

Utilización de microhilos magnéticos para promover la muerte de células de osteosarcoma mediante hipertermia magnética *in vitro*

I. Arranz-Bárcena¹, J. Campisi², I. Martínez de Apellániz³, S. Lizarbe-Sancha⁴, O. Mitxelena-Iribarren¹, S. Arana¹, V. Zhukova^{5,6}, M. Mujika¹, A. Zhukov^{5,6,7}

¹ CEIT-IK4 y Tecnun (Universidad de Navarra), San Sebastián, España, {iarranz, omitxelena, sarana, mmujika}@ceit.es

² Departamento de Biología, Universidad de Regis, Denver (CO), Estados Unidos, jcampisi@regis.edu

³ Tecnun, Universidad de Navarra, San Sebastián, España, imartinezg1@alumni.tecnun.es

⁴ CEIT-IK4, San Sebastián, España, slizarbe@ceit.es

⁵ Dpto. Física de Materiales, UPV/EHU, San Sebastián, España, {arkadi.joukov, valentina.zhukova}@ehu.es

⁶ Dpto. de Física Aplicada, EUPDS, UPV/EHU, San Sebastián, España

⁷ IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, España

Resumen

Los tratamientos para el cáncer que se llevan a cabo actualmente tienen una serie de limitaciones que, unido a que se trata de técnicas invasivas, hace que se tienda a buscar nuevas alternativas. Una de ellas es la hipertermia dirigida, cuyo objetivo son las células cancerígenas. Se trata de una técnica relativamente nueva, por lo que aún no se ha estudiado en profundidad. En este trabajo, se han utilizado microhilos magnéticos amorfos recubiertos de vidrio para calentar células de osteosarcoma aplicando un campo magnético alterno. De acuerdo con los resultados obtenidos de los ensayos realizados "in vitro", se puede confirmar que la utilización de estos microhilos magnéticos reduce la proliferación de células cancerígenas dando lugar finalmente a la muerte celular. Además, esta técnica es un proceso mucho menos invasivo que los utilizados actualmente y que requiere exposiciones breves a campos magnéticos débiles. Por todo esto, la hipertermia dirigida se presenta como una alternativa efectiva para el tratamiento de osteosarcoma.

1. Introducción

De acuerdo con la OMS (Organización Mundial de la Salud), el cáncer es a día de hoy una de las principales causas de mortalidad, hecho que reflejan claramente los 8,2 millones de fallecidos en el año 2012 por esta enfermedad. [1] Además, se prevé que este número siga aumentando llegando a superar los 17 millones en el año 2030. [2]

Uno de los cánceres más comunes entre los niños en edades comprendidas entre 1 y 14 años es el osteosarcoma (OS). [3] Se trata de un neoplasma maligno agresivo que surge de células primitivas transformadas de origen mesenquimal y que muestran una diferenciación osteoblástica produciendo un osteoide maligno. El OS es el cáncer de huesos más frecuente que existe, con una incidencia de aproximadamente 2570 casos cada año en Estados Unidos, y que generalmente aparece en áreas en las que el hueso está creciendo rápidamente, como pueden ser el fémur, la tibia o el húmero. [4]

El tratamiento del cáncer depende tanto de la zona en la que se ha generado el tumor como del estado de desarrollo en el que se encuentre. A día de hoy, los tratamientos más extendidos son la quimioterapia, la radioterapia y la cirugía. Sin embargo, estos tratamientos producen importantes efectos secundarios debido a su falta de especificidad, ya que también atacan células sanas del organismo. [5] En el caso concreto del osteosarcoma, además, aún siguen siendo frecuentes las complicaciones, como pueden ser infecciones o recurrencias locales del tumor, las cuales pueden derivar en la necesidad de más cirugía o incluso amputación. Por todo esto, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas para el tratamiento del cáncer en general y del osteosarcoma en particular, que limiten los efectos secundarios de los tratamientos actuales.

Una de ellas y la cual tiene un gran potencial es la hipertermia dirigida, que consiste en la hipertermia localizada que permita únicamente matar células cancerígenas. [6,7] Entre todos los tipos de hipertermias, la magnética es la que ofrece mejores perspectivas de futuro para el tratamiento localizado del cáncer. [8,9] El fenómeno físico que se esconde detrás de esta técnica, consiste en el calentamiento del área tumoral, en el que está alojado un objeto magnético, mediante la aplicación de campos magnéticos alternos. Este calentamiento hará que se aumente la oxigenación y la radio- y quimiosensibilidad de las células tumorales, dando lugar a una reducción del tumor. De esta manera, lo que se busca es elevar la temperatura de la región tumoral, manteniendo intacta la temperatura corporal del paciente. [8-10]

Este calentamiento de los materiales ferromagnéticos está relacionado con un ciclo de histéresis que representa el trabajo disipándose como energía térmica. Generalmente, la disipación de energía bajo campos magnéticos alternos se describe en términos de pérdidas magnéticas. Estas pérdidas magnéticas pueden ser representadas mediante el área del ciclo de histéresis del material.

Recientemente, se han estudiado las propiedades térmicas de microhilos amorfos ricos en Fe con recubrimiento de vidrio como potencial aplicación para hipertermia magnética. Estos hilos pueden llegar a medir algunos kilómetros de largo con un diámetro que varía entre 1 y 50 μm . [11] Este tipo de microhilos metálicos tienen unas excelentes propiedades mecánicas [12] y magnéticas. [13] Además, el recubrimiento de vidrio hace que se mejoren sus propiedades mecánicas [14] y que presenten nuevas funcionalidades aptas para aplicaciones médicas.

Por todo esto, en el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos acerca de la influencia que pueden tener los microhilos metálicos recubiertos de vidrio, calentados magnéticamente, en la viabilidad de células de osteosarcoma.

2. Material y métodos

2.1. Microhilos magnéticos amorfos

Para este estudio se han utilizado microhilos magnéticos, compuestos de un núcleo metálico amorfo de $\text{Fe}_{77}\text{B}_{10}\text{Si}_{10}\text{C}_3$ recubiertos de una fina capa de vidrio (Figura 1) (Tamag Ibérica S.L.). Esta capa de vidrio sirve de aislamiento para que el núcleo metálico no se vea afectado por las condiciones del entorno. El diámetro del núcleo es de 23 μm y el diámetro total de 32 μm .

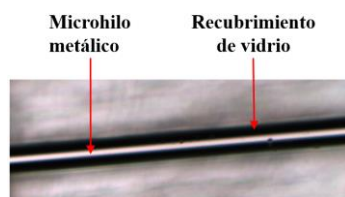


Figura 1. Imagen de microscopía óptica de un microhilo magnético recubierto de vidrio.

2.2. Cultivo celular y reactivos

En este caso se ha utilizado la línea celular de osteosarcoma U-2 OS (ECACC 92022711, ATCC HTB-96). Las células se han cultivado a 37°C con 5% de CO_2 . Como medio se ha empleado RPMI 1640 (Life Technologies) con 10% de suero fetal bovino (Foetal Bovine Serum, FBS) (Life Technologies) y 1% de antibiótico (Life Technologies). [37]

2.3. Banco de ensayos y procedimiento experimental

El banco de ensayos utilizado para llevar a cabo los ensayos de hipertermia magnética está compuesto por tres bloques principales: 1º un generador de campos magnéticos alternos basado en un electroimán alimentado por una fuente alterna (Figura 2.a), 2º un monitor de temperatura que incluye un termopar y un multímetro (Figura 2.b) y 3º un incubador de células en el que se integran los microhilos (Figura 2.c).

El procedimiento experimental llevado a cabo consta de tres fases. En la primera de ellas, se definen las condiciones más apropiadas para el cultivo celular de las células de OS para el estudio de viabilidad celular, es decir, cuál es el número óptimo de células, qué tipo de placas utilizar etc. En la segunda, se estudia el comportamiento de las células cuando se someten a un calentamiento externo. Para ello,

se calientan hasta 42°C unas placas en las que las células acaban de ser depositadas (antes de su adhesión) y otros en las que las células ya han estado 24 horas de incubación (después de adherirse).

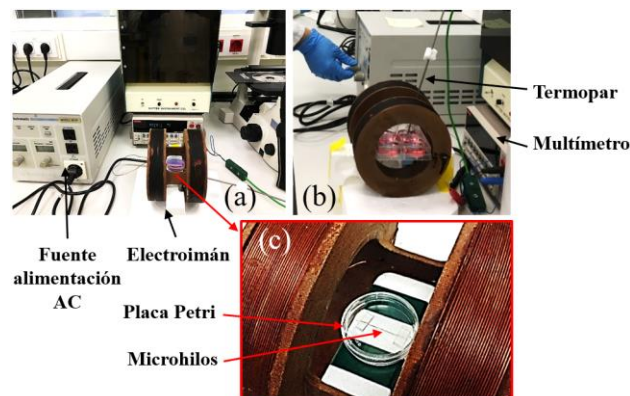


Figura 2. Banco de ensayos para los ensayos de hipertermia magnética. (a) generador de campos magnéticos alternos, (b) monitor de temperatura y (c) incubación de células.

Por último, en la tercera fase, las células se incuban durante 24 horas a 37°C y 5% CO_2 en placas Petri o en placas de pocillos a una concentración de 1×10^6 células/ml. Tras el periodo de incubación, las células se exponen durante 50 minutos a distintas condiciones:

- Únicamente a los microhilos magnéticos
- A un campo magnético alterno sin microhilos
- A un campo magnético alterno con microhilos
- Ni a campo magnético ni a microhilos (control)

En las condiciones en las que se aplica un campo magnético, las células se exponen en distintos experimentos a campos magnéticos altos (220V, 50Hz, 2.5A), medios (185V, 50Hz, 2.0A) y bajos (150V, 50Hz, 1.6A). Después de la exposición, las células se vuelven a incubar bajo las mismas condiciones y se estudia su viabilidad mediante el uso de un hemocitómetro, contando el número de células en distintos momentos a lo largo del tiempo.

Además, también se han realizado ensayos utilizando hilos no metálicos, en este caso hilo dental, para estudiar su efecto en la viabilidad celular.

3. Resultados y discusión

3.1. Condiciones de cultivo celular

Se ha determinado que las condiciones óptimas para el cultivo de las células de osteosarcoma sea sembrar en placas Petri estériles (de 60x15mm) una cantidad de 1×10^6 células por ml de medio de cultivo. Estas condiciones favorecen la viabilidad, diferenciación y cuantificación celular.

3.2. Respuesta celular al calentamiento externo

Mediante la utilización de un *hot-plate*, se han calentado algunas células antes de que se adhirieran a la placa y otras después de su adhesión a las 24 horas. Los resultados muestran que calentar las células antes de que se adhieran hace que a las 24 horas sigan despegadas de la placa (Figura 3.a). Sin embargo, el calentarlas una vez que ya se

adherido a la placa provoca muerte celular masiva (Figura 3.c).

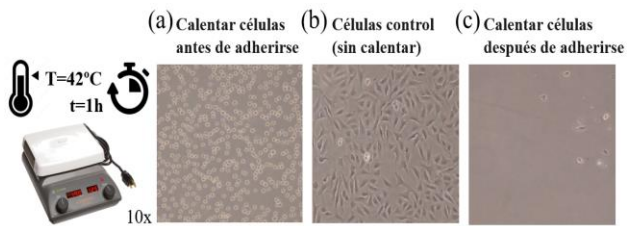


Figura 3. Resultados del calentamiento celular de manera externa antes de que se adhirieran (a), sin calentar (b) y calentados después de su adhesión (c). Todas las imágenes han sido tomadas a las 24 horas de la condición de calentamiento.

3.3. Respuesta celular a los microhilos y a los campos magnéticos

En primer lugar, se ha estudiado el efecto que tiene sobre las células la utilización de microhilos no magnéticos (hilo dental), tanto en presencia como en ausencia de campos magnéticos. En ambos casos se ha visto que la viabilidad celular permanece inalterada, en comparación con el control (sin hilos y sin campo magnético).

A continuación, se han realizado ensayos utilizando microhilos magnéticos, pero sin la aplicación de campos magnéticos. En este caso, al igual que en los anteriores, también se ha visto que las células permanecen intactas.

Por último, se ha estudiado la incidencia que tiene la aplicación de campos magnéticos a distintas intensidades durante 50 minutos, bien utilizando microhilos magnéticos o sin ellos (Figura 4). Para el caso de los campos magnéticos altos (220V, 50Hz, 2.5A), se ha visto que sin los microhilos se muere una pequeña cantidad de células, al ser analizadas a las 24 horas, mientras que con los microhilos prácticamente todas las células mueren. De hecho, del primer al segundo caso la viabilidad celular disminuye un 96%, siendo en ambos casos 42°C la temperatura máxima alcanzada. Cabe destacar también que las células que no estaban adheridas en el momento de realizar el ensayo con los microhilos tampoco se adhirieron posteriormente.

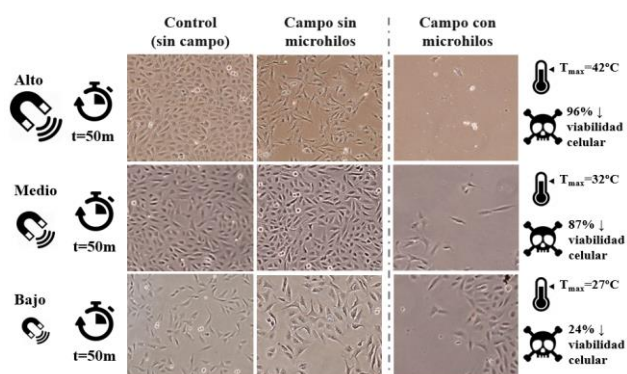


Figura 4. Resultados que muestran la viabilidad celular después de haber tratado las células de OS con diferentes campos magnéticos en presencia y en ausencia de microhilos.

Para los campos magnéticos medios (185V, 50Hz, 2.0A), al contrario que pasaba con los altos, no se produce muerte celular cuando no están presentes los microhilos. Sin

embargo, cuando sí que son utilizados la tasa de muerte celular vuelve a ser elevada (Figura 4). En este caso, la viabilidad celular se ve disminuida un 87%, valor algo menor que en el caso de los campos altos. Lo mismo sucede con la temperatura máxima alcanzada, que en este caso es de 32°C .

Por último, a la hora de utilizar campos magnéticos bajos (120V, 50Hz, 1.6A), tampoco sucede muerte celular al aplicar únicamente el campo magnético. Al aplicarlo conjuntamente con los microhilos magnéticos, al igual que en los casos anteriores ocurre muerte celular (Figura 4), aunque con esta intensidad únicamente se consigue una reducción de la viabilidad celular del 24%, es decir, aún queda una gran cantidad de células viables. En este caso, la máxima temperatura alcanzada es de 27°C .

Para todos los casos representados en la Figura 4, tal y como se ha comentado anteriormente, la viabilidad celular ha sido estudiada 24 horas después de la exposición al campo magnético correspondiente. Sin embargo, también se han realizado algunos experimentos a las 2 y a las 48 horas, obteniendo en ambos casos resultados similares.

En resumen, de acuerdo con todos los resultados mostrados, se puede afirmar que, de manera *in vitro*, la exposición de las células de OS a campos magnéticos alternos bajos, medios y altos junto con la utilización de microhilos magnéticos hace que la viabilidad celular se vea disminuida de manera significativa. No ocurre así cuando las células son únicamente expuestas a campos magnéticos alternos o a microhilos magnéticos, sin compaginar las dos condiciones.

4. Conclusiones

El osteosarcoma es el principal y más agresivo tumor óseo que afecta principalmente a niños y adolescentes. A pesar de que se han realizado avances en el desarrollo de nuevas terapias para su tratamiento, la supervivencia de los pacientes que lo sufren sigue siendo baja, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas vías.

Aquí es donde entra en juego la hipertermia, que se ha presentado como una alternativa menos agresiva, capaz de dañar las células tumorales minimizando el daño producido al tejido sano circundante. Sin embargo, se han realizado pocos estudios en relación a la utilización de microhilos magnéticos para inducir hipertermia y estudiar su incidencia en la viabilidad de células tumorales.

En este trabajo, se han realizado una serie de experimentos utilizando microhilos magnéticos amorfos recubiertos de vidrio para calentar células de osteosarcoma utilizando campos magnéticos alternos. De acuerdo a los resultados mencionados anteriormente, se demuestra que la utilización conjunta de microhilos magnéticos y campos magnéticos alternos resulta en una significativa reducción en la viabilidad celular de las células de osteosarcoma utilizadas. Además, siendo esta reducción dependiente de la intensidad del campo magnético aplicado, cuanto mayor es el campo mayor es la cantidad de células dañadas.

Por todo esto, se confirma la hipertermia dirigida mediante la utilización de microhilos magnéticos como una

alternativa novedosa, efectiva y sobre todo menos invasiva para el tratamiento de pacientes afectados por osteosarcoma.

microwires, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol 249, sup 1-2, 2002, pp 79-84

Agradecimientos

Por último, agradecer a Tamag Ibérica S.L. por proporcionarnos los microhilos magnéticos para poder llevar a cabo este estudio y a Fomento de San Sebastián por financiar el proyecto de investigación.

Referencias

- [1] Página web de Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org> (Consultada: Septiembre 2017).
- [2] Página web de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) <https://www.aecc.es> (Consultada: Septiembre 2017).
- [3] Peris-Bonet R, Salmeron D, Martinez-Beneito MA, Galceran J, Marcos-Gragera R, Felipe S, Gonzalez V, Sanchez de Toledo Codina J. Childhood cancer incidence and survival in Spain, *Annals of Oncology*, vol 21, sup 3, 2010, pp 103-110
- [4] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics 2009, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol 59, sup 4, 2009, pp 225-249
- [5] Casciato DA. Manual of Clinical Oncology, *The Journal of the American Medical Association*, vol 291, sup 20, 2004, pp 2415-2417
- [6] Fan QY, Ma BA, Qiu XC, Li YL, Ye J, Zhou Y. Preliminary report on treatment of bone tumors with microwave-induced hyperthermia, *Bioelectromagnetics*, vol 17, sup 3, 1996, pp 218-222
- [7] Fan QY, Ma BA, Zhou Y, Zhang MH, Hao XB. Bone tumors of the extremities or pelvis treated by microwave-induced hyperthermia, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol 406, 2003, pp 165-175
- [8] Binns C. Magnetic nanoparticle hyperthermia treatment of tumours, *Nanostructured Materials for Magneto-electronics*, cap 8, 2013, pp 197-215, Springer Series in Materials Science, vol 175
- [9] Ortega D, Pankhurst Q. Magnetic hyperthermia, *Nanoscience: Vol 1: Nanostructures through Chemistry*, cap 3, 2013, pp 60-88, Royal Society of Chemistry: Cambridge
- [10] Kumar CS, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol 63, sup 9, 2011, pp 789-808
- [11] Talaat A, Alonso J, Zhukova V, Garaio E, García JA, Srikanth H, Phan MH and Zhukov A. Ferromagnetic glass-coated microwires with good heating properties for magnetic hyperthermia, *Scientific Reports*, vol 6, art num 39300, 2016
- [12] Goto T, Nagano M, Wehara N. Mechanical properties of amorphous Fe₈₀P₁₆C₃B₁ filament produced by glass-coated melt spinning, *Transactions of the Japan Institute of Metals*, vol 18, num 11, 1977, pp 759-764
- [13] Zhukova V, Blanco JM, Ipatov M, Zhukov A. Effect of transverse magnetic field on domain wall propagation in magnetically bistable glass-coated amorphous microwires, *Journal of Applied Physics*, vol 106, num 113914, 2009
- [14] Zhukova V, Cobeño AF, Zhukov A, de Arellano Lopez AR, López-Pombero S, Blanco JM, Larin V, Gonzalez J. Correlation between magnetic and mechanical properties of devitrified glass-coated Fe_{71.8}Cu₁Nb_{3.1}Si₁₅B_{9.1}