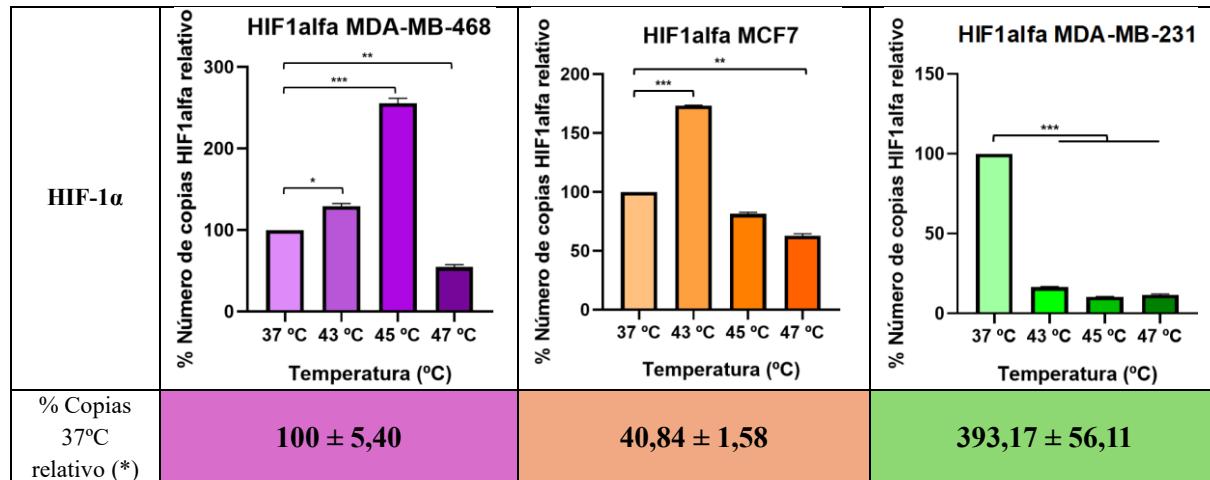
Con el objetivo de obtener información acerca de los mecanismos moleculares celulares que pueden estar inducidos / reprimidos en respuesta a la hipertermia se evaluaron los niveles de expresión de diversos genes, por qPCR. Con esta técnica se puede analizar cómo responden las líneas celulares a las temperaturas estudiadas y si existen diferencias entre los fenotipos tumorales.

Dos proteínas que se relacionan con los tumores son HIF-1 $\alpha$  y p53.

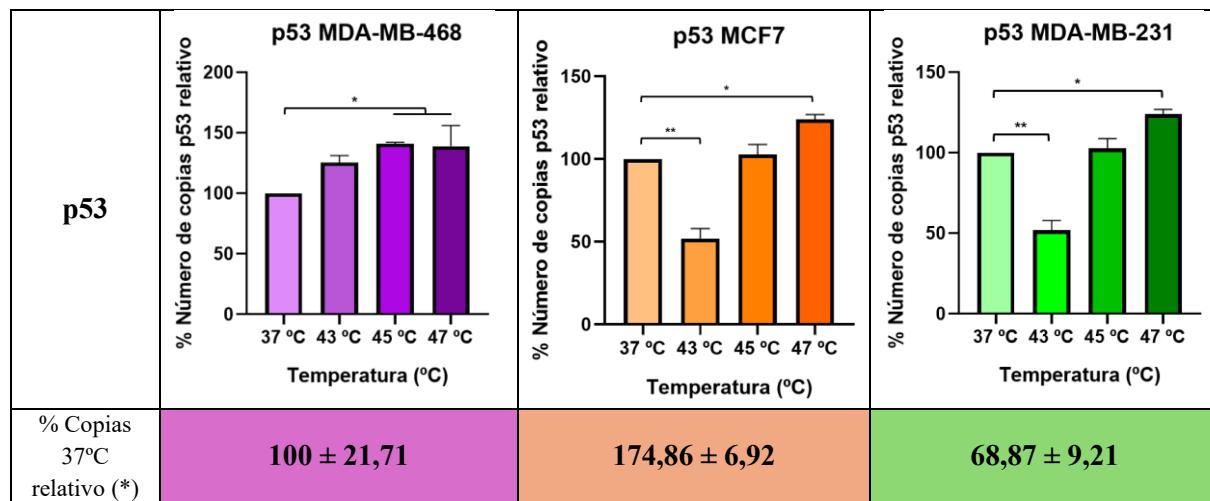
Las regiones tumorales se caracterizan por un ambiente hipoxico que lleva a la inducción de los factores inducibles por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) y los genes que éstos regulan. La producción elevada de HIF-1 $\alpha$  se relaciona con proliferación del cáncer, angiogénesis, migración, invasión, peor prognosis y resistencia terapéutica. (11,36) A 37 ° el número de copias del mRNA es más alto en la línea MDA-MB-231, seguido de 468 y MCF7, lo que podría estar relacionado con su diferente capacidad metastásica. El tratamiento de hipertermia se ha visto que es capaz de incrementar la disponibilidad de O<sub>2</sub> en la región tumoral, por lo que se reduciría la expresión de HIF-1 $\alpha$ . En este caso se está trabajando con cultivos celulares, donde se logra reducir el nivel de mRNA en las MDA-MB-468 y MCF7 al alcanzar los 47 °C; mientras que las MDA-MB-231 parecen más sensibles, siendo 43 °C suficiente como para generar una caída que prácticamente anula su expresión (*Figura 5*). Este efecto es realmente interesante, teniendo en cuenta que a 37 °C es la línea con mayor expresión. Como se tratan de cultivos celulares habría que comprobar si esta reducción se traduce a una mayor oxigenación en tumor.

p53 es un gen supresor de tumores crítico que está mutado en más de la mitad de todos los cánceres humanos. Las mutaciones en p53 no solo perjudican su actividad antitumoral, sino que también le confieren propiedades oncogénicas como mayor proliferación y metástasis. El enfoque de la terapia dirigida a p53 es una estrategia atractiva que trata de restaurar las funciones de la variante silvestre p53

o eliminar p53 mutante. (37) Las líneas MDA-MB-468 y 231 presentan p53 mutado; mientras que MCF7 contiene la proteína silvestre (38). Al igual que con HIF-1 $\alpha$ , a 37 °C MDA-MB-231 tiene mayor expresión de mRNA de p53, seguido 468 y MCF7. Nuevamente, la diferente expresión tiene sentido ya que se trata de líneas celulares diferentes. El tratamiento con hipertermia muestra un efecto potencialmente positivo en las líneas MDA-MB-231 y MCF7 solamente a 43 °C reduciendo los niveles de mRNA, no observándose ningún beneficio en MDA-MB-468 (*Figura 6*) (37). Por lo que, la HT no parece ser una estrategia adecuada para dirigirse contra p53.



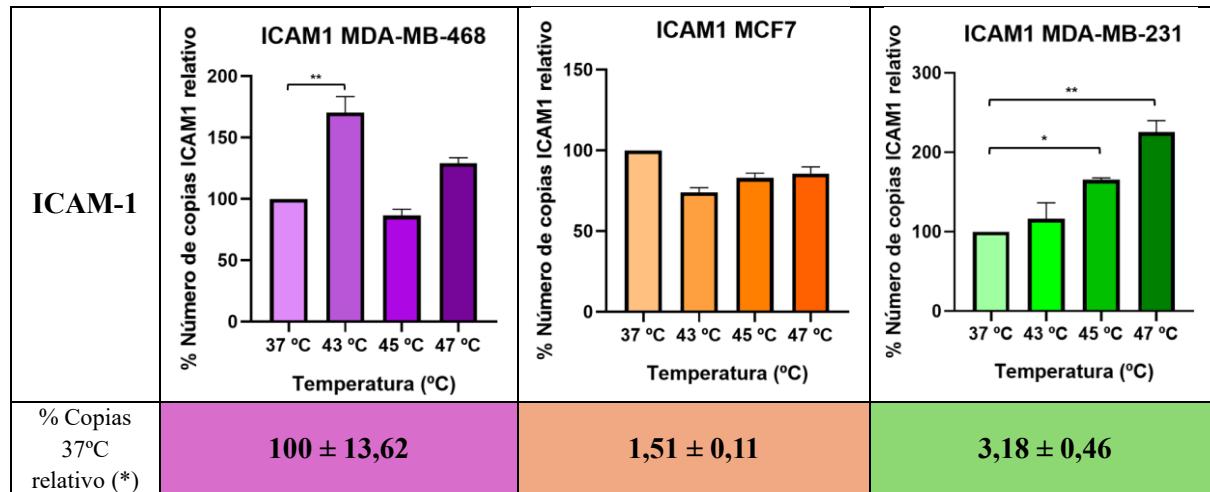
**Figura 5.** Tabla con las representaciones del porcentaje de número de copias de cada HIF-1 $\alpha$  a las diferentes temperaturas y en las tres líneas celulares. El nivel relativo de mRNA se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se ha representado respecto al nivel presente a 37 °C en cada una de las células. Debajo de los gráficos aparece en la fila indicada con % Copias 37 °C relativo (\*) = Media número de copias respecto Actina 37 °C normalizado frente a la línea MDA-MB-468, representado en porcentaje y mostrando la desviación estándar.



**Figura 6.** Tabla con las representaciones del porcentaje de número de copias de cada p53 a las diferentes temperaturas y en las tres líneas celulares. El nivel relativo de mRNA se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se ha representado respecto al nivel presente a 37 °C en cada una de las células. Debajo de los gráficos aparece en la fila indicada con % Copias 37 °C relativo (\*) = Media número de copias respecto Actina 37 °C normalizado frente a la línea MDA-MB-468, representado en porcentaje y mostrando la desviación estándar.

Otra de las características de los tumores es la evasión del ataque inmune que, en algunos casos, se refleja con una reducción en la expresión de ICAM-1 (Molécula de adhesión intracelular 1). Se trata de una proteína transmembrana encargada de mediar el reconocimiento por las células inmunes. Basalmente, la línea MDA-MB-468 es la que presenta mayor nivel de expresión, encontrándose muy por detrás MDA-MB-231 y MCF7 con un nivel realmente bajo. El tratamiento de HT muestra un incremento en el nivel de mRNA tanto en MDA-MB-231 alcanzando progresivamente el máximo a 47

°C, como en MDA-MB-468 aunque solo a 43 °C, no viéndose cambios estadísticamente significativos en MCF7 (*Figura 7*). En cualquier caso, el efecto de la temperatura lleva o bien a un aumento o a ningún cambio en el mRNA ICAM-1. Si esto se reflejara en un incremento en la expresión de proteína podría ser una de las razones que explique la capacidad de la HT de atraer las células inmunitarias al área del tumor. Al igual que con HIF-1 $\alpha$ , con ICAM-1 en la línea MDA-MB-231 se está logrando un beneficio terapéutico gracias al tratamiento con hipertermia.



**Figura 7.** Tabla con las representaciones del porcentaje de número de copias de ICAM-1 a las diferentes temperaturas y en las tres líneas celulares. El nivel relativo de mRNA se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se ha representado respecto al nivel presente a 37 °C en cada una de las células. Debajo de los gráficos aparece en la fila indicada con % Copias 37 °C relativo (\*) = Media número de copias respecto Actina 37 °C normalizado frente a la línea MDA-MB-468, representado en porcentaje y mostrando la desviación estándar.

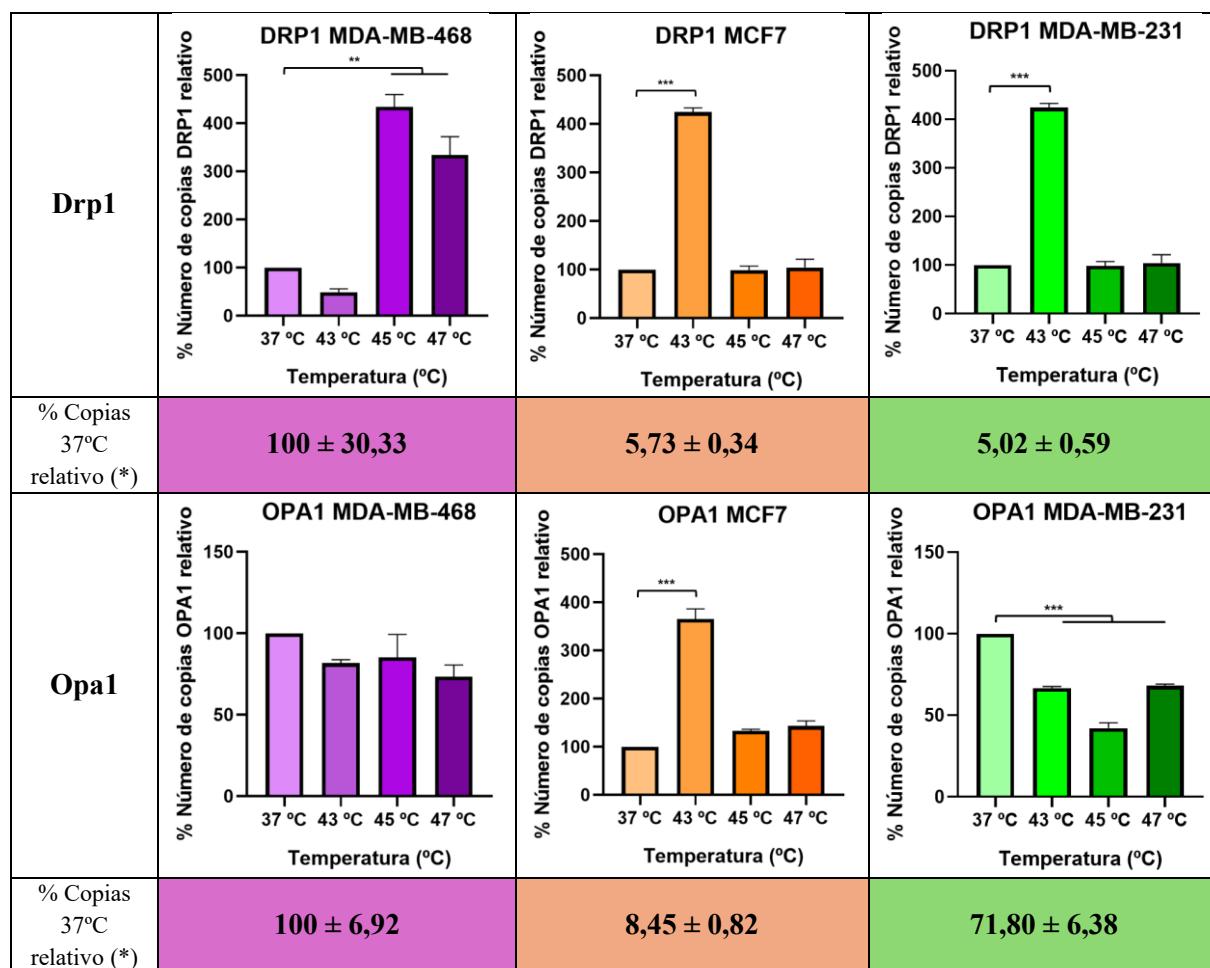
En condiciones normales, las mitocondrias llevan a cabo ciclos frecuentes de fisión y fusión mitocondrial regulados, entre otros, por Drp1 (Proteína 1 relacionada con la dinamina) y Opa1 (Dinamina mitochondrial OPA1 como GTPasa) respectivamente. (39) Dada la estrecha relación entre la mitocondria y la termogénesis celular es posible que la dinámica mitocondrial se vea afectada por la hipertermia. Basalmente, si el nivel de mRNA se tradujera a expresión de proteína, parece que presenta más fisión mitocondrial la línea MDA-MB-468, seguida de la MCF7 y MDA-MB-231 y, aunque en menor intensidad, también parece tener mayor fusión mitocondrial MDA-MB-468, seguida de 231 y MCF7. Tras el tratamiento con hipertermia, en cuanto a la fusión mitocondrial (Opa1) existe variabilidad de respuesta entre las líneas celulares: MDA-MB-468 no presenta cambio estadísticamente significativo; MCF7 presenta un incremento a 43 °C y ningún efecto respecto al control al resto de temperaturas; y MDA-MB-231 muestra una reducción en el nivel de mRNA a todas las condiciones hipertérmicas estudiadas. La perspectiva desde la fisión mitocondrial (Drp1) presenta una visión diferente, ya que, en todas las líneas o bien se consigue un aumento en la expresión de mRNA o ningún efecto (*Figura 8*). Esto puede sugerir que la fisión mitocondrial es uno de los mecanismos con los que las células tratan de responder frente al shock térmico.

Dado que la hipertermia es un tipo de estrés, se han medido dos factores de transcripción relacionados con el estrés celular: ATF4 (Factor de transcripción activador 4) y Nrf2 (Factor nuclear eritroide similar al factor 2).

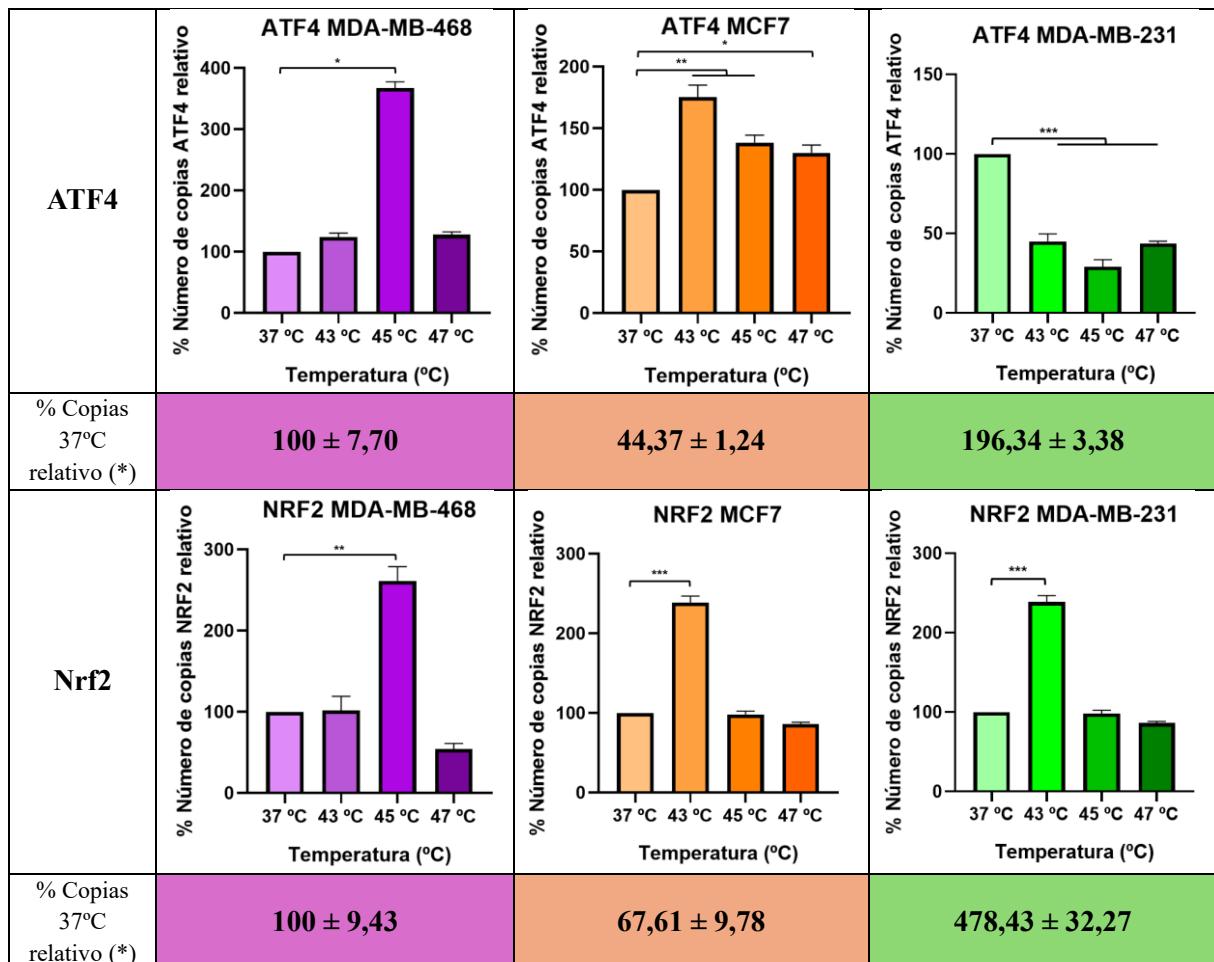
ATF4 es un factor de transcripción implicado en multitud de mecanismos celulares. El estrés en el retículo endoplasmático es un proceso que activa el ATF4 formando parte del mecanismo de respuesta a proteínas desplegadas (UPR). (40) Por otro lado, también se ha reportado la sobreexpresión de este factor en algunos cánceres, entre ellos el de mama, que se relaciona con peor pronóstico y resistencia a tratamientos. (41) A 37 °C la línea MDA-MB-231 es la que expresa mayor cantidad de mRNA de ATF4,

seguida de la 468 y MCF7. Este nivel de mRNA continúa concordando, al igual que HIF-1 $\alpha$ , p53 e ICAM-1, con las características metastásicas y agresivas de la línea MDA-MB-231. Uno de los posibles efectos de la HT es el despliegamiento de proteínas que llevaría a la activación del proceso UPR. Esto parece verse en las líneas MCF7 con un incremento del nivel de mRNA de ATF4 a todas las temperaturas y en MDA-MB-468 a 45 °C (*Figura 9*). Sorprendentemente, en el caso de las MDA-MB-231 se ve un gran descenso con la aplicación de temperatura. Este efecto es cuanto menos interesante no solo porque son basalmente las que mayor nivel de ATF4 expresan, sino también porque parece indicar que no serían capaces de responder ante el choque térmico, al menos usando el mecanismo de UPR.

Finalmente, Nrf2 es un factor de transcripción que se activa por estrés oxidativo. Este factor se encarga de regular la expresión de genes que protegen a las células frente a los agentes oxidantes, así como de otros mecanismos del metabolismo intermedio. Basalmente, MDA-MB-231 expresa un mayor nivel de Nrf2 seguida de 468 y MCF7. El incremento de la temperatura causa un aumento significativo en el nivel de mRNA a 45 °C en la línea MDA-MB-468 y a 43 °C en 231 y MCF7, sin cambios respecto a 37 °C en el resto de las temperaturas estudiadas (*Figura 9*). Si se hubiera trabajado con un modelo de tumor, este efecto podría ser resultado de la capacidad de la hipertermia de reoxigenar la región tumoral que pueda llevar un incremento en el estrés oxidativo. Sin embargo, en este caso se tratan de cultivos celulares por lo que el incremento en la expresión de Nrf2 puede estar relacionado con la generación de ROS. Un exceso de especies reactivas de oxígeno influiría negativamente la función mitocondrial. Los resultados del WB mostraban un impacto entre temperatura y estabilidad de supercomplejos en todas las líneas celulares que podrían estar relacionados, en caso de que el nivel de mRNA se tradujera a proteína, con un aumento en Nrf2 ocasionado por un incremento en ROS.



**Figura 8.** Tabla con las representaciones del porcentaje de número de copias de *Drp1* y *Opa1* a las diferentes temperaturas y en las tres líneas celulares. El nivel relativo de mRNA se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se ha representado respecto al nivel presente a 37 °C en cada una de las células. Debajo de los gráficos aparece en la fila indicada con % Copias 37 °C relativo (\*) = Media número de copias respecto Actina 37 °C normalizado frente a la línea MDA-MB-468, representado en porcentaje y mostrando la desviación estándar.

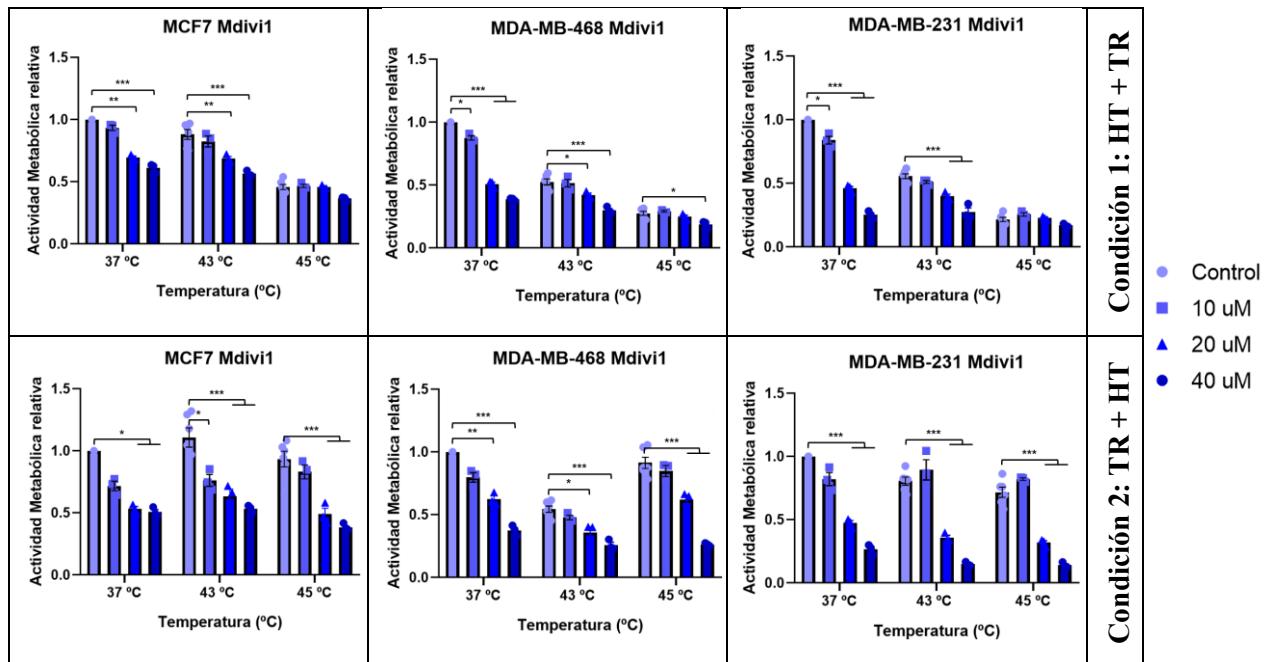


**Figura 9.** Tabla con las representaciones del porcentaje de número de copias de *Nrf2* y *ATF4* a las diferentes temperaturas y en las tres líneas celulares. El nivel relativo de mRNA se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  y se ha representado respecto al nivel presente a 37 °C en cada una de las células. Debajo de los gráficos aparece en la fila indicada con % Copias 37 °C relativo (\*) = Media número de copias respecto Actina 37 °C normalizado frente a la línea MDA-MB-468, representado en porcentaje y mostrando la desviación estándar.

De forma general se ve que las líneas celulares difieren en cómo responden a la hipertermia bien presentando efectos contrarios en activación / represión de los mecanismos o mediante el mismo efecto, pero a diferentes temperaturas. Esto es coherente, debido a que cada una representa un fenotipo tumoral diferente. Se ve aparentemente que la línea MDA-MB-231, a pesar de presentar la mayor agresividad, es la más sensible al tratamiento con hipertermia con una disminución de HIF-1 $\alpha$  y ATF4, así como un incremento en ICAM-1. Este efecto de mayor sensibilidad a la temperatura también se observaba en los resultados del *Western Blot*. Sin embargo, hay que ser conscientes de estar midiendo mRNA y no nivel de proteína, por lo que sería necesario comprobar que estos cambios en expresión génica se reflejan en cambios en la cantidad de proteína. Para ello, por ejemplo, se podría utilizar *Western Blot*, citometría de flujo, inmunocitoquímica o microscopía electrónica en el caso de fusión y fisión mitocondrial.

### 5.3. Ensayo de la sinergia entre hipertermia y otros tratamientos: Análisis de la actividad metabólica mediante MTT.

Los resultados de la qPCR, en concreto el aumento del nivel de mRNA de Drp1 con la temperatura, parecen indicar que la fisión mitocondrial es uno de los mecanismos con los que las células responden ante el tratamiento de hipertermia. Partiendo de esta premisa y con el objetivo de estudiar la posible sinergia entre la HT y otros tratamientos, se decidió realizar ensayos de MTT para estudiar las diferencias en la actividad metabólica entre las distintas líneas celulares con la combinación de temperatura y el fármaco Mdivi1, un inhibidor específico de la proteína Drp1. De esta forma, si las células utilizan la fisión mitocondrial para protegerse frente a la hipertermia, al bloquear este proceso se vería un mayor efecto conforme incrementa la temperatura y concentración del fármaco. Para escoger las concentraciones con las que trabajar se hicieron ensayos previos a 37 °C para estudiar cómo afectaba basalmente el fármaco a las líneas celulares



**Figura 10.** Representación de la actividad metabólica relativa, normalizada con la obtenida a 37 °C en ausencia de fármaco en cada una de las líneas celulares, respecto a la temperatura aplicada (una hora a 43 °C o dos horas a 45 °C) según la concentración de fármaco (Mdivi1: control, 10 uM, 20 uM y 40 uM) estudiada en cada una de las líneas celulares. En la condición uno se aplicó el tratamiento de hipertermia y tras ello 48 horas de incubación con el fármaco. En la condición dos se invirtió el orden de aplicación. En la tabla TR = tratamiento con fármaco, HT = Hipertermia.

Con el objetivo de estudiar la posibilidad de sensibilizar las células mediante hipertermia para potenciar la acción del fármaco, se aplicó primero la incubación de hipertermia (dos horas a 43 °C o una hora a 45 °C) y posteriormente se añadió Mdivi1 a diferentes concentraciones dejándolo actuar durante 48 horas a 37 °C.

A 37 °C se observa cómo afecta el fármaco a las líneas celulares sin el pretratamiento con hipertermia. Como se observa en la figura 10, paneles superiores, se produce una reducción en la actividad metabólica, que es estadísticamente significativa a partir de una concentración de 20 µM, en todas las líneas celulares conforme incrementa la concentración de Mdivi1 aplicada, por lo que tiene un efecto negativo sobre las células. Este descenso es más intenso en la línea MDA-MB-231 volviéndose a posicionar como la más sensible de las tres líneas celulares, seguida de la MDA-MB-468 y MCF7.

Al aplicar la incubación de 43 °C en la línea MCF7 se obtiene el mismo patrón que con 37 °C no pareciendo que se incremente el efecto del fármaco a esta temperatura. En el caso de las líneas MDA-

MB-468 y 231 sí que se observa una reducción prácticamente del 50 % de la actividad metabólica en comparación con el control a 37 °C, pero esta disminución se observa ya en ausencia del fármaco. A la máxima concentración de Mdivi1 se logra reducir todavía más la actividad metabólica, pero se acaba prácticamente igualando a aquella alcanzada con la misma concentración a la temperatura control.

Finalmente, a 45 °C la actividad metabólica detectada tanto en ausencia como en presencia del fármaco es, con poca diferencia, la misma. Esto da a entender que es el tratamiento con hipertermia el que genera el efecto, no observándose una sinergia entre ambos tratamientos, ya que, si así fuera, con el incremento en la concentración de fármaco se vería una reducción en la actividad metabólica. Esta observación también podría ser debida a otras causas: 1) que el tiempo de incubación de 1 hora a 45 °C es excesivo, quedando las células tan dañadas que ya no pueden ser más afectadas por el fármaco; 2) porque las células no utilizan la proteína Drp1 para responder a la hipertermia, por lo que la inhibición de esta no provoca ningún cambio, de forma que el incremento en mRNA de la qPCR igual no se refleja en la cantidad de proteína; o 3) debido a que a la mayor concentración de Mdivi a 37 °C se consigue prácticamente el máximo efecto del mismo y por ello no se observan diferencias al aplicar temperaturas elevadas.

Habiendo obtenido estos resultados se decidió invertir el orden de los tratamientos, aplicando primero durante 48 horas el fármaco, y tras ello incubando con el correspondiente tratamiento de hipertermia e inmediatamente después realizar la medición. De esta forma, se puede estudiar si el fármaco produce sensibilidad a las células frente a la temperatura.

Desde una perspectiva general (*Figura 10, paneles inferiores*), se observa en todas las líneas celulares que el patrón obtenido de actividad metabólica correspondiente a 43 y 45 °C es similar respecto al del control a 37 °C. Ya que, aunque es cierto que existe una reducción en el porcentaje de actividad metabólica, especialmente al comparar las dos concentraciones más altas, este efecto es mínimo. Al ser tan ligera la diferencia no parecería ser suficiente como para plantearse la aplicación de una terapia combinada con estos tratamientos. El efecto terapéutico que muestra la sinergia entre hipertermia y Mdivi1 no parece valer la pena teniendo en cuenta que aplicar dos terapias supone un mayor gasto económico que solo una y podría implicar también mayores efectos secundarios. Además, se puede llegar a las mismas conclusiones que con la anterior terapia: que Drp1 no sea un mecanismo de respuesta frente a la hipertermia o que a 37 °C Mdivi1 produzca ya prácticamente el máximo efecto.

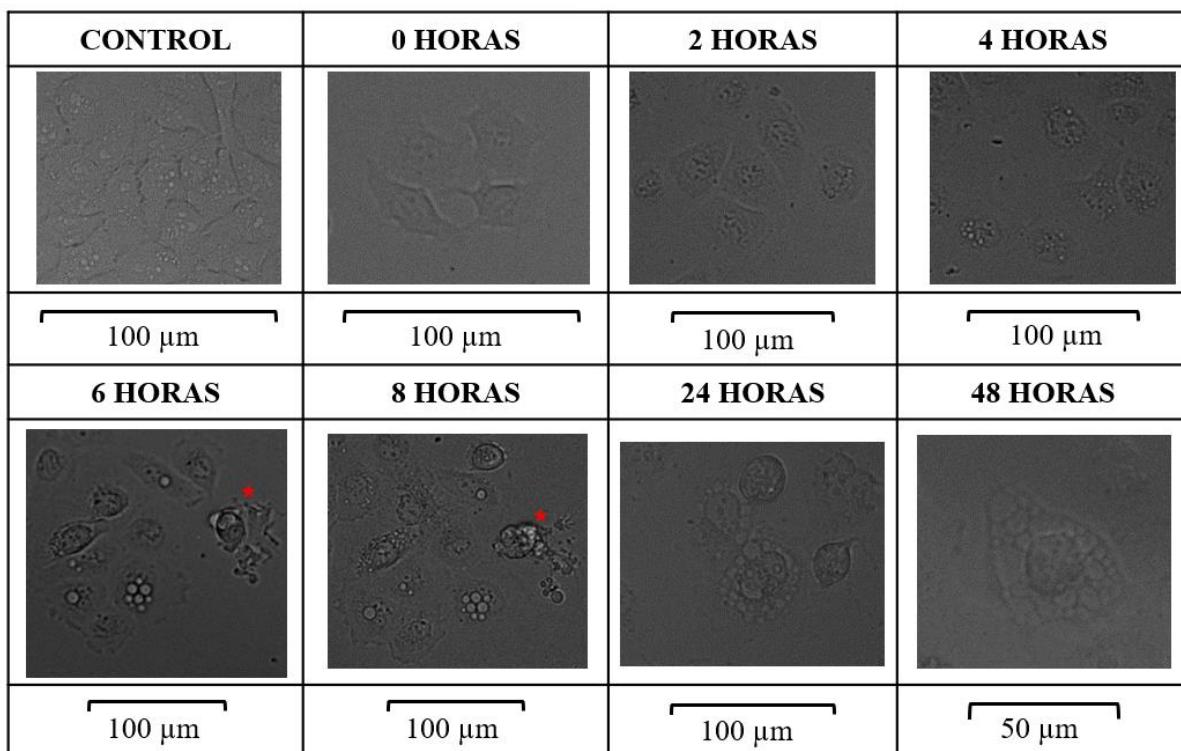
Al comparar ambas condiciones se observa que el efecto de la temperatura sobre la actividad metabólica en ausencia del fármaco es más marcado en la primera forma de aplicación de los tratamientos. Esto lleva a pensar que la hipertermia no genera solo un impacto inmediato, sino que condiciona la posterior evolución del cultivo, implicando que los mecanismos celulares que sean activados por la temperatura requieren tiempo para afectar a las células. Comparando este daño por choque térmico entre las tres líneas celulares se observa nuevamente que la línea más afectada es la MDA-MB-231 lo que es coherente con todos los resultados obtenidos hasta el momento, de cerca le sigue MDA-MB-468 y finalmente MCF7 es la más resistente.

#### **5.4. Análisis del efecto del tratamiento de hipertermia en la morfología celular**

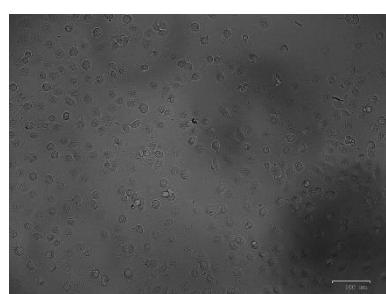
Los resultados obtenidos con los ensayos de MTT parecían mostrar que el tratamiento de hipertermia por sí solo causaba una reducción drástica en la actividad metabólica celular. Este efecto no se observaba únicamente inmediatamente después de la incubación, sino que se hacía más marcado tras un “tiempo de recuperación” a 37 °C. Con el objetivo de determinar qué efecto podría estar causando el shock térmico en las células, se realizó un seguimiento mediante microscopía antes y en varios intervalos tras el calentamiento a 45 °C (0 horas, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas y 48 horas) usando la línea

celular MDA-MB-468. Con este ensayo también se pretendía determinar a partir de qué momento tras la incubación las células empezaban a mostrar los efectos de la hipertermia, lo que serviría para saber a qué tiempo realizar mediciones en posteriores ensayos.

Si se comparan las imágenes del control (*Figura 11*) con las obtenidas inmediatamente tras calentar e incluso tras 2 horas a 37 °C, el cambio más notable que se puede apreciar es que las células se encogen sutilmente y adquieren una forma que tiende a ser más redondeada, lo que se ve especialmente en la línea MDA-MB-231 (*Figura 12*). Este evento se había detectado a lo largo del resto de experimentos cuando tras incubar y recoger las células se observaba que, a temperaturas elevadas, tienden a despegarse del fondo de la placa, lo que se traduce en una forma redondeada al tratarse de células adherentes.



**Figura 11.** Imágenes representativas obtenidas con el microscopio invertido ZOE Fluorescent Cell Image de la línea celular MDA-MB-468 antes de calentar (control), inmediatamente tras la incubación de 1 hora a 45 °C (0 horas), y tras diferentes tiempos de incubación a 37 °C: 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas y 48 horas. Las imágenes han sido recortadas y ampliadas para mostrar la región de interés.



**Figura 12.** Imagen obtenida con el microscopio invertido ZOE Fluorescent Cell Image de la línea celular MDA-MB-231 tras la incubación de 1 hora a 45 °C y 2 horas de incubación a 37 °C.

A partir de las 4 horas a 37 °C comienzan a aparecer en el citoplasma una especie de vesículas con forma circular perfecta, que van aumentando en número y tamaño con el tiempo post-tratamiento. Se puede

apreciar especialmente esta progresión al pasar de 6 a 8 horas, ya que la imagen corresponde al mismo grupo de células. Además de los cambios en las vesículas, también parece que las células se expanden y se separan unas de otras pasando a ocupar más espacio. Finalmente, en estas mismas imágenes, parece que la célula más a la derecha (*marcada con un asterisco rojo*), durante esas dos horas, ha liberado algunas de estas vesículas al exterior celular.

A las 24 y 48 horas tras el tratamiento, se observa que las vesículas incrementan de tamaño, pierden la morfología circular perfecta y la membrana que las rodea parece perder consistencia al presentar menor intensidad, aunque puede ser porque la foto esté tomada en diferente plano de enfoque. La expansión de las vesículas lleva a ocupar todo el citoplasma acabando por definir la forma celular.

Estas imágenes vienen a confirmar lo que mostraban los resultados del MTT, es decir, que el tratamiento de hipertermia tiene un efecto sobre el estado celular que condiciona su posterior evolución. Acerca de qué mecanismos están siendo activados o que les está ocurriendo a las células no pueden ser determinados únicamente con estas imágenes. Revisando la bibliografía se han reportado diversos efectos inducidos por estrés térmico: daño en el citoesqueleto que se puede exhibir como agregados en el citoplasma (42); también se ha descrito en células CHO detenidas en fase G1 la aparición de vesículas cerca de la membrana que, dependiendo de la cantidad y tamaño, pueden ser expulsadas al exterior o no (43); desnaturalización y depósito de proteínas desplegadas en agregados que pueden ser posteriormente disgregados por los mecanismos de respuesta o saturar a la célula e inducir muerte celular (44); acumulación de gotas lipídicas por inducción de la ruta mTOR (45); así como apoptosis, necrosis, catástrofe mitótica (6) y autofagia (44). Para determinar qué está ocurriendo se requerirían experimentos adicionales. En cualquier caso, se está observando que la reducción en la actividad metabólica detectada mediante el MTT se está reflejando en el aspecto celular. La temperatura causa algún tipo de estrés al tiempo de ser aplicada que depende del tipo celular, y de la intensidad del tratamiento: temperatura aplicada y duración de la incubación.

## 6. Conclusiones / Conclusions

### 6.1. Conclusiones

Tras realizar los estudios que componen este trabajo de fin de grado se obtienen las siguientes conclusiones:

- Las líneas celulares de tumor de mama responden de forma diferente a la hipertermia, y parece que las de la línea MDA-MB-231 son más termosensibles que MDA-MB-468 y MCF7.
- El tratamiento de HT parece comprometer la organización y actividad del sistema OXPHOS y, con ello, la función mitocondrial.
- El calentamiento de los cultivos celulares afecta a la expresión génica de HIF-1 $\alpha$ , p53, ICAM-1, Drp1, Opa1, ATF4 y Nrf2. Los cambios detectados difieren entre las líneas celulares utilizadas.
- No se ha detectado una sinergia entre el fármaco Mdivi1 y la aplicación de calor, al menos en las líneas celulares y temperaturas estudiadas.
- La ausencia de potenciación de efectos entre la hipertermia y Mdivi1 parece indicar que las líneas celulares utilizadas no inducen la fisión mitocondrial para responder al shock térmico a las temperaturas aplicadas.
- La hipertermia, por sí sola, es capaz de inducir una reducción en la actividad metabólica celular.
- La morfología celular se ve afectada de gran manera tras la aplicación de temperaturas por encima de 37 °C. Este efecto va aumentando conforme pasa el tiempo tras el calentamiento y

depende de la línea celular, tiempo y temperatura de incubación, lo que indicaría que una parte de las células no se recupera tras el tratamiento de hipertermia.

## 6.2. Conclusions

After conducting the studies that form this final degree Project, the following conclusions have been obtained:

- Breast cancer cell lines respond differently to hyperthermia, with MDA-MB-231 being more thermosensitive than MDA-MB-468 and MCF7.
- HT treatment appears to compromise the organization and activity of the OXPHOS system and, consequently, mitochondrial function.
- Heating the cell cultures affects the gene expression of HIF-1 $\alpha$ , p53, ICAM-1, Drp1, Opa1, ATF4, and Nrf2. The detected changes differ among the cell lines used.
- No synergy has been detected between the drug Mdivi1 and heat application, at least in the cell lines and temperatures studied.
- The lack of collaboration between hyperthermia and Mdivi1 seems to indicate that the cell lines used do not induce mitochondrial fission to respond to thermal shock at the applied temperatures.
- Hyperthermia alone can induce a reduction in cellular metabolic activity.
- Cell morphology is greatly affected after the application of temperatures above 37 °C. This effect increases as time passes after heating and depends on the cell line, incubation time, and temperature, indicating that some of the cells do not recover after hyperthermia treatment.

## 7. Perspectivas futuras

Las perspectivas futuras que se plantean en la continuación de esta investigación son:

- Estudiar el efecto entre la combinación de hipertermia y otro tipo de tratamientos como inmunoterapia o quimioterapia.
- Determinar si los cambios observados en expresión génica se traducen de igual forma en el nivel de proteína.
- Tratar de descifrar los mecanismos celulares activados por el tratamiento de hipertermia que llevan a la reducción de la actividad metabólica celular.
- Trabajar paralelamente en investigación básica del tratamiento de hipertermia y la estrategia de hipertermia magnética intracelular local.

## 8. Bibliografía

1. Yaqoob MD, Xu L, Li C, Leong MML, Xu DD. Targeting mitochondria for cancer photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2022 Jun 1;38:102830. doi: 10.1016/j.pdpdt.2022.102830.
2. Missiroli S, Perrone M, Genovese I, Pinton P, Giorgi C. Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. EBioMedicine. 2020 Sep 1;59:102943. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102943.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Cell. 2000;100:57–70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
5. Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. Cell Metab. 2022 Mar 1;34(3):355–77. doi: 10.1016/j.cmet.2022.01.007.

6. Dunne M, Regenold M, Allen C. Hyperthermia can alter tumor physiology and improve chemo- and radio-therapy efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020 Jan 1;163–164:98–124. doi: 10.1016/j.addr.2020.07.007.
7. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002 Jul;43:33–56. doi: 10.1016/s1040-8428(01)00179-2.
8. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005 Feb;15(1):102–11. doi: 10.1016/j.gde.2004.12.005.
9. Lee YG, Park DH, Chae YC. Role of Mitochondrial Stress Response in Cancer Progression. *Cells.* 2022 Mar 1;11(5):771. doi: 10.3390/cells11050771.
10. Kim W, Kim MS, Kim H jong, Lee E, Jeong J hoon, Park I, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in response of tumors to a combination of hyperthermia and radiation in vivo. *International Journal of Hyperthermia.* 2018 Apr 3;34(3):276–83. doi: 10.1080/02656736.2017.1335440.
11. Lee YG, Park DH, Chae YC. Role of Mitochondrial Stress Response in Cancer Progression. *Cells.* 2022 Mar 1;11(5). doi: 10.3390/cells11050771.
12. Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012 Oct;12(10):685–98. doi: 10.1038/nrc3365.
13. Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Latorre-Pellicer A, Colás C, Balsa E, et al. Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science.* 2013 Jun 28;340(6140):1567–70. doi: 10.1126/science.1230381.
14. Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Cell.* 2008 Nov 21;32(4):529–39.
15. Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell.* 2016 Mar 3;61(5):667–76. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.011.
16. Kaur R, Bhardwaj A, Gupta S. Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers. *Mol Biol Rep.* 2023 Nov 1;50(11):9663–76. doi: 10.1007/s11033-023-08809-3.
17. Ammendola M, Currò G, Memeo R, Curto LS, Luposella M, Zuccalà V, et al. Targeting Stem Cells with Hyperthermia: Translational Relevance in Cancer Patients. *Oncology (Switzerland).* 2020 Nov 1;98(11):755–62. doi: 10.1159/000509039.
18. Jose J, Kumar R, Harilal S, Mathew GE, Parambi DGT, Prabhu A, et al. Magnetic nanoparticles for hyperthermia in cancer treatment: an emerging tool. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020 Jun 1;27(16):19214–25. doi: 10.1007/s11356-019-07231-2
19. Sohail A, Ahmad Z, Bég OA, Arshad S, Sherin L. Revue sur le traitement par hyperthermie médieée par nanoparticules. *Bull Cancer.* 2017 May 1;104(5):452–61. doi: 10.1016/j.bulcan.2017.02.003
20. W B Coley, The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893, *Clin Orthop Relat Res.* 1991 262 3-11
21. Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, Brace CL, Ivkov R, Grüll H, et al. Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperthermia.* 2020 Jan 1;37(1):711–41. doi: 10.1080/02656736.2020.1779357.
22. Peeters H, van Zwol EM, Brancato L, M. C. da Cunha MG, Bogers J. Systematic review of the registered clinical trials for oncological hyperthermia treatment. *Int J Hyperthermia.* 2022;39(1):806–12. doi: 10.1080/02656736.2022.2076292.
23. Kaneko M, Yamazaki H, Ono T, Horie M, Ito A. Effective magnetic hyperthermia induced by mitochondria-targeted nanoparticles modified with triphenylphosphonium-containing phospholipid polymers. *Cancer Sci.* 2023 Sep 1;114(9):3750–8. doi: 10.1111/cas.15895
24. Montazersaheb P, Pishgahzadeh E, Jahani VB, Farahzadi R, Montazersaheb S. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia: A prospect in cancer stem cell tracking and therapy. *Life Sci.* 2023 Jun 15;323. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121714
25. Prasad NK, Rathinasamy K, Panda D, Bahadur D. Mechanism of cell death induced by magnetic hyperthermia with nanoparticles of  $\gamma$ -MnxFe2-xO3 synthesized by a single step process. *J Mater Chem.* 2007 Dec 4;17(48):5042–51. Doi: 10.1039/b708156a
26. Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): Cell killing and molecular events. *Int J of Hyperthermia.* 2008 Feb;24(1):3–15. doi: 10.1080/02656730701769841.
27. IJff M, Crezee J, Oei AL, Stalpers LJA, Westerveld H. The role of hyperthermia in the treatment of locally advanced cervical cancer: a comprehensive review. *Int J Gynecol Cancer.* 2022;32(3):288–96. doi: 10.1136/ijgc-2021-002473.

28. Cheng Y, Weng S, Yu L, Zhu N, Yang M, Yuan Y. The Role of Hyperthermia in the Multidisciplinary Treatment of Malignant Tumors. *Integr Cancer Ther.* 2019;18. doi: 10.1177/1534735419876345.
29. Zhang X, Hu Y. Mitochondrial thermogenesis in cancer cells. *Oncologie.* 2023 Nov 1;25(6):591–603. doi: 10.1515/oncologie-2023-0298
30. Xie W, Tan B, Yang Z, Yu X, Chen L, Ran D, et al. Nrf2/ARE pathway activation is involved in negatively regulating heat-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2020 Apr 1;52(4):439–45. doi: 10.1093/abbs/gmaa013.
31. Rubia-Rodríguez I, Santana-Otero A, Spassov S, Tombácz E, Johansson C, De La Presa P, et al. Whither magnetic hyperthermia? A tentative roadmap. *Materials.* 2021 Feb 2;14(4):1–37. doi: 10.3390/ma14040706.
32. Lin F, Bao YW, Wu FG. Improving the phototherapeutic efficiencies of molecular and nanoscale materials by targeting mitochondria. *Molecules.* 2018 Nov 18;23(11):3016. doi: 10.3390/molecules23113016.
33. Dou R, Cai X, Ruan L, Zhang J, Rouzi A, Chen J, et al. Precision Nanomedicines: Targeting Hot Mitochondria in Cancer Cells. *ACS Appl Bio Mater.* 2022 Sep 6; 4103–17. doi: 10.1021/acsabm.2c00641.
34. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
35. Moreno-Loshuertos R, Marco-Brualla J, Meade P, Soler-Agesta R, Enriquez JA, Fernández-Silva P. How hot can mitochondria be? Incubation at temperatures above 43 °C induces the degradation of respiratory complexes and supercomplexes in intact cells and isolated mitochondria. *Mitochondrion.* 2023 Mar 1;69:83–94. doi: 10.1016/j.mito.2023.02.002.
36. Kim W, Kim MS, Kim H jong, Lee E, Jeong J hoon, Park I, et al. Role of HIF-1 $\alpha$  in response of tumors to a combination of hyperthermia and radiation in vivo. *Int J Hyperthermia.* 2018 Apr 3;34(3):276–83. doi: 10.1080/02656736.2017.1335440.
37. Hu J, Cao J, Topatana W, Juengpanich S, Li S, Zhang B, et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *J Hematol Oncol.* 2021 Sep 28;14(1):157. doi: 10.1186/s13045-021-01169-0.
38. Huovinen M, Loikkanen J, Myllynen P, Vähäkangas KH. Characterization of human breast cancer cell lines for the studies on p53 in chemical carcinogenesis. *Toxicol in Vitro.* 2011 Aug;25(5):1007–17. doi: 10.1016/j.tiv.2011.03.018.
39. Yu T, Ferdjallah I, Elenberg F, Chen SK, Deuster P, Chen Y. Mitochondrial fission contributes to heat-induced oxidative stress in skeletal muscle but not hyperthermia in mice. *Life Sci.* 2018 May 1;200:6–14. doi: 10.1016/j.lfs.2018.02.031.
40. Balsa E, Soustek MS, Thomas A, Cogliati S, García-Poyatos C, Martín-García E, et al. ER and Nutrient Stress Promote Assembly of Respiratory Chain Supercomplexes through the PERK-eIF2 $\alpha$  Axis. *Mol Cell.* 2019 Jun 6;74(5):877–890.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.031.
41. Wu D, Liang J. Activating transcription factor 4: a regulator of stress response in human cancers. *Front Cell Dev Biol.* 2024 Mar 27:12:1370012. doi: 10.3389/fcell.2024.1370012.
42. Cosst RA, Linnemans WAM. The effects of hyperthermia on the cytoskeleton: a review. *Int J Hyperthermia* 1996 Mar-Apr;12(2):173–96. doi: 10.3109/02656739609022507.
43. Kapiszewska M, Hopwood LE. Changes in Bleb Formation Following Hyperthermia Treatment of Chinese Hamster Ovary. *Radiat Res* 1986 Mar;105(3):405–12.
44. Zhang Y, Calderwood SK. Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: A mini-review. *Int J Hyperthermia.* 2011 Aug;27(5):409–14. doi: 10.3109/02656736.2011.552087
45. Xu J, Strasburg GM, Reed KM, Velleman SG. Thermal stress and selection for growth affect myogenic satellite cell lipid accumulation and adipogenic gene expression through mechanistic target of rapamycin pathway. *J Anim Sci.* 2022 Aug 1;100(8):skac001. doi: 10.1093/jas/skac001.