



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Fisiología

Aplicación de Campos Electromagnéticos e Hipertermia al Tratamiento del Cáncer

Ali Jihad Jebbar

Enero del 2025

Directores:

Enrique Antonio Navarro Camba

Elena Obrador Pla

Tutor:

José María Estrela Arigüel

D. Enrique A. Navarro Camba, Catedrático del Dpto. de Informática y Dña. Elena Obrador Pla, Catedrática del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Aplicación de Campos Electromagnéticos e Hipertermia al Tratamiento del Cáncer**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **D. Ali Jihad Jebbar**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 6 de enero de 2024.

Fdo:

Enrique A. Navarro Camba

Elena Obrador Pla

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y entidades que han contribuido de manera fundamental al desarrollo de esta tesis doctoral en el Departamento de Fisiología. Sin su apoyo, compromiso e inspiración, este logro no habría sido posible.

En primer lugar, deseo agradecer profundamente a mis directores y tutor de tesis, por su guía, sus valiosas recomendaciones y su paciencia inagotable durante todo el proceso. Sus conocimientos y enfoque crítico me han ayudado a crecer académicamente y a superar los retos que se presentaron en el camino. A los miembros y profesores del departamento de Fisiología de la facultad de Farmacia por sus consejos y simpatía.

A mis amigos y en especial familiares, quienes me brindaron su amor, comprensión y apoyo emocional en los momentos más difíciles, gracias por ser mi sustento y motivación constante. Su fe en mí me impulsó a seguir adelante cuando las circunstancias parecían complicadas.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento. Esta tesis es tanto un reflejo de mi trabajo como del apoyo incondicional y las contribuciones de quienes me rodean.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	5
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Fisiopatología del cáncer. Desarrollo de metástasis.	11
1.2. Factores implicados en la adquisición de quimio y/o radioresistencia	19
1.3. Cánceres con alta mortalidad como necesidad médica no cubierta	32
1.4. El pterostilbeno en la terapia del cáncer.....	36
1.5. Campos electromagnéticos y <i>tumor treating fields</i>	38
1.6. La hipertermia en oncoterapia.....	47
1.7. Asociación de EMFs con técnicas no invasivas de inducción de HT ..	57
1.8. Tecnología HIFU	59
2. OBJETIVOS.....	63
3. MATERIAL y MÉTODOS	65
3.1. Cultivos celulares	65
3.2. Sistema híbrido de exposición a EMF e HT <i>in vitro</i>	66
3.3. Citometría de flujo y análisis de la muerte celular.....	84
3.4. Citocromo C, AIF y proteínas de shock térmico.....	85
3.5. Potencial de membrana mitocondrial	86
3.6. Consumo de oxígeno.....	87
3.7. Determinación de H ₂ O ₂	88
3.8. Determinación del radical superóxido	88
3.9. Compartimentación de las células cancerígenas	89

3.10. ATP	90
3.11. Valoración de GSH	90
3.12. Actividad caspasa-3	91
3.13. Integridad de la membrana lisosomal	93
3.14. Actividad de las catepsinas	93
3.15. Silenciamiento génico	94
3.16. Xenoinjertos tumorales	95
3.17. Tratamiento <i>in vivo</i> con radiaciones no ionizantes	96
3.18. Tratamiento <i>in vivo</i> con gemcitabina y PT	98
3.19. Técnica de detección de células cancerosas <i>in vivo</i>	98
3.20. Evaluación de los efectos tóxicos del tratamiento	99
3.21. Declaración de ética experimental	99
3.22. Análisis estadístico	100
4. RESULTADOS.....	101
4.1. Efectos antitumorales de los EMFs y la HT.....	101
4.2. Los EMFs y la HT inducen estrés oxidativo y la liberación de señales proapoptóticas mitocondriales	110
4.3. Los EMFs y la HT incrementan la permeabilidad lisosomal.....	118
4.4. Efectos antitumorales de los EMFs y la HT combinados con quimioterapia estándar	123
4.5. Otras estrategias para potenciar el efecto anticancerígeno de los EMFs y la HT.....	129
4.6. Efecto del tratamiento con EMFs, HT, GEM y PT sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas humano	131
5. DISCUSIÓN.....	137
6. CONCLUSIONES.....	145
7. BIBLIOGRAFÍA.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

AZ: Apoptozol

BRAF: Homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf

CAT: Catalasa

CSC: Célula madre cancerosa

Cyt: Compartimento citosólico

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco

DMT: Dosis máxima tolerable

EMFs: Campos electromagnéticos

FCS: Suero fetal de ternera

GDH: Glutamato deshidrogenasa

GEM: Gemcitabina

GPX: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación oxidado

HIFU: Ultrasonidos focalizados de alta intensidad

HO: Hemo oxigenasa

HSP: Proteína de choque térmico

HT: Hipertermia

LMP: Permeabilización de la membrana lisosomal

LRHT: Hipertermia local-regional

MMP: Potencial de membrana mitocondrial

Mt: Compartimento mitocondrial

Nrf2: Factor Nuclear Relacionado con el Factor 2 Eritroide

NSCLC: Carcinoma de pulmón de células no pequeñas

OMS: Organización Mundial de la Salud
PAC: Paclitaxel
PARP: Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PKC: Proteín quinasa C
PMA: 12-miristoil-13-acetato de forbol
PT: Pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno)
rfEMFs: Campos electromagnéticos de radiofrecuencia
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RT: Radioterapia
SOD: Superóxido dismutasa
TPMP: Metil-trifenilfosfonio marcado
TTFs: *Tumor treating fields*
WBH: Hipertermia de cuerpo entero

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los mecanismos de extravasación e invasión del hígado por parte de las células de un melanoma	18
Figura 2. Campo magnético a lo largo del eje de un solenoide.....	72
Figura 3. Distribución espacial de campo magnético de dos solenoides contiguos en un mismo plano en unidades de μT	74
Figura 4. Modelado numérico de bobina de 1100 vueltas con espiras cuadradas.....	75
Figura 5. Niveles de campo magnético generados por una bobina de espiras cuadradas en unidades de Tesla	76
Figura 6. Bobinas utilizadas en las pruebas preliminares	77
Figura 7. Aplicador WE-76030811 utilizado en el montaje <i>in vitro</i> .	78
Figura 8. Modelado numérico-matemático del aplicador WE-76030811.....	79
Figura 9. Niveles de campo en varios planos del aplicador WE-76030811.....	80
Figura 10. Representación esquemática del sistema experimental utilizado in vivo para tratar los xenoinjertos de cáncer de páncreas .	81
Figura 11. Niveles de campo para la exposición de jaulas con una base 32cm x 25cm.	822
Figura 12. Montaje experimental para la exposición de dos jaulas..	83
Figura 13. Medida de niveles de exposición en jaula	833

Figura 14. Viabilidad de las células A2058, AsPC1 y MDA-MB-231 expuestas a EMFs y/o HT	104
Figura 15. Efectos de los EMFs y la HT sobre la distribución del ciclo celular (A) y el tipo de muerte celular (B)	106-7
Figura 16. Efecto de los EMFs e HT sobre la activación de la apoptosis en las células cancerosas	10909
Figura 17. Efecto de EMFs e HT sobre los niveles de HSP70 y HSP110 y la permeabilidad lisosomal.....	1194
Figura 18. Efecto del silenciamiento de la Hsp70 (shRNA) sobre el aumento de las actividades catepsina citosólicas inducida por EMFs e HT en células AsPC1.	12217
Figura 19. Efecto de los EMFs, la HT y la quimioterapia sobre la viabilidad de las células tumorales.....	12719
Figura 20. Viabilidad de las células cancerosas tratadas con EMFs + HT, PT y/o terapia dirigida anti-Hsp70 (apoptozol, Az).....	13022
Figura 21. Efecto de los EMFs+HT, GEM y/o PT sobre el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma de páncreas	1334

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Glosario de las magnitudes relacionadas en las ecuaciones de Maxwell	66
Tabla 2. Efecto de EMFs e HT sobre la generación de ROS y los mecanismos implicados en la activación de la apoptosis	117
Tabla 3. Hematología y bioquímica clínica de los ratones portadores de de xenoinjertos de células de cáncer de páncreas (AsPC1) tratados con EMFs + HT + GEM + PT.....	136

RESUMEN

El uso de radiaciones electromagnéticas no ionizantes (NIR), ondas electromagnéticas en la banda de microondas, y ondas mecánicas de ultrasonidos de alta intensidad, están en continua evolución para el tratamiento del cáncer, aunque su aplicación terapéutica está todavía poco desarrollada. En términos de combinaciones potenciales, el uso de nanopartículas magnéticas biocompatibles, como mediadores de calor, se ha investigado ampliamente, aunque su uso (a pesar de los numerosos ensayos clínicos realizados) todavía no ha conseguido ser aprobado para ninguna indicación de oncoterapia. El desarrollo de nanomediadores de calor más eficientes y que puedan mostrar altas tasas de absorción específica, sigue siendo un problema no resuelto, y su posible toxicidad a corto y a largo plazo, un tema de debate.

El objetivo principal de esta tesis es investigar si la aplicación externa de campos electromagnéticos (EMFs) junto con un inductor de hipertermia (HT), es un procedimiento efectivo para disminuir la viabilidad de las células tumorales, *in vivo* e *in vitro*. Además, otros objetivos específicos de esta tesis son:

- Elucidar cuáles son los mecanismos y/o vías moleculares implicadas en los efectos antitumorales de los EMFs y la HT.

- Evaluar posibles sinergismos con otras estrategias terapéuticas que contribuyan a aumentar la eficacia anticancerígena de los EMFs y la HT.

Se han llevado a cabo estudios *in vitro*, en los que, células cancerosas humanas de melanoma (A2058), de carcinoma de páncreas (AsPC1), y de carcinoma de mama MDA-MB-231) han sido tratadas con EMFs e HT (empleando un baño termostatzado). Los resultados demuestran que, *in vitro*, el tratamiento aislado con EMFs (25μT, 4h) o HT (52°C, 40min) tiene un efecto citotóxico limitado sobre las células cancerosas. Sin embargo, su aplicación combinada reduce la viabilidad de las células A2058, AsPC1 y MDA-MB-231 a aproximadamente el 16%, 50% y 21% de los valores control, respectivamente. Los mecanismos subyacentes a estos resultados son el aumento de la permeabilidad lisosomal, la liberación de catepsinas al citosol y la activación de muerte celular dependiente de las mitocondrias.

También se ha estudiado el efecto de los EMFs y la HT en combinación con quimioterapia estándar (paclitaxel o gemcitabina), con pterostilbeno y con terapia dirigida (apoptozol). *In vitro*, la viabilidad de las células cancerosas queda reducida al 0% combinando EMFs, HT y quimioterapia estándar, siendo igualmente efectiva la combinación con apoptozol (terapia dirigida anti-Hsp70).

Finalmente, como prueba de concepto, hemos evaluado la eficacia del tratamiento combinado EMFs, HT y gemcitabina en

ratones portadores de xenoinjertos de células AsPC1. Para la aplicación del tratamiento *in vivo* se utilizó un dispositivo experimental diseñado por nuestro grupo de investigación que permite aplicar los EMFs y la HT inducida por HIFU (*high-intensity focused ultrasounds*) directamente a los xenoinjertos. Los resultados demuestran que *in vivo*, el tratamiento con EMFs+HT es significativamente más eficaz que el quimioterápico de elección para el tratamiento del cáncer de páncreas (GEM). Además, la aplicación de EMFs +HT sensibiliza a las células cancerosas al efecto de la GEM y el PT hasta el punto de conseguir la regresión completa de los xenoinjertos de cáncer de páncreas. Los resultados demuestran también que ni el tratamiento EMFs+HT, ni el tratamiento completo, inducen efectos tóxicos de importancia en los ratones tratados.

Como conclusión, se puede afirmar que las NIR no invasivas (EMFs y la HT inducida por HIFU) son terapias anticancerígenas eficaces y carentes de efectos tóxicos en el modelo *in vivo* evaluado. Su eficacia aumenta significativamente al combinarse con otras oncoterapias en vigor en la práctica clínica, y con tratamientos experimentales como la terapia dirigida anti-Hsp70. El desarrollo de este nuevo tratamiento podría facilitar la eliminación de cánceres localizables mediante técnicas de imagen estandarizadas en la práctica clínica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fisiopatología del cáncer. Desarrollo de metástasis.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1), el cáncer engloba al conjunto de enfermedades que pueden afectar, directa o indirectamente, a cualquier parte del organismo. Puede comenzar en cualquier órgano o tejido del cuerpo, donde las células anormales crecen sin control invadiendo zonas contiguas y/o diseminándose a otros órganos. Este último proceso se denomina metástasis y es la principal causa de muerte por cáncer. Según la OMS, neoplasia y tumor maligno son términos sinónimos para referirse al cáncer.

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en todo el mundo. Según la estadística hecha pública por la OMS, en 2022 se produjeron 20 millones de nuevos casos de cáncer y 9,7 millones de muertes, o una de cada seis muertes. Los cánceres de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los tipos de cáncer más comunes en los hombres; mientras que los de mama, colorrectal, pulmón, de cuello uterino y de tiroides son los más comunes entre las mujeres (1). Según la OMS, en el año 2022, los casos más comunes de nuevos casos de cáncer, a nivel mundial, fueron:

- Pulmón (2,5 millones de casos)
- Mama (2,3 millones de casos)

- Colon y recto (1,9 millones de casos)
- Próstata (1,5 millones de casos)
- Piel (no melanoma) (1,3 millones de casos)
- Estómago (1,0 millones de casos)

En términos generales, el cáncer surge de la transformación de células normales en células tumorales en un proceso de múltiples etapas que generalmente progresa de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estos cambios son el resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes externos, que incluyen:

- Cancerígenos físicos, como las radiaciones ionizantes y ultravioletas
- Carcinógenos químicos, como el asbesto, los componentes del humo del tabaco, el alcohol, la aflatoxina (un contaminante de los alimentos) y el arsénico (un contaminante del agua potable)
- Carcinógenos biológicos, como los asociados a infecciones por ciertos virus, bacterias o parásitos.

La OMS, a través de su agencia específica para el cáncer, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, www.iarc.who.int), publica regularmente una clasificación exhaustiva de agentes cancerígenos (1).

La acumulación general de riesgo se combina con la tendencia a que los mecanismos de reparación celular sean menos efectivos a

medida que la persona envejece. Además, existen otros factores de riesgo como el consumo de tabaco y/o alcohol, las dietas poco saludables, la falta de actividad física y la contaminación atmosférica (2). Algunas infecciones crónicas son factores de riesgo de cáncer; un problema de particular importancia en los países de bajos y medianos ingresos. Aproximadamente el 13% de los cánceres diagnosticados en 2018 en todo el mundo se atribuyeron a infecciones procancerígenas, como las que implican al *Helicobacter pylori*, el virus del papiloma humano (VPH), el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C y el virus de Epstein-Barr (3).

Según las directrices e información publicadas, tanto por la OMS como por la *American Cancer Society* (www.cancer.gov), la incidencia del cáncer continúa creciendo en todo el mundo, ejerciendo una enorme presión física, emocional y financiera sobre las personas, las familias, las comunidades y los sistemas de salud. La mortalidad por cáncer se reduce cuando los casos se detectan precozmente y reciben un tratamiento específico. La oncoterapia suele incluir cirugía, radioterapia y/o terapia sistémica (quimioterapia, tratamientos hormonales, terapias biológicas dirigidas, etc.). La selección adecuada de un régimen de tratamiento tiene en cuenta tanto al cáncer como al individuo que se está tratando. La finalización del protocolo de tratamiento en un período de tiempo definido es importante para lograr el resultado terapéutico previsto.

El proceso por el cual las células normales se transforman en cancerosas se denomina carcinogénesis y puede estar influido por múltiples factores relacionados con la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas. La transformación progresiva de células normales a fenotipos malignos se originaba a través de mutaciones (activación de oncogenes o pérdida de genes supresores de tumores) que confieren a una célula la capacidad de dividirse a una tasa mayor que su cohorte original, y generar una descendencia que conserva la mutación inicial y que suele adquirir mutaciones adicionales (4). La inmunovigilancia permite que muchas de las células que inician el proceso de malignización sean destruidas por el sistema inmune, aunque también es cierto que las células tumorales también son capaces de reprimir la expresión de antígenos tumorales lo que dificulta el reconocimiento por los linfocitos y facilita la evasión de la respuesta inmunitaria (5).

El mecanismo de generación de metástasis implica la diseminación de células cancerosas desde el lugar donde se formó el cáncer por primera vez hasta otra parte del cuerpo. La metástasis se presenta cuando las células cancerosas logran desprenderse del tumor primario, y alcanzan tejidos distantes a través de la sangre, el sistema linfático o por vía transcelómica. El nuevo tumor metastásico es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario. Existe una correlación entre el desarrollo de metástasis y el 90% de la mortalidad vinculada a neoplasias

sólidas (6). Aunque el fenotipo de las células madre tumorales (CSCs) es un factor importante para la actividad metastática, no todas las CSCs pueden desarrollar metástasis pero sí pueden adquirir este fenotipo durante la migración (7). En este sentido, cobra gran relevancia tanto la heterogeneidad genética y epigenética como los elementos de señalización internos y externos del microambiente celular (8). El desarrollo de las metástasis involucra cinco etapas claves (cascada metastática), desde que una célula individual o un grupo de células adquieren el carácter invasivo en el nódulo primario hasta el establecimiento del tumor en un órgano o tejido diferente al primario (9). Etapas de la cascada metastática:

i) Adquisición del potencial invasivo y de migración.

El inicio requiere de la activación de factores de transcripción que permitan la transformación para la adquisición de un fenotipo mesenquimal, el cual favorece la migración y supervivencia celular (transformación epitelio-mesenquimal). La pérdida de conexiones intercelulares, la emisión de exosomas y el aumento de los niveles de citocinas y factores de crecimiento prepararán un nicho pre-metastásico en la región donde se iniciará el tumor secundario. Reforzamiento de la señalización pro-oncogénica y activación de crecimiento del tumor, inmunosupresión, y reprogramación de células del estroma son factores facilitadores adicionales.

ii) Invasión de la membrana basal.

Implica comunicación de la matriz extracelular con células vasculares y células del mesotelio. Durante el proceso, el núcleo de las células tumorales se altera, lo que provoca un reordenamiento genómico que resulta crítico para el desarrollo del potencial metastásico.

iii) Migración a través del organismo.

El transporte celular ocurre, principalmente, a través de los vasos sanguíneos, incluidos los formados por la angiogénesis inducida en torno al tumor. Otras vías de migración son los vasos linfáticos, o la migración transcelómica (por medio de una cavidad serosa o cefalorraquídea, es decir, a través de las mucosas del cuerpo).

iv) Extravasación al nuevo tejido.

En este proceso, el primer paso es una interacción entre las células tumorales y las células del endotelio vascular. Es un mecanismo complejo y necesita de la interacción de múltiples efectores como p.e. las integrinas, una superfamilia de glucoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de las células con la matriz extracelular. Las células tumorales pueden inducir necrosis para facilitar su migración a través del endotelio. Opcionalmente, algunas células invasoras se adhieren al endotelio y mediante movimientos ameboides se deforman para atravesar las fenestras que dejan entre si las células endoteliales. En este proceso, el endotelio libera, bajo estímulo de diferentes citoquinas, especies

reactivas del oxígeno y en nitrógeno que eliminan un porcentaje de las células cancerosas. También es frecuente que émbolos formados por el crecimiento intravascular de las células tumorales causen necrosis localizadas que facilitan la invasión (figura 1). Dependiendo del origen del tumor primario, puede existir una predisposición a iniciar nódulos secundarios principalmente en regiones muy vascularizadas.

- v) Invasión del tejido secundario y formación de micro/macro metástasis. Llegados a este punto, el proceso migratorio llega a su fin, iniciando la adaptación a un nuevo microambiente pudiendo retornar a su fenotipo epitelial, entrar en senescencia o provocar la aparición de nódulos secundarios. Como resultado las células que metastatizan muestran niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (ROS), esto facilita su adaptación, crecimiento y supervivencia en el órgano colonizado.

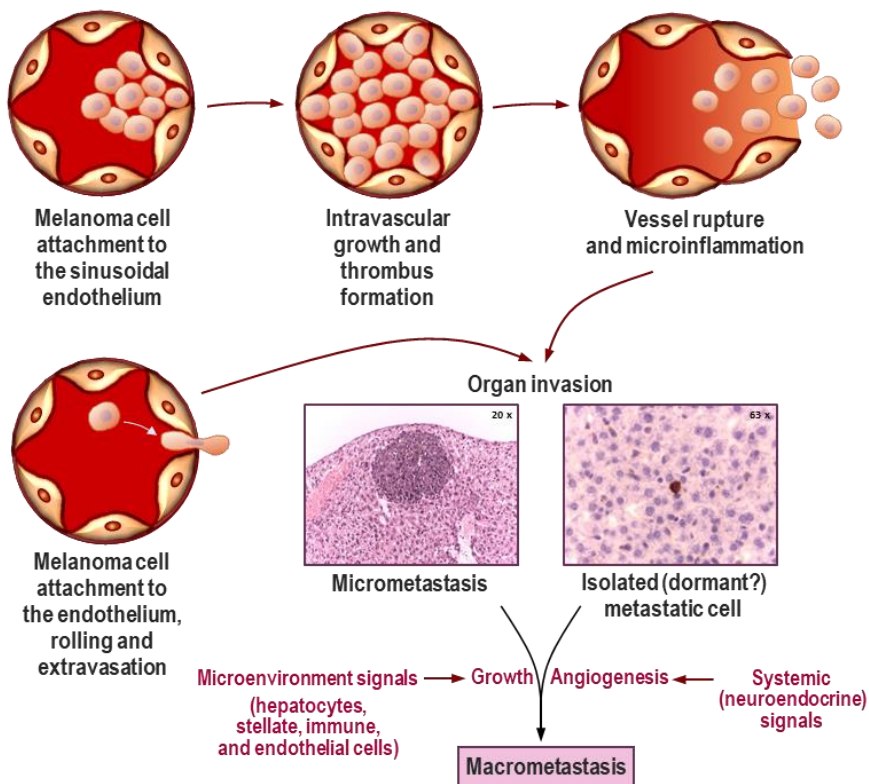


Figura 1. Esquema de los mecanismos de extravasación e invasión del hígado por parte de las células de un melanoma (10). Las células de melanoma, después de adherirse al endotelio vascular sinusoidal, pueden proliferar dentro de los capilares y, eventualmente, causar la ruptura de los vasos o migrar a través de las fenestras de la pared endotelial. Las células invasoras pueden iniciar la proliferación dentro del parénquima hepático y formar micrometástasis (células teñidas con hematoxilina y eosina, aumento 20x) o permanecer aparentemente inactivas (células de melanoma teñidas con S100, aumento 63x). La proteína S100 sigue siendo el marcador inmunohistoquímico más sensible de diferenciación melanocítica, siendo difusamente positivo en todas las lesiones benignas y malignas primarias y secundarias, incluidos los melanomas nevoides y en la mayoría de los melanomas desmoplásicos/de células fusiformes. Las microfotografías corresponden a células de melanoma murino B16 que crecen en la piel (ratones C57BL/6J) y que metastatizaron espontáneamente en el hígado. El crecimiento metastático y la formación de macrometastasis requieren activación de la angiogénesis e implican múltiples mecanismos de señalización (sistémicos y relacionados con el microambiente).

1.2. Factores implicados en la adquisición de quimio y/o radioresistencia

La adquisición de radio- y/o quimiorresistencia es la principal causa de recaída en el paciente oncológico. La radiorresistencia en el cáncer a menudo es causada por la respuesta de reparación al daño del ADN inducido por la radiación, la desregulación del ciclo celular, la resiliencia de las células madre cancerosas, la transición epitelial-mesenquimatosa, la presencia de ARN exosomal y no codificante, la reprogramación metabólica, y la implementación de mecanismos de escape a la muerte celular (11). Aunque hay muchos mecanismos comunes entre radio- y quimiorresistencia, en ésta última son especialmente importantes la heterogeneidad del cáncer, incluida la diversidad del linaje de las células tumorales y la plasticidad celular, el espectro de mutaciones somáticas, la complejidad de los microambientes y las características inmunosupresoras, lo que requiere el uso de muchos enfoques terapéuticos diferentes (12).

La resistencia a los fármacos puede clasificarse de dos formas: a) la resistencia intrínseca, cuando los tumores son resistentes antes del tratamiento y, por lo tanto, los fármacos no son efectivos, incluso con un diagnóstico y tratamiento tempranos iniciales; y b) la resistencia adquirida, que ocurre después de ciclos prolongados de tratamiento, a pesar de una respuesta inicial positiva. La resistencia intrínseca incluye alteraciones en la regulación de las proteínas involucradas en la adquisición de características del

cáncer; mientras que la resistencia adquirida tiende a preservar las alteraciones originales y desarrollar alteraciones adicionales que pueden hacer que las células cancerosas se adapten para resistir tratamientos con fármacos adicionales. Más allá de alteraciones moleculares específicas, que sustentan la terapia dirigida, muchas evidencias sugieren que alteraciones en la regulación del estado redox y en la expresión de moléculas implicadas en la reparación del ADN y en la apoptosis, juegan un papel importante en la supervivencia de las células cancerosas frente a la terapia (13). En las últimas décadas, los avances técnicos en cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapias dirigidas, así como los avances en el conocimiento de la biología del cáncer, han ayudado a mejorar sustancialmente el estándar de atención del cáncer con respecto a las tasas de respuesta global, la supervivencia libre de progresión y la calidad de vida de los pacientes (www.cancer.gov). La inmunoterapia, en particular, ha revolucionado el estándar de atención para pacientes con cáncer a largo plazo (14). Por ejemplo, los enfoques de inmunoterapia como el bloqueo del punto de control inmunitario se utilizan cada vez más en el tratamiento, ya sean solos o en combinación con quimioterapia o radioterapia. Una estrategia que no está exenta de limitaciones asociadas a la toxicidad *in vivo* (15,16).

El éxito de la terapia contra el cáncer sigue siendo un desafío importante, particularmente en tumores que implementan mecanismos de resistencia; y también porque todas las

oncoterapias tiene asociadas toxicidades potenciales para el paciente, que suelen afectar especialmente a los tejidos altamente proliferativos como son, la médula ósea y el epitelio gastro intestinal (17). Además, las células resistentes a la radio/quimioterapia son capaces de inducir inmunosupresión en el medioambiente tumoral que conlleva, en muchas ocasiones a la recidiva (18). Desafortunadamente, hasta el momento, no se dispone de biomarcadores que sean fiables para predecir la sensibilidad del tejido normal de un paciente determinado a un tratamiento determinado (19,20).

Un problema adicional radica en el hecho de que tanto los agentes quimioterapéuticos como la radioterapia pueden facilitar la transformación fenotípica de células cancerosas supervivientes residuales en un fenotipo altamente agresivo y resistente debido a las mutaciones que estos agentes pueden causar (21). Por lo que, la comprensión de los mecanismos moleculares, mediante los cuales los tumores superan la toxicidad a los tratamientos, es un paso crítico para llegar a prevenir o revertir las resistencias (22). Por otra parte, las diferentes oncoterapias pueden combinarse. Por ejemplo, la quimioterapia puede asociarse al tratamiento con radioterapia, incluso la primera puede aumentar la sensibilidad de un tumor a la radiación. Generalmente la radioterapia es utilizada para el tratamiento de tumores localizados y radiosensibles, mientras que la quimioterapia es un tratamiento sistemático (23). Lo anterior genera que sean complementarias y por ende que la

resistencia generada a la quimioterapia repercute en la resistencia a la radioterapia (24).

Otro aspecto clave es la relación entre los mecanismos de reparación del ADN y el desarrollo y progresión del cáncer. Esto ha motivado el desarrollo de una nueva estrategia terapéutica basada en la combinación de agentes que dañan el ADN con inhibidores de las vías de reparación del ADN. Los tratamientos contra el cáncer más comunes, incluida la quimioterapia o la radioterapia, están diseñados para inducir la muerte celular mediante daño directo o indirecto al ADN. Sin embargo, las células tumorales pueden implementar vías de reparación del ADN para resistir a la quimio/radioterapia (25). Entre ellos, la poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) desempeña un papel crucial en la respuesta al daño al ADN, y los inhibidores dirigidos a PARP1 han generado especial atención en la investigación contra el cáncer (26). La FDA ha aprobado algunos inhibidores de PARP (PARPi) para el tratamiento de cánceres de mama, ovario y próstata que tienen una deficiencia en la reparación del ADN (por ejemplo, células deficientes en BRCA1/2) (27). Los beneficios terapéuticos de estos agentes deben ser evaluados más a fondo en el tratamiento del cáncer, y se deben desarrollar inhibidores capaces de reducir los efectos adversos en los tejidos y células normales. La combinación de radioterapia o quimioterapia con inhibidores de la reparación del ADN pueden aumentar las lesiones mutagénicas en las células sobrevivientes, y fomentar en ellas la radio y la quimiorresistencia (28).

En los últimos años, se ha prestado más atención a la relación entre los mecanismos de reparación del ADN nuclear y la resistencia terapéutica, pero menos a la reparación mitocondrial. Debido a las diferencias entre el ADN mitocondrial en las células cancerosas y las células normales, el desarrollo de inhibidores de la vía de reparación del ADN mitocondrial que puedan reducir los efectos adversos en las células normales puede ser una estrategia más efectiva para mejorar la terapia anticancerígena que dirigirse al ADN nuclear. Un mejor entendimiento de los mecanismos de las vías de reparación del ADN mitocondrial facilitará el desarrollo de nuevos quimio- y radiosensores efectivos mediante la orientación de la vía de reparación del ADN mitocondrial en la terapia del cáncer (25).

La investigación y los ensayos clínicos han validado la importancia terapéutica de utilizar inhibidores específicos del ADN, principalmente en combinación con fármacos que dañan el ADN. Pueden surgir problemas inesperados al intentar inhibir directamente pasos en algunas vías de reparación del ADN, pero un mayor entendimiento de la interacción entre las vías está llevando a rutas de inhibición. A nivel mundial, quizás el mayor desafío técnico en el desarrollo de inhibidores de reparación del ADN es la especificidad del objetivo, ya que los sitios activos de una proteína reparadora suelen ser relativamente pequeños y están enterrados profundamente dentro de la estructura terciaria de la proteína. En algunos casos, la unión inhibitoria a regiones

fuera del sitio catalítico también puede modular la función de la proteína, y algunos inhibidores de próxima generación (particularmente inhibidores de quinasas) están buscando aprovechar tales bolsillos de unión divergentes. Para obtener el mayor beneficio terapéutico de estas terapias, el desarrollo de biomarcadores es crucial para ayudar a establecer qué poblaciones de pacientes son candidatas y responderán mejor al uso de inhibidores de reparación del ADN como parte de su régimen terapéutico. El desarrollo simultáneo de inhibidores de reparación del ADN y biomarcadores permitirá la detección y tratamiento tempranos de los cánceres y nos acercará más a ofrecer una medicina verdaderamente personalizada (29).

Los miembros de la familia Bcl-2, son importantes reguladores de la apoptosis, la necroptosis, la autofagia y la generación de ROS. Y, además, desempeñan roles cruciales en la tumorigénesis, el desarrollo del cáncer y la resistencia al tratamiento (30). De hecho, numerosos estudios han indicado que una mayor expresión de Bcl-2 o un aumento en la proporción Bcl-2/Bax están claramente asociados a que las células cancerosas sean resistentes a la quimioterapia y la radiación tanto *in vitro* como *in vivo* (31). La disminución de Bax se asocia a la resistencia a la muerte celular inducida por estrés y mediada por p53 (p53 puede suprimir la transcripción de Bcl-2 (32). Consecuentemente, la reprogramación de células tumorales para inducir apoptosis con quimioterapia o radioterapia es una

estrategia prometedora para tratar enfermedades neoplásicas resistentes y recurrentes. Esto se puede lograr regulando negativamente los factores antiapoptóticos o activando factores proapoptóticos en las células tumorales (33). Las moléculas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y Mcl-1, están frecuentemente sobreexpresadas en las células cancerosas quimiorresistentes (34). A modo de ejemplo, la sobreexpresión de Bcl-2 puede deberse a una disminución de la amplificación genética de microARN (miARN) específicos, a un aumento de la metilación del gen Bcl-2 o incluso deleciones cromosómicas que conducen a la pérdida de miARN dirigidos a Bcl-2, como el miR-195 (35). Además, los pacientes con neoplasias malignas Bcl-2 positivas tienen un mayor riesgo de fracaso del tratamiento y un mal pronóstico (36). La recaída y progresión del cáncer a menudo coinciden con una mayor expresión de Bcl-xL (37). En pacientes con recaídas, también se han observado con frecuencia niveles elevados de Mcl-1, lo que sugiere que Mcl-1 desempeña un papel en la resistencia a la quimioterapia tras regímenes de quimioterapia continuados (38). En consecuencia, el desarrollo de fármacos específicamente dirigidos a bloquear o inhibir la expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 puede representar una nueva vía terapéutica.

El estrés oxidativo refleja un desequilibrio entre generación de ROS y la capacidad de un sistema biológico para eliminar dichos intermediarios reactivos o reparar el daño resultante. Por ejemplo,

la disminución de la ratio glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) o NADPH/NADP⁺, son consideradas marcadores de estrés oxidativo (39). Las ROS pueden generarse tanto por procesos enzimáticos como no enzimáticos. La formación enzimática de ROS incluye la producción de radical superóxido desde la cadena de transporte de electrones mitocondrial, o su producción a través de las NADPH oxidasas, la xantina oxidasa y la ciclooxygenasa. Por vía no enzimática, mediante las reacciones de Fenton o Haber-Weiss se pueden generar hidroxilo a partir de H₂O₂. Los quelantes de radicales libres y los antioxidantes (GSH, ácido úrico, vitaminas C o E, entre otros) son esenciales en la prevención de los daños inducidos por la sobreproducción de ROS, y también los son enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas, MnSOD y Cu/ZnSOD (ubicadas en las mitocondrias y el citosol respectivamente), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX), la glutatión reductasa y la hemo oxigenasa (HO) (39).

Si bien la producción controlada de ROS es una importante vía de señalización celular, su sobreproducción causa daño a las macromoléculas y puede sobrevenir en activación de la carcinogénesis y/o muerte celular, actuando como una espada de doble filo (40). De hecho, las células utilizan la señalización vía ROS para favorecer su proliferación. Esto implica un estado de mayor estrés oxidativo basal, lo que las puede hacer más vulnerables a la radioterapia y a los agentes quimioterapéuticos

que aumentan aún más la generación de ROS o que debilitan las defensas antioxidantes celulares. Sin embargo, las células cancerosas resistentes a los tratamientos se adaptan al estrés oxidativo intrínseco o inducido por fármacos aumentando la capacidad de sus sistemas antioxidantes (41). Por ejemplo, investigaciones recientes, han demostrado que la sobreexpresión de HO-1 está involucrada en la resistencia a la quimioterapia y radioterapia de tumores cerebrales como el neuroblastoma, el meduloblastoma, el meningioma y el astrocitoma (42). Otros estudios, referentes a líneas celulares de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), demostraron que altos niveles de antioxidantes estaban asociados con una disminución de la unión del platino al ADN y una acumulación intracelular de platino, lo que se asociaba a una mayor resistencia al cisplatino. De hecho, la reducción de GSH sensibilizó a las células de cáncer de pulmón al cisplatino (43).

También se ha demostrado un aumento de la capacidad antioxidante en células de cáncer de mama con multirresistencia a fármacos. La sobreexpresión de SLC7A11/xCT, un antiportador que media la captación de cistina extracelular en intercambio con glutamato intracelular, es una característica general de las células de cáncer de mama resistentes a los tratamientos (44). La cistina se reduce a cisteína, que es un precursor limitante de la velocidad en la síntesis de GSH; un proceso que protege a las células del

estrés oxidativo y, por lo tanto, es fundamental para el crecimiento, la proliferación y el metabolismo celular. Se ha demostrado que la disminución en la actividad del xCT alteraba el equilibrio redox intracelular de las CSC y su potencial biológico. A modo de ejemplos, xCT está implicado en la quimiorresistencia del cáncer de pulmón, y en la resistencia al cisplatino de las células de cáncer de ovario (45).

El estrés oxidativo también es una de las principales causas subyacentes en el desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC). El Factor Nuclear Relacionado con el Factor 2 Eritroide (Nrf2) es un factor de transcripción citosólico que regula la homeostasis redox activando la expresión de una serie de genes dependientes de elementos de respuesta antioxidante. Nrf2 muestra funciones contradictorias en el hígado normal y sano y en el HCC; en el primero, Nrf2 ofrece efectos beneficiosos, mientras que en el segundo provoca efectos perjudiciales favoreciendo la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. La activación sostenida de Nrf2 se ha observado en el HCC y facilita su progresión y agresividad (46). Además, en células de cáncer de hígado Hepa-1 y HepG2, Nrf2 medió la sobreexpresión del gen antiapoptótico Bcl-xL, inhibiendo la apoptosis y promoviendo la resistencia a los fármacos (47).

El cáncer de páncreas es un tumor extremadamente agresivo y resistente a los tratamientos, y su naturaleza invasiva y refractaria a la intervención terapéutica lo convierte en uno de los cánceres

con peor pronóstico. Se ha demostrado sobreexpresión de Nrf2 en líneas celulares de cáncer de páncreas y adenocarcinomas ductales, indicando una mayor capacidad intrínseca de estas células para responder a señales de estrés y resistir intervenciones quimioterapéuticas (48). Consecuentemente, la inhibición de la señalización de Nrf2, mediante el uso de digoxina, revirtió la resistencia del cáncer de páncreas resistente a la gemcitabina (GEM) (49).

El aumento de la actividad antioxidante dependiente de Nrf2 se asocia a resistencia a la quimioterapia en las células de cáncer de colon. De hecho, la inhibición de Nrf2 o Her2, solas o en combinación, aumenta significativamente la citotoxicidad y apoptosis inducida por oxaliplatino, con un efecto máximo en células SW480/Res (50). En células de cáncer de próstata, la inducción de los niveles de GSH y Myc por USP2a, una enzima desubiquitinante sobreexpresada en adenocarcinomas de próstata, conduce a la resistencia a fármacos típicamente pro-oxidantes, como cisplatino, doxorubicina y docetaxel taxano (51).

En células de cáncer de vejiga, la sobreexpresión de Nrf2 está asociada con resistencia clínicamente relevante al cisplatino (52). Y, en un estudio reciente, se observó que un aumento del estrés oxidativo, asociado a la inhibición de Nrf2 mediante tratamiento con Ailantona (un compuesto natural aislado de la *Ailanthus altissima*), inhibió el crecimiento y la migración de las células de cáncer de vejiga (53). Resultados similares se obtuvieron en

células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino (54). En esta línea, el uso de dendrímeros de carbosilano con siARN anti-Nrf2 fue capaz de superar la resistencia de las células de cáncer de vejiga al cisplatino (55).

En células de melanoma, se han identificado niveles elevados de Nrf2 y GSH como mediadores clave de la resistencia a la temozolomida (56). Un aumento del estrés oxidativo también puede revertir la resistencia a PLX4032, un inhibidor específico de BRAF (un proto-oncogén denominado homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf), en células de melanoma con mutación BRAF^{V600E} (57). En los tumores hematológicos, también se ha demostrado sobreexpresión de Nrf2 en células de leucemia mieloide aguda (58).

Por todo ello, recientemente, los estudios sobre el control del estrés oxidativo en la quimio- y radiorresistencia de diferentes tipos de tumores, y la identificación de proteínas involucradas en estos procesos como posibles blancos farmacológicos, han aumentado de forma significativa. Sin embargo, los estudios *in vivo* son aún escasos, y requerirán mayores esfuerzos en los próximos años (59). A modo de ejemplo, el cisplatino es uno de los compuestos más ampliamente utilizados para el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo los de ovario, vejiga, cabeza y cuello, y el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). A pesar de una tasa consistente de respuestas iniciales, el tratamiento con cisplatino a menudo conlleva el desarrollo de

quimiorresistencia. El efecto citotóxico del cisplatino está vinculado al daño en el ADN, al bloqueo de la división celular y la inducción de apoptosis. Todos estos eventos están acompañados de la interacción del cisplatino con nucleófilos endógenos, incluyendo el GSH, la metionina, la metalotioneína y otras proteínas ricas en cisteína, lo que induce una disminución en las reservas antioxidantes y un aumento del estrés oxidativo (60). Consecuentemente, una disminución de la citotoxicidad del cisplatino y una capacidad antioxidante elevada promueven la resistencia al fármaco (61).

El estrés oxidativo induce inestabilidad genómica, daños al ADN, mutagénesis y disfunción mitocondrial. Todo ello favorece la activación de oncogenes y/o la inhibición de la expresión de genes supresores, la inflamación crónica y la alteración de vías de señalización celular involucradas en la activación de la oncogénesis y la fisiopatología del cáncer. No resulta extraño, en consecuencia, que en muchos estudios preclínicos y clínicos se haya ensayado el uso preventivo de la terapia antioxidante, sin resultados concluyentes (62). Diferentes factores pueden ser determinantes condicionar la eficacia de la terapia antioxidante: a) la mayoría de los estudios utilizan dosis farmacológicas basadas en estudios *in vitro*; b) *in vivo*, los antioxidantes pueden estar distribuidos de manera desigual en diferentes tejidos; c) la baja biodisponibilidad y/o bioaccesibilidad a órganos específicos pueden limitar drásticamente sus efectos; d) en función de la

concentración y la presión parcial de oxígeno, pueden tener efectos prooxidantes. Además, muchos fármacos quimioterapéuticos inducen la generación de ROS por lo que, paradójicamente, un tratamiento con antioxidantes podría contrarrestar la eficacia de la quimioterapia. Por todo ello, es evidente la necesidad de mejorar la comprensión para poder aplicarla en la prevención y el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (63).

1.3. Cánceres con alta mortalidad como necesidad médica no cubierta

En el año 2020, la agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer publicó datos clínico relevantes asociados a la elevada mortalidad de diferentes tipos de cáncer (1):

1. Pulmón. A pesar de los avances en la comprensión del riesgo, el desarrollo, el control inmunológico y las opciones de tratamiento, el cáncer de pulmón, sigue siendo el que relativamente causa el mayor número de muertes por cáncer, tanto en hombres como en mujeres. El tabaquismo sigue siendo el factor de riesgo predominante, mientras que los factores de riesgo no relacionados con el tabaco incluyen exposiciones ambientales y ocupacionales, enfermedades pulmonares crónicas, infecciones pulmonares y factores relacionados con el estilo de vida. Debido a que el tabaco sigue siendo su principal factor de riesgo, la prevención de la

- enfermedad se centra en evitar este hábito. Otras medidas de prevención incluyen la elección de una dieta saludable y el mantenimiento de un estilo de vida físicamente activo (64).
2. Colon y recto. Sus factores de riesgo incluyen la existencia de antecedentes familiares, el estreñimiento crónico, la presencia de pólipos rectales, los trastornos metabólicos asociados a la diabetes y la obesidad, las enfermedades inflamatorias del intestino (Crohn y colitis ulcerativa) y la acromegalia (en este último caso, el riesgo es 5 veces mayor al de la población general). Entre los factores asociados a la dieta, hay que destacar el alto consumo de carnes rojas; el excesivo consumo de azúcares, edulcorantes y/o alcohol; el tabaco; y una alimentación pobre en ácido fólico, frutas, vegetales, calcio y fibra (65).
 3. Hígado. Los pacientes a menudo son diagnosticados con cáncer de hígado en etapas avanzadas, lo que contribuye a su mal pronóstico. De todos los casos de cáncer de hígado, más del 90% son carcinomas hepatocelulares.—Los factores de riesgo incluyen el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, la enfermedad del hígado graso, la cirrosis relacionada con el alcohol, el tabaquismo, la obesidad, la diabetes, la sobrecarga de hierro y diversas alteraciones dietéticas (66).
 4. Estómago. A pesar de una importante disminución en la incidencia y la mortalidad durante varias décadas, el cáncer de estómago sigue teniendo una incidencia elevada. Sólo en USA, en el año 2020, se contabilizaban aproximadamente 127.000

pacientes. Los factores de riesgo mejor establecidos son la infección por *Helicobacter pylori*, muy relevante en los casos de estómago distal, los antecedentes familiares y el tabaquismo. Si bien es probable que algunos factores relacionados con la dieta y la conservación de los alimentos, como el alto consumo de alimentos conservados en sal y nitritos, o el bajo consumo de frutas y verduras, aumenten el riesgo de cáncer de estómago, el impacto cuantitativo de muchos factores dietéticos sigue siendo incierto. En parte debido a las limitaciones para la evaluación la exposición y el control de los factores de riesgo (67).

5. Mama. El cáncer de mama es ya el tumor maligno más frecuente en mujeres, y la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres (68). Su incidencia está en aumento debido a una mayor capacidad diagnóstica, el envejecimiento de la población y la exposición a factores de riesgo evitables, como el sobrepeso, la obesidad, el estrés, el consumo de alcohol y el uso de terapia hormonal con fines sustitutivos, anticonceptivos o en tratamientos de fertilidad (69–71). Su tratamiento, que en el pasado se basaban predominantemente en la resección quirúrgica, está reorientándose en base a los mecanismos biológicos subyacentes (72,73).

El conocimiento generado en las últimas décadas sobre la fisiopatología del cáncer ha abierto un abanico de posibilidades para la oncoterapia. Por una parte, la identificación de moléculas

que son expresadas sólo por células tumorales ha permitido la introducción de nuevos biomarcadores específicos para mejorar, tanto el diagnóstico como la respuesta a la terapia. Por otra parte, la identificación de blancos terapéuticos potenciales ha facilitado un incremento exponencial de la investigación farmacológica (74). El desarrollo e introducción de terapias dirigidas ha logrado incrementar la efectividad antitumoral y disminuir los efectos secundarios. No obstante, es necesario seguir implementando la identificación de mejores dianas terapéuticas para abordajes todavía más específicos. En este contexto, el elevado número de mutaciones, asociadas a la progresión de los cánceres, dificulta el encontrar terapias efectivas (75,76).

Por último, los resultados generados por la investigación médica básica deben ser complementados con la investigación clínica y epidemiológica; sólo esto permitirá optimizar recursos y obtener mejores resultados para los pacientes. De cara al futuro cercano, la medicina de precisión (un enfoque emergente para el tratamiento y la prevención de enfermedades que tiene en cuenta la variabilidad individual en los genes, el medio ambiente y el estilo de vida de cada persona), apoyada por la inteligencia artificial, ofrecen un horizonte prometedor tanto para el diagnóstico como para el desarrollo de nuevos fármacos y terapias personalizadas.

1.4. El pterostilbeno en la terapia del cáncer

El pterostilbeno (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno, PT), es un polifenol natural perteneciente a la familia de los estilbenos. Es un metabolito secundario vegetal aislado originalmente del duramen del sándalo rojo (*Pterocarpus santalinus*), también se encuentra en otras plantas y bayas, como por ejemplo los arándanos (aprox. 10–15 mg/kg de peso fresco) (77,78). El estudio de Schmidlin et al. identificó una resveratrol O-metiltransferasa, que cataliza la síntesis de PT a partir de resveratrol en hojas de vid (79). Al igual que otros polifenoles naturales, el PT se encuentra involucrado en la defensa de las plantas contra diferentes condiciones estresantes o agresivas como son la radiación UV, la agresión de patógenos, la baja fertilidad del suelo, las temperaturas altas/bajas, la sequía severa o la presión del pastoreo (80,81). Según las evidencias experimentales que conocemos, el PT tiene beneficios potenciales para la salud en indicaciones muy diferentes, entre las que se incluyen: dermatosis inflamatorias, fotoprotección, prevención y terapia del cáncer, sensibilidad a la insulina, hiperglucemia y niveles elevados de lípidos en sangre, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento, memoria y cognición (82,83).

Las células cancerosas, en particular, exhiben niveles altos de estrés oxidativo, en comparación a las células normales (84). Un

aumento de los niveles de ROS a nivel intracelular tiene dos efectos potencialmente importantes:

- i) Los daños moleculares por oxidación.
- ii) La activación de vías de señalización específicas.

Ambos efectos pueden influir en numerosos procesos celulares relacionados con la progresión del cáncer. Se ha demostrado que las ROS promueven la proliferación de células cancerosas, lo que implica un rol potencial como promotoras del cáncer. La exposición de varias líneas de células cancerosas a ROS, por inducción química o por mecanismos inflamatorios, aumenta sus comportamientos migratorios e invasivos. Lo que sugiere un papel de estas especies reactivas como favorecedoras del fenotipo invasivo (85). Paralelamente, la exposición a ROS por encima de un cierto umbral conduce irreversiblemente al daño celular y, finalmente, a la muerte celular (86–89).

Por lo tanto, el resultado neto de los efectos de las ROS, a favor o en contra del cáncer, probablemente puede ser determinante para la tasa y el alcance de la progresión tumoral *in vivo*. Según este razonamiento, las tasas elevadas de generación de ROS pueden conferir una mayor susceptibilidad de las células cancerosas a un mayor estrés oxidativo inducido por los tratamientos. Sin embargo, debido a las características innatas de los cánceres en crecimiento *in vivo*, esta estrategia también podría facilitar la selección de subclones de células cancerosas altamente

resistentes a las terapias. En este escenario, una mayor generación de ROS podría contribuir a la capacidad de los cánceres para mutar, dañar los tejidos locales y promover la heterogeneidad tumoral y las metástasis (90,91). Paradójicamente, reduciendo el estrés redox en las células cancerosas, los suplementos antioxidantes naturales (y los fármacos con efectos similares) podrían disminuir la eficacia de la radioterapia y la quimioterapia.

Los polifenoles naturales pueden interferir en la carcinogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis, por sus efectos antiinflamatorios, proapoptóticos, antiangiogénicos y su capacidad de reducir la quimio y la radiorresistencia (92,93). En el caso del PT, múltiples estudios demuestran su capacidad de detener la proliferación celular, inducir apoptosis, autofagia y permeabilización de los lisosomas en células de cáncer de colon, mama, hígado, pulmón, piel (incluyendo el melanoma), páncreas, próstata, estómago, vejiga, tanto *in vitro* (94–96) como *in vivo* (97–100).

1.5. Campos electromagnéticos y *tumor treating fields*

Los campos eléctricos resultan de las diferencias de potencial, mientras que los campos magnéticos son generados por el flujo de la corriente eléctrica. Los campos electromagnéticos (EMFs) son campos eléctricos y magnéticos variables en el tiempo y se

clasifican según su frecuencia de oscilación en el espectro electromagnético.

Los EMFs se clasifican principalmente en dos categorías según su frecuencia:

a) EMFs ionizantes, a partir de 3000 THz, por encima de las frecuencias de los rayos ultravioleta C (UVC) o para longitudes de onda por debajo de 100 nm, incluyen rayos X y rayos gamma. Estos campos son capaces de dañar el ADN o las células directamente.

b) EMFs no ionizantes. Son considerados no ionizantes los EMFs con longitudes de onda mayores de 100 nm, o frecuencias por debajo de 3000 THz, donde se incluyen los campos estáticos o casi estáticos, campos eléctricos y magnéticos de líneas y aparatos eléctricos, ondas de radio, microondas, radiación infrarroja y luz visible. Estos campos electromagnéticos no son capaces de ionizar la materia arrancando electrones de los átomos y por lo tanto se considera teóricamente que no dañan el ADN o las células directamente. Los EMFs del espectro radioeléctrico son aquellos que se usan en aplicaciones de tecnologías de la información y las comunicaciones y aplicaciones industriales y su frecuencia va desde casi 0 Hz hasta 300 GHz. Según las directrices de la *Comisión Internacional sobre Protección contra la Radiación No Ionizante*, "campos electromagnéticos de radiofrecuencia" (rfEMFs) es el término utilizado para describir

la parte del espectro electromagnético que comprende el rango de frecuencia de 100 kHz a 300 GHz (101).

Es importante entender cómo se generan estos campos, sus fuentes de generación, y la forma en que estos campos eléctricos y magnéticos interactúan con las moléculas cargadas (<https://www.niehs.nih.gov>). Por ejemplo:

- a) Las líneas del campo eléctrico tienen la dirección del gradiente de potencial y no forman un bucle cerrado, mientras que las líneas del campo magnético forman círculos cerrados alrededor de las corrientes, las corrientes son fuente de circulación de campo magnético.
- b) La intensidad del campo eléctrico es proporcional a la carga que lo origina e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia en caso de tener cargas, y al gradiente del potencial a su vez generado por las cargas, mientras que el campo magnético depende de la intensidad de la corriente encerrada o en el caso de los imanes de sus equivalentes cargas magnéticas.
- c) Los campos eléctricos y magnéticos son vectores, se distribuyen en el espacio alrededor de sus fuentes, las cargas y las corrientes, tienen tres dimensiones y se sitúan en el espacio tridimensional.

El efecto fundamental de los EMFs sobre la materia es la generación de vibraciones y rotaciones de moléculas cargadas o polares, lo cual puede dar lugar a calentamiento por rozamiento

mecánico. Los “campos electromagnéticos no térmicos” son EMFs cuya intensidad es lo suficientemente baja como para que no se puedan medir variaciones apreciables de temperatura en los tejidos, o que dicha variación no se considere significativa para ejercer efectos biológicos. Algunos estudios parecen indicar la existencia de una relación positiva entre la exposición a los EMFs de muy baja frecuencia y el riesgo de sufrir cáncer que afecte al sistema nervioso(102), pero los estudios epidemiológicos no han podido demostrar la existencia de una relación causa efecto (103). Aunque no se pueda atribuir efectos carcinogénicos directos a los EMFs, pueden contribuir a la producción de ROS y generar estrés oxidativo, lo que podría teóricamente podría aumentar la expresión de oncogenes. Necesariamente, se necesitan estudios epidemiológicos a gran escala para ayudar a resolver estos problemas junto con estudios *in vitro* en profundidad (104). Existen evidencias experimentales sobre los efectos que ejercen los EMFs, tanto en células humanas como animales (principalmente murinas) (105). El concepto de que la respuesta biológica a los EMFs es una "respuesta celular al estrés" podría explicar muchos de los efectos observados de los mismos, como la dependencia no lineal de la dosis y el tiempo, su relación con el aumento o la disminución del riesgo de enfermedades neurodegenerativas, su efecto positivo sobre la regeneración nerviosa y la curación ósea. Estas respuestas biológicas podrían ser perjudiciales o beneficiosas, dependiendo de la duración y la intensidad de la exposición, así como de aspectos específicos del

organismo vivo expuesto. Un corolario del síndrome de hipersensibilidad electromagnética podría ser una respuesta inapropiada del hipocampo/sistema límbico a los EMFs, que involucra a los glucocorticoides y al eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (106).

En otro contexto, el uso de los EMFs es fundamental para el diagnóstico y, también se están aplicando en oncoterapia. Sin embargo, sus efectos también podrían ser beneficiosos, ya que podrían aprovecharse eficazmente para el tratamiento de algunos trastornos, incluido el cáncer (107). Aunque las aplicaciones potenciales de los campos electromagnéticos no térmicos en la terapia del cáncer aún no ha sido desarrollada, varios estudios parecen demostrar su posible efecto antitumoral (108). En función de su intensidad EMFs pueden inducir apoptosis y roturas de cadenas de ADN, con consiguiente efecto nocivo sobre la salud humana. La respuesta celular a los EMFs puede depender de muchos parámetros, incluyendo la osmolaridad, la frecuencia, la forma de onda, la intensidad y la duración de la exposición al campo electromagnético, las características genéticas/biológicas de las células, el estado metabólico específico o la etapa específica en el ciclo celular (109). Un efecto común de la exposición a EMFs es la potencial inducción de apoptosis, pero no de necrosis o de modificaciones en la forma celular (106,110). El desequilibrio del proceso apoptótico podría estar vinculado a alteraciones en los flujos de Ca^{2+} que, a su vez, dependen del

efecto sobre la membrana plasmática ejercido por los EMFs (111). Paralelamente, los EMFs también pueden inducir apoptosis celular causando alteraciones del patrón de expresión génica (112) o un aumento de los ROS (113). La reducción de la proliferación celular inducida por los EMFs también se ha atribuido a interferencias en los procesos de transducción de señales asociados a las corrientes tangenciales que se inducen alrededor de las células. Análisis cuantitativos de los patrones de expresión de las proteínas quinasas C (PKC) demostraron que la translocación de la PKC desde la fracción citosólica hasta la membrana no se alteró por causa de los EMFs. Sin embargo, la transducción de muchas señales moleculares extracelulares, un mecanismo clave en la regulación de la proliferación celular, sí podría alterarse por causa de la exposición a EMFs (114).

Los “*tumor treatment fields*” (TTFs) son una terapia contra el cáncer que utiliza campos eléctricos alternos de frecuencia intermedia ($\sim 100\text{-}500$ kHz) y baja intensidad ($1\text{-}3$ V/cm) para interrumpir la división celular e inhibir la proliferación (115,116). El uso de este rango de frecuencia intermedia se basa en evidencias que muestran que los campos eléctricos de baja frecuencia (<1 kHz) interrumpen progresivamente la polarización de la membrana celular, mientras que los campos de alta frecuencia (>1000 kHz) provocan daños por calentamiento asociados al movimiento de moléculas cargadas o polares (117,118). La técnica establecida para la aplicación de los TTFs

requiere la colocación de electrodos en la superficie del cuerpo, alrededor del foco de crecimiento del tumor, de modo que se puedan generar una diferencia de potencial a través del tejido en crecimiento (119). Los TTFs son unos EMFs particulares desarrollados específicamente para el tratamiento del cáncer. En los TTFs se generan campos eléctricos de frecuencias de kHz entre aplicadores de tipo capacitivo. Los efectos de estos EMFs específicos o TTFs en las células en división resultan de la alteración en multitud de macromoléculas cargadas y orgánulos responsables de la mitosis. El cambio estructural o la dislocación de estos componentes celulares pueden alterar su función fisiológica y, en última instancia, interrumpir la mitosis normal (108). Los efectos de los TTFs en varios procesos celulares pueden explicarse por dos principios físicos fundamentales: alineación dipolar y dielectroforesis. Los dipolos son moléculas o estructuras materiales en las que se produce la separación de cargas positivas y negativas. Bajo un campo eléctrico variable en el tiempo cualquier molécula cargada oscilará mecánicamente en un intento por alinearse apropiadamente de manera paralela a la dirección del vector campo eléctrico. Las macromoléculas y los orgánulos responsables de la mitosis y la citocinesis son altamente polares, y su movimiento aleatorio, crucial para su función, puede ser interrumpido por la aplicación de campos eléctricos localizados. La mitosis exitosa requiere una alineación espacial y temporal precisa de estructuras polarizables o cargadas, particularmente tubulina y septinas. En un campo eléctrico

variable, se ejerce una fuerza sobre las moléculas polares, lo que las lleva a migrar hacia una región de alta densidad de campo en un proceso llamado dielectroforesis. Los TTFs han demostrado ejercer sus efectos antimitóticos en numerosos modelos preclínicos de tumores sólidos. El efecto citotóxico máximo en cada tipo celular se logra ajustando la frecuencia de los TTFs aplicados dentro del rango entre 100 y 300 kHz, y parece estar inversamente correlacionado con el tamaño celular (119). Los TTFs interrumpen la mitosis y eliminan las células cancerosas de rápida división al aplicar campos eléctricos alternantes de baja intensidad y frecuencia LF de forma continua (durante más de 18 horas al día). La frecuencia óptima para el efecto antimitótico varía según el tipo de cáncer y puede ajustarse para lograr el máximo efecto anticancerígeno. Tanto en estudios preclínicos como en ensayos clínicos los TTFs han demostrado incrementar la eficacia de la quimioterapia y la inmunoterapia. (120,121) Las quimioterapias incluyeron inhibidores de microtúbulos, análogos de nucleósidos, antimetabolitos de folato, agentes alquilantes e inhibidores de puntos de control inmunológico, todos ellos llevando a un efecto citotóxico aditivo cuando se combinan con los TTFs (122). Por ejemplo, se ha demostrado que los taxanos actúan de manera sinérgica cuando se combinan con los TTFs (123). Consecuentemente, los TTFs representan un enfoque terapéutico innovador y no invasivo para la terapia del cáncer. Además, a diferencia de la quimioterapia sistémica, la administración de los TTFs puede aplicarse localmente,

minimizando el riesgo de efectos adversos sistémicos. Los TTFs han demostrado tener una toxicidad mínima en múltiples ensayos clínicos (124). Esto permite combinar los TTFs con otros tratamientos anticancerígenos para una mayor eficacia sin aumentar la toxicidad. Investigaciones preclínicas sugieren que los TTFs pueden actuar de manera aditiva/sinérgica con ciertos agentes citotóxicos y potenciar la muerte celular inmunogénica cuando se combinan con inhibidores de puntos clave de control inmunitario. Además, teóricamente, la terapia con TTFs también podría servir como un puente entre la quimioterapia mientras el paciente se recupera de las toxicidades relacionadas con esta. La aplicación locorregional y el perfil de baja toxicidad de los TTFs resaltan su potencial para lograr una respuesta antitumoral óptima en órganos críticos, todo ello minimizando la toxicidad limitante asociada a otras terapias regionales. Estudios en fase III en curso con los TTFs (www.clinicaltrials.gov) incluyen objetivos secundarios que evalúan los efectos locales versus sistémicos en pacientes que reciben TTFs en comparación con pacientes control. El perfil de eficacia y tolerabilidad de los TTFs en el glioblastoma ha llevado a la aprobación de la FDA para su uso tanto en enfermedad recién diagnosticada como recurrente (124). Dado que los objetivos de los TTFs no son específicos del tipo de tumor, pueden alcanzar beneficios para una variedad de otros cánceres localizados además del glioblastoma. Con este objetivo, estudios en curso están investigando los TTFs en una variedad de otros tumores, incluidos los de páncreas, ovario, el cáncer de

pulmón no microcítico, las metástasis cerebrales y el mesotelioma maligno (119).

1.6. La hipertermia en oncoterapia

La hipertermia (HT) como intervención médica en el tratamiento del cáncer es un enfoque antiguo (125). A día de hoy, la HT se ha introducido en algunos planes de estudios universitarios y se ha analizado en detalle, sobre todo por los especialistas en radiología/radioterapia y oncología general (126). A pesar de su larga historia, el uso de la HT en oncología no ha cambiado mucho desde sus inicios. Como muchas terapias en etapa inicial, carece de experiencia en tratamientos adecuados y de estadísticas integrales a largo plazo que puedan ayudar a optimizar su uso para todas las indicaciones. Estamos ante la pregunta de qué es importante para el éxito de los tratamientos de HT: ¿la temperatura o los efectos bioeléctricos, o quizás ambos? (127). La búsqueda de explicaciones de los mecanismos básicos de la HT aún es incompleta y se necesita una nueva perspectiva para lograr el éxito.

La HT se ha convertido ahora en parte de la atención estándar del cáncer en algunos países, aunque su aplicación todavía se limita a unos pocos tipos de cáncer y a unos pocos tipos de suministro de calor (www.cancer.gov). Sin embargo, en la práctica moderna faltan técnicas efectivas de calentamiento profundo. El uso de interacciones electromagnéticas ha permitido el desarrollo de

técnicas de HT local-regional (LRHT) más fiables y técnicas de HT de cuerpo entero (WBH) (103). Contrariamente a los conceptos físico-fisiológicos relativamente simples que hay detrás de la HT, su desarrollo no ha sido constante y, durante décadas, ha pasado por períodos de fracasos y renovaciones con opiniones contrapuestas sobre sus beneficios potenciales (128).

Los mecanismos exactos de la HT como sensibilizador aún no se comprenden completamente, y aún están en curso debates sobre temas como si la inhibición de la reparación del ADN se logra a temperaturas inferiores a 41°C, cual es el impacto de una mejor perfusión, o cuando es el momento más adecuado para someter a un paciente concreto a un de tratamiento de HT (129).

Los efectos inmunitarios de la HT moderada son intrigantes, especialmente cuando se consideran en paralelo a la evolución de las inmunoterapias en oncología. Los efectos inmunomoduladores de la HT están impulsando la investigación en HT hacia una modalidad más sistémica e integrada en el campo de la inmunooncología (130). Se trata de una disciplina en evolución y, es probable, que los próximos años arrojen más luz sobre la interacción entre el sistema inmunológico y las neoplasias malignas y, posteriormente, sobre los fármacos, las radiaciones ionizantes y la HT y el sistema inmunológico.

Los desafíos con la termometría continúan generando incertidumbre, y la falta de una termometría fiable en los

tratamientos genera incomodidad y cuestiona la eficiencia del tratamiento (131,132). Al considerar la HT como un campo, existe evidencia suficiente de ensayos controlados aleatorios de fase III para motivar la inclusión de la HT en los protocolos clínicos. Sin embargo, al considerar cada dispositivo y técnica por separado, el número de estudios es limitado. Esto deja al oncólogo en una posición en la que el criterio profesional y una buena comprensión del campo deben guiar la elección de la técnica, en función de los resultados, los recursos y la viabilidad deseados.

La HT se puede administrar junto con otras modalidades de tratamiento del cáncer (estrategias oncológicas multimodales). La vibración molecular aumenta a medida que aumenta la temperatura, y la HT puede dañar y destruir tanto a las células cancerosas como a las normales. En la práctica, las aplicaciones basadas en HT todavía se enfrentan a fuertes limitaciones (133). Basándonos en las directrices del *US National Cancer Institute*, la HT es un tipo de tratamiento en el que un tejido corporal (con un objetivo lo más localizado posible) se calienta hasta 45°C con el objetivo intentar dañar a las células cancerosas con poco o ningún daño al tejido normal (www.cancer.gov). Con este fin, las técnicas que se han intentado implementar incluyen sondas que generan energía con microondas, ondas de radio, láseres, ultrasonidos focalizados (HIFU, *high intensity focused ultrasounds*), calentamiento de nanopartículas mediante campos electromagnéticos, terapias fotodinámicas, perfusión de fluidos

calientes, o incluso mediante calentamiento de todo el cuerpo en una cámara termográfica o con agua caliente (www.cancer.gov). Todo estos enfoques tienen efectos secundarios potenciales y una eficacia (de momento) muy limitada (128). De hecho, aunque en oncoterapia la hipertermia ha sido introducida en algunos países, sus aplicaciones prácticas son preferentemente loco/regionales y están limitadas a pocos tipos de cáncer.

Muchos de los mecanismos implicados en los efectos de la HT no se conocen con exactitud y las hipótesis sobre su actuación todavía son sobre todo teóricas. Se ha propuesto que la HT afecta especialmente a las células que están en fase S de división, fase en la que las células cancerosas suelen ser más resistentes a las terapias convencionales (134). Dado que, en las regiones tumorales más hipóxicas, la eficacia de la radio y la quimioterapia es más limitada, la vasodilatación inducida por la HT podría contribuir a aumentar la concentración de (y la permeabilidad a) los quimioterápicos en el tumor y ejercer efectos sinérgicos con las terapias convencionales. Un aumento leve de temperatura, puede inducir la respuesta inmunitaria (135). La irradiación local combinada con HT leve (38-40°C) puede facilitar la regresión de un tumor (136). Temperaturas superiores a 43°C pueden causar la destrucción celular por necrosis (137). Sin embargo, cómo aplicar esta terapia y cómo afecta a la viabilidad celular son campos todavía por estudiar en profundidad.

La HT tiene efectos significativos sobre las proteínas, incluidos su pliegue, la exposición de grupos hidrófobos y la agregación con proteínas que no se alteran directamente por la HT. La agregación de proteínas tiene efectos en toda la célula, pero tiene un impacto particularmente significativo dentro del núcleo. Los cambios en las interacciones de las proteínas nucleares, en particular las implicadas en la replicación del ADN, bloquean la replicación y favorecen el daño al ADN, favoreciendo las roturas de doble cadena. Durante mucho tiempo se ha reconocido que el calor tiene efectos sobre la distribución de proteínas de la membrana plasmática, altera la permeabilidad de las membranas plasmáticas, lo que resulta en un pico de calcio y altera el potencial de la membrana mitocondrial, lo que resulta en un cambio en el estado redox de las células (138). Aunque la cinética de la inactivación celular por calor mediante ensayos clonogénicos ha sido bien estudiada, el mecanismo molecular de la muerte celular inducida por el calor aún no está claro. Hasta ahora sólo se pueden reconocer morfológicamente dos formas distintas de muerte celular, la apoptosis y la necrosis, inducidas por HT (139).

La exposición a HT a 42 °C durante 1 hora puede activar la esfingomielinasa ácida y generar grandes cantidades de ceramida, y los niveles elevados de ceramida pueden desplazar al colesterol de las membranas, generando áreas de membrana enriquecidas en ceramidas conocidas bajo el término 'cer-rafts'. Esta

transformación desestabiliza la estructura de la membrana celular tumoral, pierde su función original y es mucho menos tolerante a daños generados tanto desde el interior como desde el exterior de la célula. La membrana de las células tumorales tiene un mayor contenido de ácidos grasos, son más fluidas y susceptibles al calor que la membrana de las células sanas. La HT también puede activar la fosfolipasa, lo que reduciría el contenido en ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares. Por otro lado, el aumento de la fluidez de la membrana inducido por la HT favorece la formación de poros del receptor purinérgico tipo 2 y promueve la muerte celular. La interacción entre la HT y las propiedades de la membrana celular tumoral resulta en un efecto sinérgico mayor que la suma de sus partes. De hecho, hay un gran campo para futuras investigaciones sobre los efectos de la HT sobre las membranas celulares (140–142). Además, como subproducto del aumento en la actividad metabólica, el calor puede inducir un aumento de las ROS, y el estrés oxidativo asociado a daños moleculares (143).

Además, se han logrado algunos avances en la investigación relacionada con el efecto de la HT sobre el metabolismo. Al detectar niveles plasmáticos de sustancias metabólicas, como lactato y lipoproteínas, en pacientes oncológicos después de someterse a terapias de HT, es posible reflejar indirectamente los niveles metabólicos de las células tumorales *in vivo* (144). Como excelente terapia adyuvante, a temperaturas terapéuticas (39-

44°C), no solo proporciona un entorno más apropiado para la radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia, sino que también amplifica el efecto de otras terapias al interferir con el metabolismo del tumor. Cuando la temperatura es demasiado alta (>44°C), o incluso alcanza los rangos de ablación, la HT puede destruir la función metabólica de las células tumorales y el efecto letal sobre el tumor es directo. Sin embargo, esto también implica un problema clave: ¿cómo controlar la HT para que actúe con precisión sobre las células tumorales sin dañar a las células normales?

El efecto terapéutico de la hipertermia combinada con la quimioterapia ha sido confirmado en la clínica (137), especialmente la aplicación de la tecnología de perfusión intraperitoneal de calor, que abre un nuevo horizonte para la quimio-hipertermia. La quimioperfusión hipertérmica intraperitoneal (HIPEC, del inglés, “*Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy*”) es un tipo de terapia de hipertermia que se usa en combinación con cirugía en el tratamiento de cánceres abdominales avanzados. En este procedimiento, se infunden medicamentos anticancerígenos calentados y se hacen circular en la cavidad peritoneal (abdomen) durante un corto período de tiempo. Los agentes quimioterapéuticos que generalmente se infunden durante la HIPEC son mitomicina-C y cisplatino (145).

Las mitocondrias son blanco de muchos fármacos quimioterapéuticos. Desde hace tiempo se sabe que la HT puede afectar alterar la permeabilidad de la membrana plasmática (146), lo que se asocia a un aumento repentino de Ca^{2+} libre citosólico (3-5 veces) y mitocondrial. Un fenómeno asociado, fundamentalmente, a la liberación del Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico y al flujo de Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia el citoplasma. La señalización por Ca^{2+} afecta a funciones claves de las mitocondrias, como la producción de energía y la apoptosis. Cuando el Ca^{2+} intracelular aumenta se activan dependientes de inositol-1,4,5-trifosfato y del receptor de rianodina (canales de cationes de alta conductancia que liberan Ca^{2+} de las reservas intracelulares), lo cual induce la salida al citosol del Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplásmico. La activación de enzimas Ca^{2+} dependientes (por ejemplo, las calpaínas) causa daños en las membranas celulares y la activación de la muerte por apoptosis. Además, una sobrecarga de Ca^{2+} en las mitocondrias es uno de los mecanismos para inducir aumento del volumen de estos orgánulos celulares por acumulación de agua, con perturbación o ruptura de la membrana externa y, a su vez, favorecer la liberación de factores apoptóticos mitocondriales hacia el citosol (147). La activación de la apoptosis también se ve potenciada por el estrés oxidativo (148). Cómo afectar específicamente la concentración de iones Ca^{2+} libres en las células tumorales sin afectar a las células normales circundantes es un problema clave no resuelto.

Debido a los diferentes tipos de células, los cambios metabólicos en los tumores pueden ser diferentes incluso con el mismo tratamiento. Por ejemplo, la combinación de HT (43°C, 1 h) y cisplatino, en las células de adenocarcinoma ovárico OVCAR-3, puede regular a la baja la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GDH), inhibir la tasa de respiración mitocondrial y aumentar la apoptosis (149), mientras que un tratamiento similar no tuvo un efecto significativo en líneas celulares de cáncer gástrico humano (AGS) ni en líneas de cáncer de páncreas humano (T3M4) (150). Además, los cambios metabólicos inducidos por la combinación de HT y agentes quimioterapéuticos no siempre van en la dirección de la supresión del tumor. El tratamiento con HT (baño de agua a 42°C durante 15 o 30 min) y doxorrubicina induce un aumento en los niveles de ROS en las células de melanoma, que debería favorecer un aumento de la actividad apoptótica. Sin embargo, el sinergismo sólo fue observado en las células MNT-1, ya que en las células A375 la actividad apoptótica fue muy similar a la observada al aplicar los tratamientos de forma aislada (151). Por lo tanto, antes de combinar la HT con la quimioterapia, es importante profundizar en los mecanismos involucrados en la eficacia terapéutica del tratamiento y los mecanismos implicados en la adquisición de resistencia. Por lo tanto, es evidente la necesidad de integrar la experiencia clínica y los resultados experimentales al formular regímenes de tratamiento para los pacientes (152). Tanto la RT como la HT tienen ventajas y desventajas. Según

investigación clínicas, pueden utilizarse juntas para compensar las deficiencias mutuas. Cuando se combinan, ejercen su mayor impacto y función de manera sinérgica (153,154). La adición de HT a la RT representa una estrategia de tratamiento prometedora para mejorar los resultados sin aumentar las toxicidades relacionadas con el tratamiento en pacientes con cáncer de próstata. Los pacientes con mayor riesgo de recurrencia local, incluidos aquellos con enfermedad de alto o muy alto riesgo, con recurrencia local macroscópica después de la prostatectomía radical, o con tumores radio recurrentes, son probablemente los candidatos óptimos para este tratamiento combinado (154). Como hemos discutido anteriormente, el mismo principio es aplicable a la combinación de quimioterapia con HT (155). Basándose en esto, sería beneficioso desarrollar nuevas estrategias terapéutica en la práctica clínica que pudiesen beneficiarse de estas sinergias.

Recientemente, las terapias convencionales contra el cáncer, como la quimioterapia, la RT ionizante y la resección quirúrgica, han sido gradualmente complementadas, o incluso reemplazadas en algunos casos, por terapias inmunológicas avanzadas (www.cancer.gov). Es importante destacar que la combinación de RT y HT activa el sistema inmunológico (156,157). Aunque se requieren muchos más estudios, la RT y la HT pueden representar un avance importante para la inmunoterapia. Cuando el perfil de seguridad de la terapia combinada de RT y HT esté demostrado,

su potencial se expandirá considerando las tendencias actuales en oncoterapia (137).

1.7. Asociación de EMFs con técnicas no invasivas de inducción de HT

Aunque las energías electromagnéticas y térmicas pueden afectar muchas funciones celulares diferentes (ver la descripción en las secciones anteriores), su asociación ha sido poco desarrollada para el tratamiento del cáncer. Sí se ha investigado la HT utilizando nanopartículas magnéticas (nanocalentadores activados por un campo magnético externo) (127). Aunque el aumento de la temperatura de los tumores en la HT magnética intracelular es significativamente menor en comparación con la HT magnética extracelular, la HT intracelular es más citotóxica para los tumores (158). Por ello, el desarrollo de nanomediadores de calor eficientes, con un alto valor de tasa de absorción específica, es esencial para superar restricciones clave, incluidas la inespecificidad, la biodisponibilidad y la toxicidad (159). Hasta ahora, estas restricciones han impedido que la HT basada en nanopartículas llegue a la práctica clínica.

El grupo de Silva y colaboradores reportó una técnica para medir los cambios de temperatura intracelular en modelos de células cancerosas *in vitro* utilizando biomarcadores luminiscentes (160). La distribución de las nanopartículas magnéticas no es

homogénea en el tumor, ni siquiera tras su administración mediante inyección intratumoral, lo cual es un problema particularmente limitante, y más todavía, cuando las nanopartículas magnéticas son administradas por vía intravenosa. Por ello, es necesario intentar mejorar la química superficial de las nanopartículas magnéticas para lograr una distribución homogénea en el tejido tumoral. Al mismo tiempo, es necesario intentar combinaciones de nanopartículas que porten alguna molécula que pueda ser reconocida específicamente por otra en la membrana plasmática de las células de un tumor específico. Los enfoques sinérgicos que combinan la HT magnética con otras terapias, incluidas la radio y la quimioterapia, son también una opción que debe investigarse más a fondo para mejorar la perspectiva clínica del desarrollo de una terapia multimodal eficaz.

A partir de estas bases, con las limitaciones existentes y con el objetivo de evitar el uso de nanopartículas, nos planteamos investigar el efecto de los EMFs de baja intensidad en combinación con HT localizada. Con este fin nuestro enfoque experimental debería cumplir los siguientes principios:

- Se aplicará una energía magnética que no cause un incremento, *per se*, en la temperatura interna (37°C en mamíferos).
- La HT debería aplicarse focalizadamente durante periodos específicos de tiempo, lo cual puede conseguirse en la práctica

utilizando un equipo que genere ondas de energía focalizadas en el tumor, utilizando un sistema de HIFU.

1.8. Tecnología HIFU

Los HIFU (*High-Intensity Focused Ultrasound*) son una tecnología médica basada en la focalización de ultrasonidos de alta energía en un tejido, induciendo la generación de calor y la consiguiente HT, útil para destruir células cancerosas o para favorecer la regeneración tisular aumentando por ejemplo la síntesis de colágeno (161). HIFU se administra tradicionalmente mediante un transductor piezoeléctrico con una apertura y distancia focal fijas. El transductor genera un campo de ultrasonido con frecuencias que van de 1 a 7 MHz. Estas ondas sonoras luego se convierten en energía térmica y viajan por el cuerpo, convergiendo en un punto focal y siendo capaces de provocar (si la energía es alta) necrosis coagulativa.

Existen dos categorías de efectos del tratamiento sobre los tejidos: térmicos y mecánicos (162). A dosis de energía depositadas más bajas (<55°C), la HT inducida puede conducir a una mayor permeabilidad celular, facilitando mejor la entrega de nanopartículas. Esto puede ser ventajoso en conjunto con moléculas transportadoras moduladas térmicamente. A dosis de energía depositadas más altas (>55°C), se puede inducir un efecto ablativo por necrosis dependiente de la temperatura que se alcance en un punto concreto (163). Naturalmente, el uso de HT

ablativa puede tener efectos deletéreos sobre los tejidos normales anexos al tumor a tratar. Efectos muy limitantes a la hora de aplicar tratamientos eficaces con HIFU. Por ello, monitorizar la formación de lesiones durante los pulsos ablativos es de suma importancia desde el punto de vista de eficacia y seguridad. La deposición de dosis del transductor se debe ajustar activamente para controlar las fluctuaciones de temperatura, lo que permite optimizar el impacto ablativo dentro de unos límites de seguridad razonables. Para monitorizar la formación de lesiones y la temperatura del tejido en tiempo real, el método de elección es la resonancia magnética con termometría. En pacientes, se administran medicamentos ansiolíticos, analgésicos y antiespasmódicos para disminuir el movimiento durante el procedimiento y bloquear temporalmente el movimiento peristáltico digestivo (164).

La tecnología HIFU ha sido utilizada de forma regular para el tratamiento de:

- Cáncer de próstata y adenocarcinoma endometrial. Las ondas ultrasónicas de alta intensidad se enfocan con precisión en el tejido canceroso para destruir las células malignas (165)
- Rejuvenecimiento facial. HIFU se ha utilizado en procedimientos de estiramiento facial no quirúrgicos para mejorar la apariencia de la piel y reducir la flacidez. Al estimular la producción de colágeno, da como resultado una piel más firme y juvenil (166)

- HIFU también ha sido utilizado para reducir la grasa corporal localizada, aunque su eficacia puede variar según el paciente (161).

HIFU presenta la ventaja de no requerir cirugía invasiva, lo que resulta en un menor daño secundario y en tiempos de recuperación más cortos. Sin embargo, los resultados y la eficacia pueden variar según el tipo de tratamiento y el paciente (www.fusfoundation.org). No obstante, el uso de la tecnología HIFU no está exenta de efectos secundarios y/o riesgos como (167), entre los que se incluyen:

- Dolor o molestias. Durante o después del procedimiento de HIFU, es posible sentir cierto grado de dolor, molestias o sensaciones de calor en el área tratada. Efectos bastante comunes en procedimientos estéticos y suele ser temporal.
- Inflamación y hematomas. Se transfiere energía mecánica por vibración a los tejidos, y puede producirse hinchazón e inflamación en la zona tratada, especialmente en procedimientos estéticos. También es posible que se formen hematomas.
- Efectos secundarios cutáneos. En procedimientos estéticos de HIFU facial, pueden ocurrir efectos secundarios como enrojecimiento, hipersensibilidad, hormigueo o entumecimiento en la piel. Estos efectos generalmente

desaparecen en poco tiempo, pero en casos raros, pueden persistir.

- Cambios en la pigmentación de la piel. Algunas personas han manifestado cambios en la pigmentación de la piel después de un tratamiento de HIFU facial, aunque esto es poco común.
- Daño a estructuras adyacentes. En tratamientos de HIFU para el cáncer, existe un riesgo de daño a estructuras cercanas a la zona tratada, como los nervios, los vasos sanguíneos o los órganos vecinos.
- Infección. Aunque el riesgo de infección es bajo, siempre existe la posibilidad de que se desarrolle una infección en el sitio de tratamiento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Caracterizar los efectos de los EMFs y la HT, aplicados externamente, sobre el crecimiento y viabilidad de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos Específicos

- Analizar el efecto de EMFs e HT sobre la viabilidad de células tumorales.
- Determinar si EMFs e HT aumentan la generación de radicales libres de oxígeno y desencadenan señales de muerte celular mediadas por mitocondrias.
- Investigar si EMFs e HT afectan a la permeabilidad lisosomal.
- Dilucidar estrategias terapéuticas que permitan incrementar los efectos anticancerígenos de los EMFs y la HT con el objetivo de incrementar su eficacia.

3. MATERIAL y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares

Las células A2058 (melanoma), AsPC1 (adenocarcinoma pancreático) y MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo) se obtuvieron de la American type (Manassas, VA). Fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Waltham, MA), a pH 7.4, suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10% inactivado por calor (Biochrom AG, Berlín, Alemania), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células se sembraron ($20.000 \text{ células/cm}^2$) y cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Las células se extrajeron de los frascos de cultivo mediante incubación durante 5 minutos con tripsina al 0.05% p/v (Merck, Darmstadt, Alemania) en solución salina tamponada con fosfato pH 7.4 que contenía 0.3 mM de EDTA, seguida de la adición de FCS al 10% para inactivar la tripsina.

El número de células y su viabilidad fue determinada mediante un contador automático TC20 de BioRad (Hercules, CA). La integridad celular se confirmó determinando la actividad lactato deshidrogenasa en el medio extracelular. Las células se sembraron y adhirieron durante 24h antes de comenzar cualquiera de los tratamientos.

3.2. Sistema híbrido de exposición a EMF e HT *in vitro*

Los campos electromagnéticos y las magnitudes con las que se relacionan se definen en la Tabla 1:

Tabla 1. Glosario de las magnitudes relacionadas en las ecuaciones de Maxwell (168)

Símbolo	Definición	Unidades
$\vec{E}$	Intensidad de campo eléctrico	V / m
$\vec{H}$	Intensidad de campo magnético	A / m
$\vec{B}$	Densidad de flujo de campo magnético	Wb / m^2
$\vec{D}$	Densidad de flujo eléctrico	C / m^2
$\vec{J}$	Densidad de corriente eléctrica	A / m^2
$\vec{M}$	Densidad de corriente magnética	V / m^2
ρ	Densidad de carga eléctrica	C / m^3
σ	Conductividad	S/m

Los campos, cargas y corrientes están relacionados por las ecuaciones de Maxwell, las relaciones constitutivas de la materia y la ecuación de conservación de la carga:

1) Ley de Faraday:

$$\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} = -\nabla \times \vec{E} - \vec{M}$$

2) Teorema de Ampère:

$$\frac{\partial \vec{D}}{\partial t} = \nabla \times \vec{H} - \vec{J}$$

3) Teorema de Gauss:

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho$$

4) Ecuación de continuidad (conservación de la carga):

$$\nabla \cdot \vec{J} = -\frac{\partial}{\partial t}\rho$$

A su vez, las densidades de flujo e intensidades de campo para medios homogéneos, lineales e isótropos están determinadas por las relaciones constitutivas de la materia:

$$\vec{D} = \varepsilon \vec{E} = \varepsilon_o \varepsilon_r \vec{E}$$

$$\vec{B} = \mu \vec{H} = \mu_o \mu_r \vec{H}$$

Donde:

- ε_o es la permitividad del espacio libre $\left(8.854 \times 10^{-12} \frac{F}{m}\right)$, ε_r es la permitividad relativa y ε la permitividad del medio (F/m)
- μ_o es la permeabilidad del espacio libre $\left(4\pi \times 10^{-7} \frac{H}{m}\right)$, μ_r es la permeabilidad relativa y μ la permeabilidad del medio (H/m)

Además de la densidad de corriente de los generadores $\vec{J}$, se define una corriente eléctrica equivalente para considerar los mecanismos de pérdidas por conducción Óhmicas, también llamada ley de Ohm microscópica:

$$\vec{J}_e = \sigma \vec{E}$$

Combinando estas expresiones y sustituyendo en las ecuaciones 1) y 2), se deducen las ecuaciones de Maxwell del rotacional que junto a las condiciones de contorno del sistema describen la evolución espacio temporal del campo electromagnético:

$$\frac{\partial \vec{H}}{\partial t} = -\frac{1}{\mu} \nabla \times \vec{E} - \frac{\rho'}{\mu} \vec{H}$$

$$\frac{\partial \vec{E}}{\partial t} = \frac{1}{\varepsilon} \nabla \times \vec{H} - \frac{\sigma}{\varepsilon} \vec{E}$$

Estas son dos ecuaciones diferenciales vectoriales equivalentes a seis ecuaciones escalares acopladas en el sistema de coordenadas cartesianas tridimensional (x, y, z):

$$\frac{\partial H_x}{\partial t} = \frac{1}{\mu} \left(\frac{\partial E_y}{\partial z} - \frac{\partial E_z}{\partial y} - \rho' H_x \right)$$

$$\frac{\partial H_y}{\partial t} = \frac{1}{\mu} \left(\frac{\partial E_z}{\partial x} - \frac{\partial E_x}{\partial z} - \rho' H_y \right)$$

$$\frac{\partial H_z}{\partial t} = \frac{1}{\mu} \left(\frac{\partial E_x}{\partial y} - \frac{\partial E_y}{\partial x} - \rho' H_z \right)$$

$$\frac{\partial E_x}{\partial t} = \frac{1}{\varepsilon} \left(\frac{\partial H_z}{\partial y} - \frac{\partial H_y}{\partial z} - \sigma E_x \right)$$

$$\frac{\partial E_y}{\partial t} = \frac{1}{\varepsilon} \left(\frac{\partial H_x}{\partial z} - \frac{\partial H_z}{\partial x} - \sigma E_y \right)$$

$$\frac{\partial E_z}{\partial t} = \frac{1}{\varepsilon} \left(\frac{\partial H_y}{\partial x} - \frac{\partial H_x}{\partial y} - \sigma E_z \right)$$

Las expresiones anteriores describen la complejidad del tratamiento del campo electromagnético, donde se puede observar la interrelación entre las magnitudes, y principalmente que campo magnético y campo eléctrico solamente están desacoplados si no presentan variación con el tiempo. El tratamiento matemático de estas magnitudes se complica mucho más al tratar medios no lineales, no homogéneos, o anisótropos.

En nuestro caso, para el diseño de un sistema de exposición a EMFs hacemos una serie de simplificaciones. Suponemos que tratamos un medio lineal, homogéneo e isótropo, lo cual no es cierto para los tejidos biológicos, pero lo podemos suponer como primera aproximación. Despreciamos la corriente de desplazamiento respecto a la corriente de los generadores. Con ello calculamos el campo magnético de forma aproximada a cómo se calcula un campo magnetostático, desacoplado del campo eléctrico. Esta aproximación considera muy pequeña la contribución al campo magnético de la variación temporal de las *corrientes de Foucault*, generadas a su vez por la variación temporal de campo magnético.

Modelo matemático de la exposición a EMFs

Se emplean corrientes conducidas por conductores filiformes para los aplicadores de campo magnético, en algunos casos los aplicadores son dispositivos comerciales. Estos están constituidos por cables de cobre por los que circula la corriente eléctrica. En

lo sucesivo utilizaremos el término “campo magnético” para referirnos al campo **B**, o simplemente escribiremos campo **B**, como es usual en la literatura. Por otro lado, la relación entre **B** y **H** es la permeabilidad magnética **μ**, que en el caso más general es un tensor, pero asumimos que **μ**= μ₀ es una magnitud escalar y constante en los tejidos biológicos, que se asumen sin anisotropía. Los aplicadores se desarrollan con hilos de cobre. Por lo tanto, sus corrientes son aproximadas como corrientes filiformes. El vector **B** lo calculamos con la ley de Biot-Savart, aplicando el principio de superposición (169), sobre cada corriente infinitesimal:

$$\vec{B}(\vec{r}) = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int \frac{\vec{dl} \times (\vec{r} - \vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|^3}$$

Donde:

I = Corriente que circula por el elemento infinitesimal **dl**.

dl = Elemento infinitesimal de camino a lo largo del hilo.

r= (x, y, z). Punto campo: Posición donde se calcula **B**.

r'= (x', y', z'). Punto fuente: Punto donde está ubicado **dl**.

La ecuación anterior se discretiza con diferencias finitas para calcular **B** numéricamente en cada punto del espacio **r_j**= (x_j, y_j, z_j). El campo **B** se calcula mediante una técnica de diferencias finitas (169), y el principio de superposición para cada aplicador específico. Se realiza una discretización de la corriente filiforme en un número M de pequeñas corrientes, de modo que se aproxima la integral a un sumatorio de M contribuciones de

pequeñas corrientes discretas, $I d\mathbf{l} \sim I \Delta \mathbf{l}_i$, siendo $\Delta \mathbf{l}_i$ el vector desplazamiento a lo largo del hilo que porta la corriente I, en el punto $\mathbf{r}'_i = (x'_i, y'_i, z'_i)$:

$$B(r_j) = \frac{\mu_0}{4\pi} \sum_{i=1}^M \frac{I \Delta l_i \times (r_j - r'_i)}{|r_j - r'_i|^3}$$

Para comprobar la bondad del modelo matemático, este se aplica para calcular el campo magnético en un caso de solución analítica conocida. Este es el caso de los puntos del eje de un solenoide finito de longitud L, con N espiras y recorrido por una intensidad I. El procedimiento numérico converge rápidamente para discretizaciones $\Delta x = \Delta y = \Delta z \leq \text{diámetro}/20$. La figura 2 muestra los resultados obtenidos con el modelo numérico-matemático y los resultados analíticos para puntos del eje de un solenoide. En dicha figura también se muestra el caso de un solenoide infinito donde la componente z del campo $\mathbf{B}$ es $B_z = \mu_0 n I$, siendo $n = N/L$. La figura representa B_z en puntos del eje del solenoide en función de su distancia a la base, el punto $x/L=1$ se corresponde en el extremo opuesto del borde del solenoide, y el punto $x/L=2$ se corresponde con un punto del eje fuera del solenoide a una distancia 2L de la base. De la figura 2 se observa, en primer lugar, que el modelado numérico con discretización $\Delta x = \Delta y = \Delta z = \text{diámetro}/20$ da excelentes resultados con error inferior al 2%. Por otro lado, se observa como el valor del campo magnético para un solenoide finito es muy inferior al de un solenoide infinito

en puntos del eje. El procedimiento numérico por otro lado permite calcular el campo magnético promedio en la sección del solenoide, a cualquier distancia de la base, y también permite calcular el campo magnético de cualquier sistema de corrientes filiformes, con una muy buena aproximación.

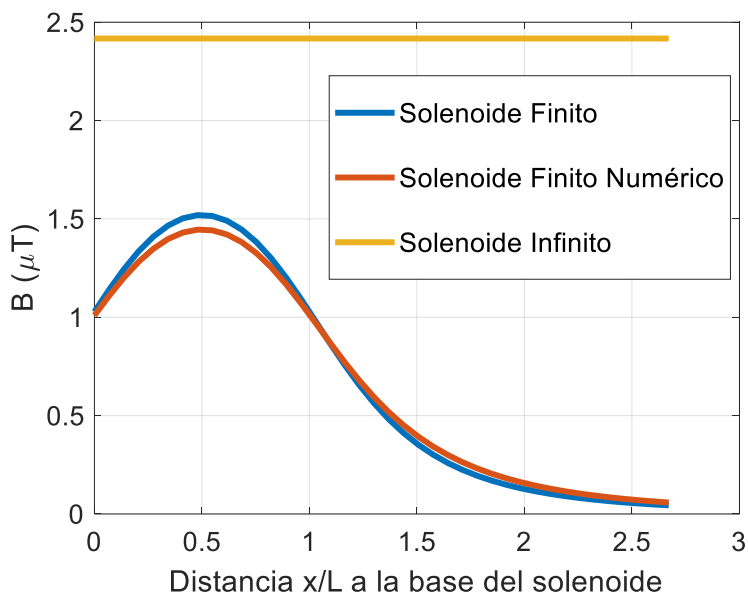


Figura 2. Campo magnético a lo largo del eje de un solenoide. Solenoide infinito calculado analíticamente, finito de longitud L calculado analíticamente, finito de longitud L calculado numéricamente.

Obviamente a efectos del montaje experimental y el desarrollo de los aplicadores, es conveniente encontrar un diseño de corrientes filiformes que maximice el campo magnético en la zona de exposición para una corriente dada. Esto es así porque los generadores comerciales disponibles tienen una limitación de

corriente en torno a los 200mA. Una posible solución es combinar dos solenoides finitos uno al lado del otro.

Para dos aplicadores solenoidales, independientes la expresión integral anterior, se discretiza y aplicando el principio de superposición se suma para obtener el **B** total:

$$B(r) = \frac{\mu_0}{4\pi} \sum_{i1=1}^{N1} \frac{I_1 \Delta l_{i1} \times (r - r'_{i1})}{|r - r'_{i1}|^3} + \frac{\mu_0}{4\pi} \sum_{i2=1}^{N2} \frac{I_2 \Delta l_{i2} \times (r - r'_{i2})}{|r - r'_{i2}|^3}$$

$\Delta l_{i1} = \Delta l_{i2} = (\Delta l_x, \Delta l_y, \Delta l_z)$. Vector desplazamiento a lo largo de los hilos 1 y 2

$r = (x_j, y_j, z_j)$. Posición del punto campo.

$r'_{i1} = (x'_{i1}, y'_{i1}, z'_{i1})$. Posición del punto fuente Δl_{i1} .

$r'_{i2} = (x'_{i2}, y'_{i2}, z'_{i2})$. Posición del punto fuente Δl_{i2} .

N_1 : Elementos discretos en aplicador 1.

N_2 : Elementos discretos en aplicador 2.

I_1 : Corriente en aplicador 1.

I_2 : Corriente en aplicador 2.

El campo **B** se calcula de ese modo en cada punto del espacio $r = (x_j, y_j, z_j)$, como una suma del campo **B** creado por cada pequeño elemento de corriente $I_1 \Delta l_{i1}$, $I_2 \Delta l_{i2}$, localizado a lo largo de los hilos de los dos solenoides en las posiciones $r'_{i1} = (x'_{i1}, y'_{i1}, z'_{i1})$, y $r'_{i2} = (x'_{i2}, y'_{i2}, z'_{i2})$.

Los niveles de campo magnético dependen de la geometría de la distribución de corrientes y la amplitud de la corriente que alimenta los aplicadores. La distribución espacial de las corrientes

determina la distribución espacial del campo, y la amplitud de la corriente modula el nivel máximo. Por lo tanto, para elegir el aplicador se debe proceder con la elección de su geometría, adaptándola al volumen y circunstancias del objeto a irradiar, para conseguir la máxima homogeneidad en los niveles de campo magnético y una irradiación uniforme en toda la geometría de la muestra. La corriente puede modularse convenientemente mediante el generador, amplificadores o mediante una sintonización L-C para disminuir el valor de la impedancia. Así se procede con la elección de los diversos aplicadores utilizados en cada caso.

Por comodidad, hemos elegido aplicadores disponibles comercialmente. Se consideró la posibilidad de usar dos pequeños solenoides en el mismo plano (figura 3).

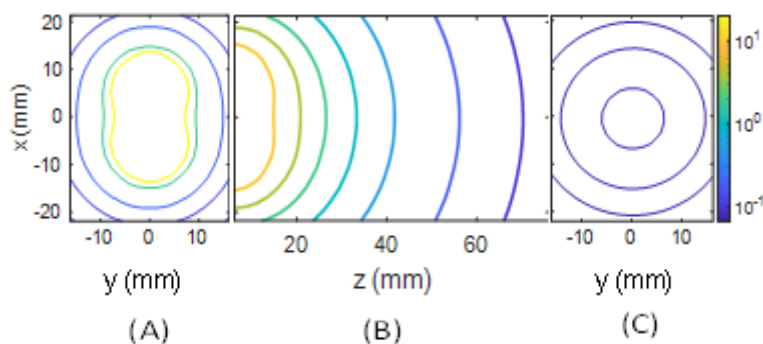


Figura 3. Distribución espacial de campo magnético de dos solenoides contiguos en un mismo plano en unidades de μT . (A) Plano x-y en el borde ($z=0$). (B) Plano z-x en eje de simetría. (C) Plano x-y- $z=60\text{mm}$

La figura 4 muestra la geometría del modelado numérico que se corresponde con el solenoide comercial. Para analizar la distribución de campo procedimos a modelizar un solenoide de 1100 vueltas de sección cuadrada.

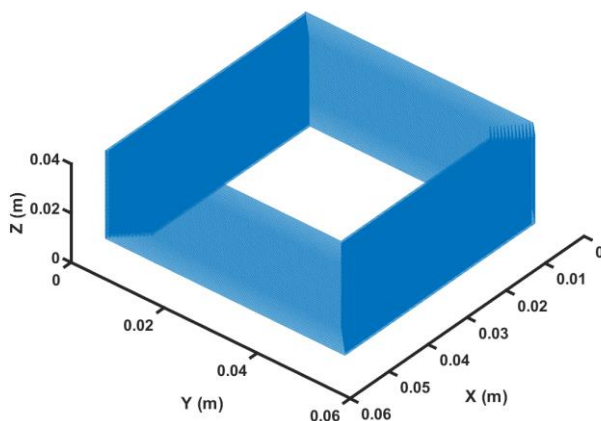


Figura 4. Modelado numérico de bobina de 1100 vueltas con espiras cuadradas.

La figura 5A muestra el campo magnético en la sección transversal de la bobina, en su borde, se observa muy homogéneo, pero decae fuertemente con la distancia. Esto último se observa en la figura 5B, que muestra el campo en una sección axial. La Figura 5C muestra el campo magnético en la sección transversal de la bobina, a 60m, y se observa poco homogéneo.

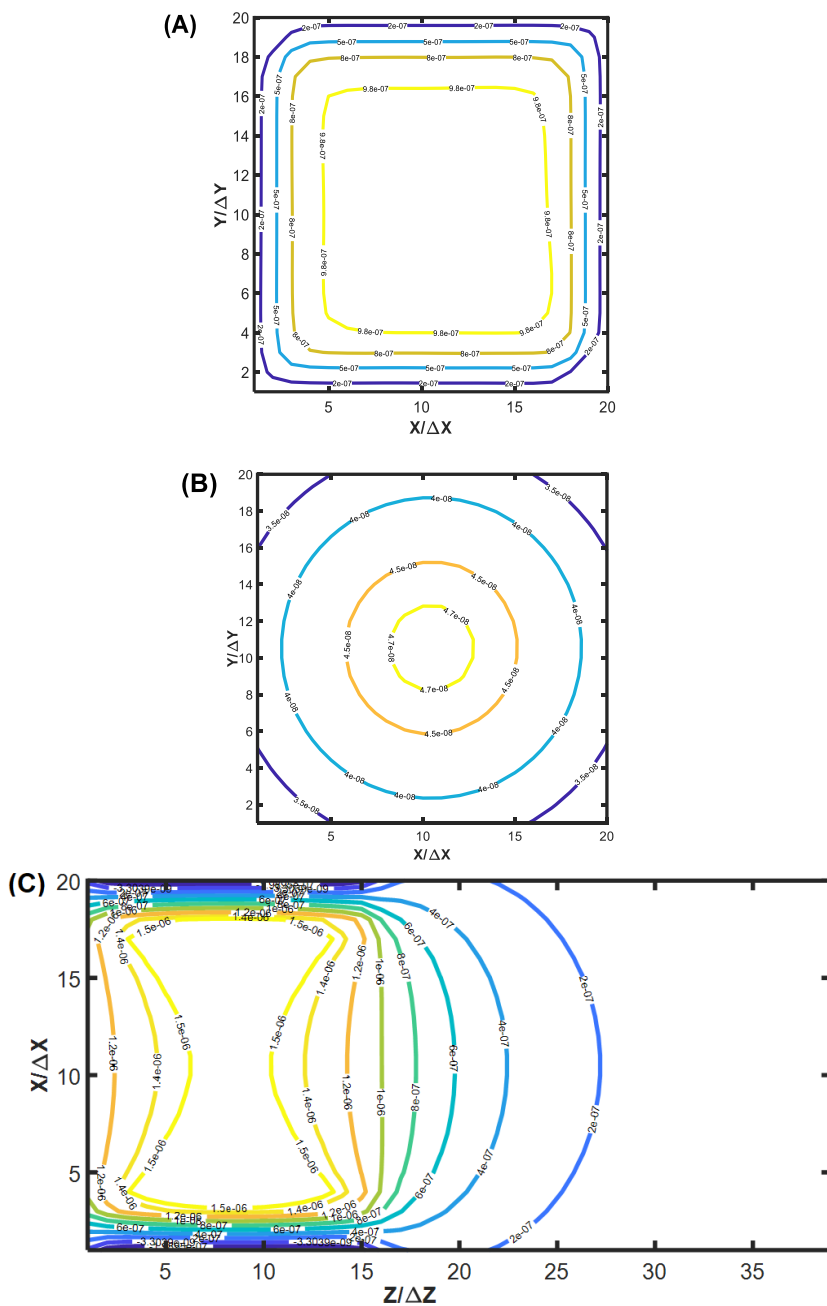


Figura 5. Niveles de campo magnético generados por una bobina de espiras cuadradas en unidades de Tesla. (A) Plano x-y en el borde de la espira ($z=0$). (B) Plano x-y plano $z=60$ mm. (C) Plano z-x en eje de simetría.

Finalmente, en la figura 6 se muestran las bobinas empleadas en las pruebas iniciales, $L = 33.80\text{mH}$.



Figura 6. Bobinas utilizadas en las pruebas preliminares.

Irradiación con EMFs *in vitro*

La corriente que alimenta los aplicadores se obtiene con un generador Promax-GFG-8216, que se ajusta para la frecuencia deseada en KHz y con una amplitud de 2V. Esta señal se puede visualizar con un osciloscopio, con el que se puede comprobar la amplitud de la señal sinusoidal y su frecuencia de oscilación. El generador se conecta con un cable coaxial de 50 Ohmios de impedancia a una bobina de hilo de cobre WE-76030811 (figura 7) del fabricante *Wurth Electronics*.



Figura 7. Aplicador WE-76030811 utilizado para el montaje *in vitro*.

Se elige este aplicador porque tiene una inductancia muy baja y una resistencia casi nula, manteniendo un nivel elevado de campo magnético a la distancia determinada. Según la información del fabricante, la bobina tiene una inductancia $L=5.8 \mu H$, y una resistencia DC de 0.01 Ohmios. La resistencia calculada por efecto piel a 100KHz, en su bobinado de cobre, es 0.014 Ohmios. La bobina consta de dos arrollamientos superpuestos, con dos hilos de cobre en paralelo que forman una espiral doble de 5 arrollamientos. La corriente que alimenta la WE-76030811 se puede calcular a partir de la señal de salida del generador y de las características de la bobina. El campo $\mathbf{B}$ se puede calcular para puntos del eje, suponiendo que está constituido por dos conjuntos de 10 espiras concéntricas de radio creciente, un conjunto sobre el otro. El diámetro exterior de la bobina es 48.85mm, y el hilo de cobre tiene un diámetro de 1.5mm.

$$B = \frac{\mu_0 I}{2} \left[\sum_{k=0}^n \frac{a_k^2}{(a_k^2 + z_1^2)^{3/2}} + \sum_{k=0}^n \frac{a_k^2}{(a_k^2 + z_2^2)^{3/2}} \right]$$

$$I = \frac{V}{\sqrt{R^2 + (L\omega - 1/C\omega)^2}}$$

Siendo:

- R: Resistencia (Ω).
- V: Voltaje del generador (V).
- $\omega=2\pi f$, siendo f la frecuencia (Hz).
- L: Inductancia de la bobina (H).
- C: Capacitancia parásita de la bobina (F).
- z1: Altura sobre la primera capa de espiras de la bobina.
- z2=z1+1.5mm. Altura sobre la primera capa de espiras de la bobina.
- n=10: Número de espiras de cada capa de la bobina.
- a_k : Radio de cada espira.

La aplicación de la expresión anterior permite calcular el campo en el eje de la bobina a 3mm de su superficie, $B=24.5\mu\text{T}$. Este se puede comparar con el modelo matemático (discretización de las corrientes se muestra en la figura 8) para comprobar la aproximación de los valores numéricos.

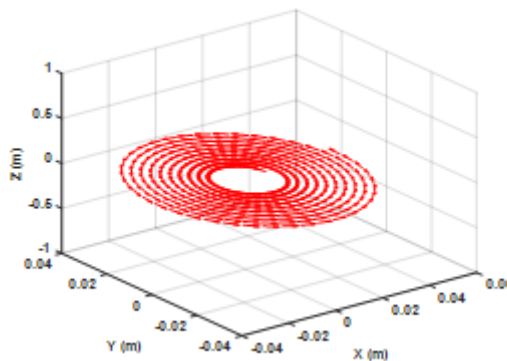


Figura 8. Modelado numérico-matemático del aplicador WE-76030811.

(B) 20 _____

Irradiación *in vivo*

La exposición a EMF *in vivo* se efectúa mediante el aplicador WE-76030811 en combinación con el calentamiento por ultrasonidos focalizados o HIFU, cuyo esquema general aparece detallado en la figura 10.

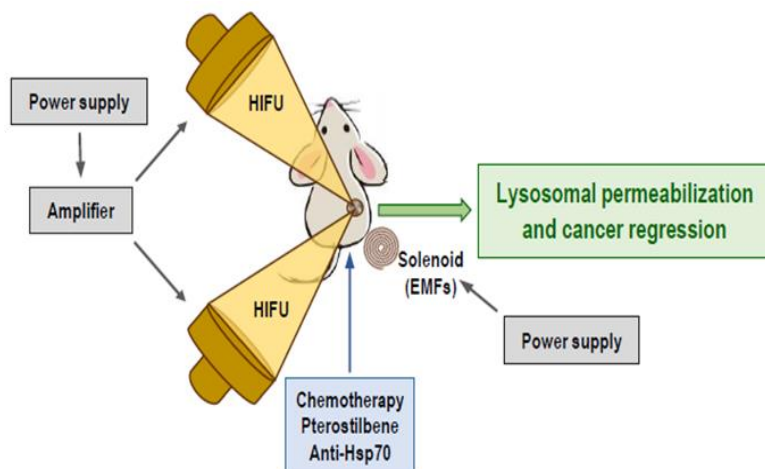


Figura 10. Representación esquemática del sistema experimental utilizado *in vivo* para tratar los xenoinjertos de cáncer de páncreas (ver la sección de resultados).

Se desarrolló un enrollamiento de cable de cobre alrededor de la jaula de los ratones para generar un nivel de exposición permanente a los EMFs en condiciones de cautividad. Esta exposición se llevó a cabo sin calentamiento. Este aplicador constituye un solenoide de espiras cuadradas de dimensiones 32 cm x 25 cm y altura 6 cm, sobre la base de la jaula (figuras 11, 12 y 13). La figura 11 muestra los niveles de campo magnético en tres secciones ortogonales de las jaulas.

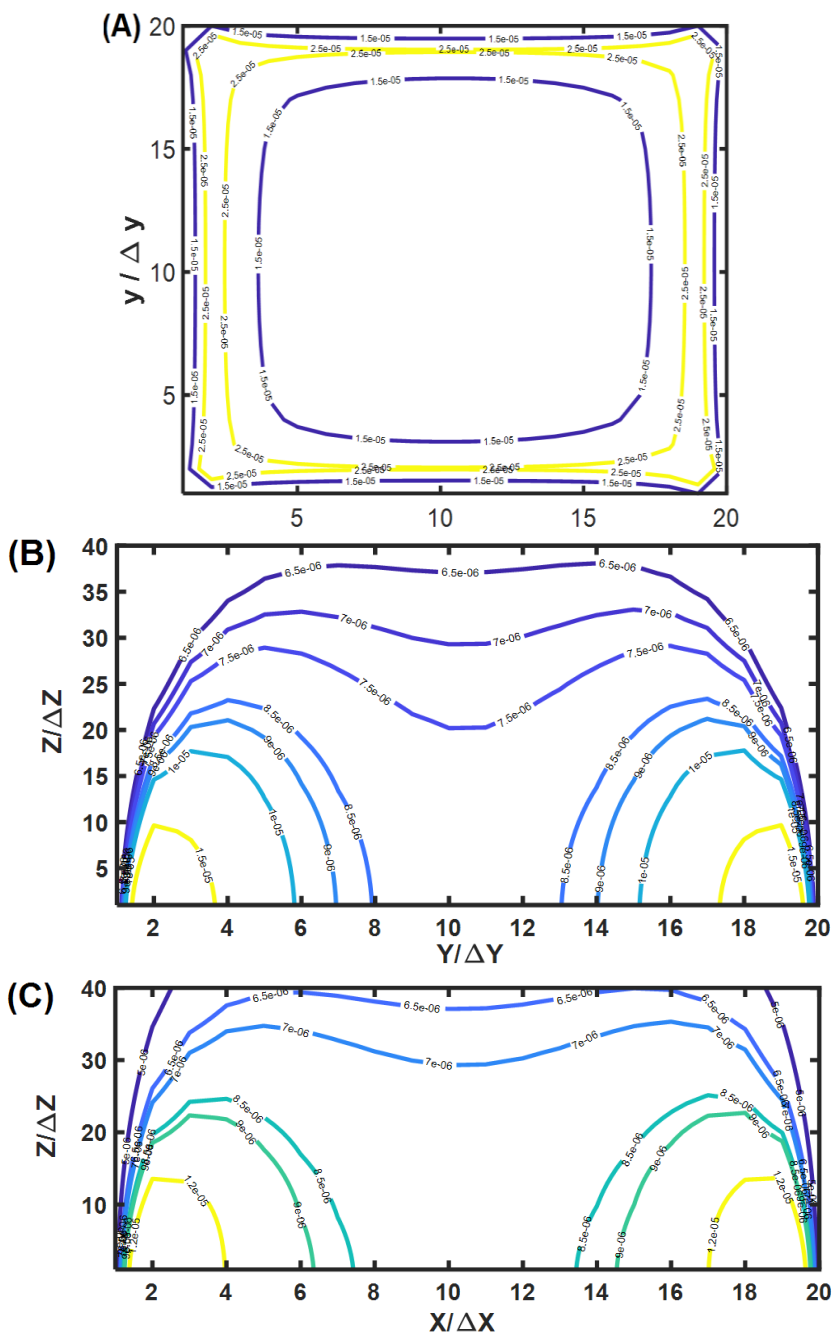




Figura 12. Montaje experimental para la exposición de dos jaulas.

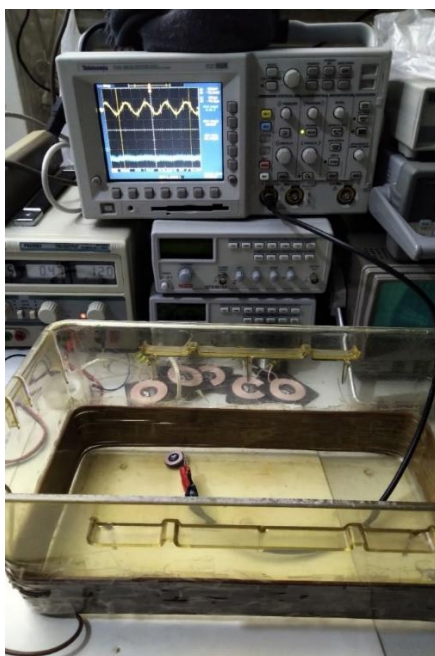


Figura 13. Medida de niveles de exposición en jaula.

Los niveles de campo magnético se analizaron con el modelo matemático para comprobar la homogeneidad y niveles en el volumen en el que los especímenes se desenvuelven. Con una corriente de 2 A se obtienen los siguientes resultados:

- B promedio en un plano horizontal en el centro del bobinado $14.4\mu\text{T}$.
- B promedio en un plano horizontal a 6cm de la base del bobinado. $5.0\mu\text{T}$.
- B promedio en el volumen que contiene el bobinado y se extiende desde su base hasta 6cm de su base $8.5\mu\text{T}$.
- Razón B promedio en volumen 6cm/B en centro espira= 1.053.

La razón entre el B promedio en el volumen de altura 6cm cubierta con el enrollamiento de cobre y el B alcanzado en el centro del enrollamiento muestra una distribución de la exposición muy homogénea, que asegura un adecuado nivel de exposición del espécimen independientemente de su posición dentro de la jaula.

3.3. Citometría de flujo y análisis de la muerte celular

El ciclo celular, la viabilidad y la muerte celular se analizaron y correlacionaron con un BD FACSVERSE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). La muerte celular se midió usando yoduro de propidio y Annexin V-FITC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Un análisis microscópico complementario diferenció entre muerte celular por apoptosis o necrosis empleando microscopía de fluorescencia (170). Para ello, las células se incubaron durante 3 minutos con Hoescht 33342 (10 mM; el cual tiñe todos los núcleos celulares) y yoduro de propidio (10 mM; el cual tiñe los núcleos de células con la membrana plasmática dañada), y se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Diaphot 300 (Nikon, Tokio, Japón) con excitación a 360 nm. Los núcleos de células viables, necróticas y apoptóticas fueron detectados por morfología: redonda y azules, redondos y rosados y azules o rosados fragmentados, respectivamente. Se contaron aproximadamente 1500 células en cada condición experimental. Las roturas de la cadena de ADN en las células apoptóticas se analizaron mediante el uso de un ensayo directo de TUNEL (Merck) y microscopía de fluorescencia siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

3.4. Citocromo C, AIF y proteínas de shock térmico

Para la determinación del citocromo C (Cyt C), el factor inductor de la apoptosis (AIF) y las proteínas de shock térmico, las células tumorales fueron lavadas 2 veces con medio salino tamponado con fosfato y el sedimento obtenido se disolvió en tampón de homogeneización enfriado previamente con hielo seco (2×10^6 células por ml de tampón: 20 mM HEPES pH 7.5, 250 mM sacarosa, 1mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA,

1mM ditioneitol, 0.1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 10 mg leupeptina, aprotinina y pepstatina A/ml). Las células se homogeneizaron con un homogeneizador Dounce. Tras una centrifugación a 2500 x g durante 5 minutos (4°C), los sobrenadantes se centrifugaron nuevamente a 100000 x g durante 30 minutos (4°C). El sobrenadante obtenido se utilizó como fracción citosólica soluble (SCF). Las proteínas se cuantificaron (171), separándolas por SDS-PAGE, transfiriéndolas a membranas de nitrocelulosa incubándolas con anticuerpos monoclonales anti-Cyt C (ab110325, Abcam, Cambridge, UK), anti-AIF (sc-55519, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-proteína de choque térmico (Hsp) 70 (ab194360, Abcam) y anti-Hsp110 (ab108625, Abcam). Los *blots* se revelaron usando un anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa de rábano picante y quimioluminiscencia implementada (sistema ECL; GE HealthCare Life Science, Malborough, MA). Las bandas de proteínas se cuantificaron empleando un sistema de análisis de imágenes de Bio-Rad Gel Doc Go.

3.5. Potencial de membrana mitocondrial

La determinación cuantitativa del potencial de membrana mitocondrial (MMP) fue realizada mediante la captación del catión lipofílico metiltrifenilfosfonio marcado (TPMP), el cual permite determinar pequeños cambios en el potencial (172). Las células cancerosas (2×10^6) fueron incubadas a 37°C durante 60

minutos en 1 ml DMEM, suplementado como se menciona anteriormente, pero añadiendo 1mM de TPMP, 250 nCi [³H]TPMP (Amersham, Bucks, UK) y 1 mM de tetrafenilboro sódico. Tras la incubación, las células fueron precipitadas por centrifugación (1000 x g durante 5 minutos), se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue re-suspendido en 1 ml de Triton X-100 al 10% y la radioactividad (desintegración/minutos) se midió usando un Tri-Carb líquido Scintillation Counter de Perkin-Elmer (Waltham, MA). El exceso de TPMP no específico, se corrigió tal y como se describe en la metodología original (172). El consumo de TPMP, dependiente de energía, fue expresado como una relación de acumulación [(TPMP/mg proteína) / (TPMP/ml de sobrenadante)] (173).

3.6. Consumo de oxígeno

La concentración de O₂ y su consumo en células cancerosas aisladas fueron determinados utilizando un oxígrafo de OROBOROS Instruments (Innsbruck, Austria), y siguiendo la metodología descrita previamente (174). Es un oxígrafo de alta resolución que permite medir, con elevada resolución y sensibilidad, el consumo de O₂ en células intactas y permeabilizadas, tejidos o mitocondrias aisladas ubicados en cámaras estancas. El dispositivo utilizado está equipado con dos cámaras y utiliza sensores polarográficos para medir la concentración de O₂ y calcular el consumo de O₂ dentro de cada

cámara. Las tasas de consumo de O_2 se calculan utilizando el software del equipo y se expresan como picomoles por segundo por número de células.

3.7. Determinación de H_2O_2

Para la determinación de los niveles de H_2O_2 (174) las células se cultivaron en presencia de 10 μM de ácido homovalínico y 1U de peroxidasa de rábano en DMEM, sin rojo fenol y durante 1h. Transcurrido ese tiempo se determinó la presencia de 2,2-dihidroxifenil-5,5-diacético utilizando una longitud de onda (λ) de excitación de 312 nm y una λ de emisión de 420 nm. La relación entre la fluorescencia y la cantidad de H_2O_2 fue lineal en el rango de 0,1-12 nmol para 2 ml de cultivo.

3.8. Determinación del radical superóxido

Para la determinación del radical $O_2^{\cdot -}$ se utilizó el *Superoxide anion assay kit* de Sigma-Aldrich. Las células fueron incubadas y activadas con interferón- γ y después estimuladas para producir $O_2^{\cdot -}$ utilizando una disolución de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA).

Se cultivaron 10^7 células en medio RPMI-1640 suplementado con 10% FCS, y se añadieron 10 unidades/ml de interferón- γ . Tras ello, las células se dejaron crecer durante 4 días, se recogieron y se centrifugaron a 3000 x g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en medio de cultivo

y se tomaron alícuotas para incubarlas con las disoluciones del kit, tampón de luminol, disolución potenciadora, disolución de trabajo (PMA) y disolución de SOD. La producción de $O_2^{\cdot -}$ se determinó mediante intensidad de luminiscencia dado que, en presencia de SOD, el anión $O_2^{\cdot -}$ producido es inmediatamente convertido en H_2O_2 . En un volumen de reacción de 30 ml, cada unidad de SOD inhibe la reducción del citocromo C un 50% en un sistema acoplado a xantina oxidasa (a pH 7,8 y a 25 °C).

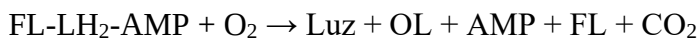
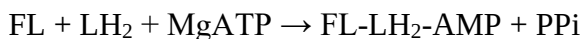
3.9. Compartimentación de las células cancerígenas

Los compartimentos citosólicos (cit) y mitocondrial (mt) fueron separados con rapidez tal y como se describió anteriormente (175), utilizando digitonina y centrifugación a través de una capa de aceite de silicona. Con la finalidad de separar los compartimentos intracelular y extracelular, utilizamos una variante de la técnica descrita por Zuurendonk y Tager (1974) para hepatocitos aislados de rata. En un tubo eppendorf se añadió una solución de $HClO_4$ (2%) y glicerol (50%). Sobre esta solución ácida se añadió una capa de aceite de silicona AR 200 (Serva, Heidelberg, Germany)/SF 96:100 (Klöckner, Duisburg, Germany), 6:1, V/V. Sobre esta capa se colocaron las muestras de las suspensiones celulares e inmediatamente se sometieron a centrifugación rápida (3500 r.p.m. en centrifuga eppendorf) durante 30 segundos. Tras la centrifugación el precipitado

corresponde al compartimento celular y el sobrenadante el extracelular.

3.10. ATP

Los niveles de ATP fueron medidos fluorimétricamente siguiendo una metodología enzimática estandarizada. El ATP participa en la oxidación de la D-luciferina por la enzima luciferasa, esta reacción genera luz, por lo que la cantidad de luz producida es proporcional a la cantidad de luciferina oxidada y al ATP consumido (176). Con la emisión de luz amarillo-verde ($\lambda_{max}=562\text{nm}$). La reacción ocurre en dos pasos:



Donde, FL = luciferasa de luciérnaga, LH₂ = luciferina y OL = luciferina oxidada.

3.11. Valoración de GSH

El glutatión reducido (GSH) fue determinado por LC/MS siguiendo una metodología previamente descrita (177). Para el procesamiento de las muestras se utilizó N-etilmaleimida para prevenir la auto oxidación del GSH (177). Se utilizó un sistema Shimadzu (Columbia, MD, USA) Prominence UFLC acoplado a un sistema de espectrómetro de masas tandem 4000 Q TRAP (AB SCIEX, Concord, ON, Canadá). Los analitos se separaron mediante HPLC utilizando una columna HydroRP (4 μm , 250 $\times$

2 mm) adquirida de Phenomenex (Torrance, CA, USA) con una fase móvil entregada a una tasa de flujo binaria de 0.3 mL/min utilizando el siguiente programa de gradiente: 100% de fase móvil A (0.01% de ácido fórmico en agua ultrapura) durante 0.5 minutos, seguido de un gradiente lineal de 0-60% B desde 0.5 hasta 6.0 minutos, luego manteniendo 60% B desde 6.0 hasta 7.0 minutos, y, finalmente, volviendo a 100% A desde 7.0 hasta 7.5 minutos, seguido de una re-equilibración de 4.5 minutos con 100% A antes de la siguiente inyección. La temperatura del horno de la columna se fijó a 40 °C, y se inyectaron 20 µL.

3.12. Actividad caspasa-3

Esta actividad se determinó utilizando un sustrato colorimétrico, la N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilina (Ac-DEVD-p-NA), siguiendo las indicaciones del fabricante (CalBiochem, La Jolla, CA). Las células cancerosas fueron lisadas en tampón de lisis [15 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.1% (v/v) CHAPS, 1mM ditioneitol y 0.1 mM EDTA] durante 10 minutos a 4°C, después las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Volúmenes iguales de sobrenadantes fueron añadidos a volúmenes iguales de tampón de ensayo [50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.1% (v/v) CHAPS, 10 mM ditioneitol, 0.1 mM EDTA y glicerol al 10%] y las muestras se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Después, una preparación en fresco de Ac-DEVD-p-NA (200 µM) fue añadida a la mezcla y la A405 fue

monitorizada cada 20 minutos, durante 3 horas, a temperatura ambiente. Los cultivos celulares sin lisar fueron utilizados como control. La actividad enzimática se calculó en pmol/min/nº de células. A tal efecto se siguió la metodología recomendada por el fabricante:

1. Correlacionar las unidades arbitrarias de fluorescencia (AFU) versus el tiempo para cada muestra.
2. Para cada muestra, determinar la duración del periodo inicial durante el cual la gráfica de absorbancia (AFU) versus tiempo se mantiene lineal, y hay un cambio suficiente en la absorbancia para obtener una pendiente estable. La concentración inicial del sustrato (200 μ M DEVD-pNA) es suficiente para saturar el ensayo. De esta forma la tasa de escisión de DEVD-pNA se mantendrá constante durante al menos 2 horas.
3. Obtener la pendiente de la línea, ajustada a la porción lineal de los datos, utilizando un programa de regresión lineal adecuado.
4. Promediar las pendientes de las muestras replicadas. ANÁLISIS DE DATOS (en términos de conversión del sustrato).
5. Si el blanco tiene una pendiente significativa, restar este valor de todas las muestras. En condiciones normales esto no será necesario ya que la pendiente será casi cero.
6. Cálculos de Actividad Específica: Para normalizar las actividades con respecto al número de células, dividir los

valores calculados por el número de células suspendidas en 10 μ l de tampón de lisis. Actividad Específica (pmol/min/número de células).

La Z-DEVD-FMK (Z-Asp-Glu-Val-Asp-fluorometilcetona; CalBiochem) fue disuelta en DMSO a una concentración final en las muestras de 0.2% y utilizada como un inhibidor irreversible de caspasa 3.

3.13. Integridad de la membrana lisosomal

Para su estudio se usó LysoTrackerTM Deep Red (Thermo Fisher Scientific), un colorante fluorescente de color rojo intenso que marca orgánulos ácidos en células vivas. La microscopia de fluorescencia se realizó a 577/590 nm (excitación/emisión). Las sondas LysoTrackerTM consisten en un fluoróforo vinculado a una base débil que está solo parcialmente protonada con pH neutro. Esto permite que las sondas LysoTrackerTM penetren sin problema por las membranas celulares para poder marcar células vivas. Las sondas LysoTrackerTM son altamente selectivas para orgánulos acídicos. Todo el procedimiento siguió las recomendaciones del fabricante.

3.14. Actividad de las catepsinas

Las células se sembraron en frascos de cultivo T25 y, 24h después, fueron tratadas como se indica en la sección de resultados. Tras la eliminación del medio, se añadió el tampón de extracción con diferentes concentraciones de digitonina (Merck)

al objeto de separar las catepsinas citosólicas de las totales. La concentración de digitonina fue optimizada para cada tipo celular. Las células fueron incubadas en una plataforma oscilante con tampón de lisis (CelLyticTM MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent) que contenía una proteasa y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (Merck) durante 15 minutos a 4°C. Cisteína (Cys) y aspartato (Asp) fueron medidas usando sustratos fluorescentes zFR-AFC (AFC = 7-Amino-4-trifluorometilcumarina) (excitación a 405 nm; emisión a 510 nm) y MCA-GKPILFFRLK (Dnp)-DR-NH₂ (excitación a 320nm; emisión a 420nm) (Enzo Bichem, New York). Las pepstatinas A (5 mg/ml) y la leupeptina (50 mg/ml) se utilizaron para inhibir las aspartil peptidasas y las serin-cisteín proteasas, respectivamente.

3.15. Silenciamiento génico

Se obtuvo y se transfectó ARN de horquilla corta (shRNA) específico de Hsp70 humana siguiendo la metodología descrita por Zhu et al. para células de carcinoma hepatocelular HepG2 (178). Los shRNA humanos específicos de HSP70 se diseñaron como 64 mers que contenían una horquilla en bucle flanqueada por siRNA de HSP70, y se clonaron en el vector pSUPER-puro (OligoEngine, Seattle, WA) que utiliza el promotor de ARN polimerasa H1 y es selectivo para el gen resistente a la puromicina. Los oligodesoxirribonucleótidos bicatenarios consistían en 19 nucleótidos derivados del gen HSP70 (número

de acceso de Genbank NM_005345). Las secuencias diana de HSP70 se consultaron con el NCBI para confirmar la falta de homología con otros genes conocidos. Los oligonucleótidos se hibridaron en un tampón que contenía acetato de potasio 100 mM, HEPES*KOH 30 mM (pH 7.4) y magnesio 2 mM a 95 °C durante 10 min, y luego a 75 °C durante 4 min. Finalmente se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente. Los ADN hibridados se ligaron a los sitios Bgl II y Sal I del plásmido pSUPER-puro para crear los nuevos plásmidos recombinantes.

3.16. Xenoinjertos tumorales

Las células AsPC1, cultivadas y recolectadas como se explicó anteriormente, se lavaron y resuspendieron en DMEM y se inocularon por vía subcutánea en la parte lateral del cuerpo de los ratones experimentales (5×10^6 células/ratón nu-nu, hembra, 12 semanas de edad, Charles River Laboratories, Wilmigton, MA). Los ratones fueron alimentados con una dieta estándar (Letica, Rochester Hills, MI). El crecimiento tumoral se midió cada 2 días usando un pie de rey. El volumen del tumor se calculó en mm^3 con la siguiente fórmula, $\text{volumen} = 0.5a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto, respectivamente. La presencia de actividad biológica en las células cancerosas se evaluó mediante inyección (i.p.) de IVIS brite D-luciferin Potassium 150 mg/Kg. Perkin-Elmer, Waltham, MA) y detección de la bioluminiscencia empleando un sistema *IVIS Spectrum In vivo Imaging System*

(Perkin-Elmer). A tal efecto, las células de carcinoma de páncreas utilizadas fueron las AsPC1-Luc (transfectadas con el gen de la luciferasa; ver apartado 3.19.)

3.17. Tratamiento *in vivo* con radiaciones no ionizantes

Nuestra configuración experimental se basó en una técnica descrita previamente por Park et al. (179). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano, colocados y fijados sobre una plataforma de metacrilato, y su cuerpo sumergido (hasta el cuello) en un baño de agua desgasificada (24 L, 40 x 30 x 20 cm) y termostatzado a 37 °C. Se colocó un solenoide (similar al que se usó *in vitro*, ver arriba) cerca del tumor para garantizar que recibiera aprox. 25 μ T. El HIFU estaba compuesto por dos elementos piezoeléctricos esféricos con una frecuencia de resonancia de 1,0 MHz, 500 W de potencia acústica (rms) y un diámetro de 60 mm (Scientia BioTech, Valencia, España). Los elementos piezoeléctricos se colocaron para emitir 2 haces ultrasónicos que impactaban en el tumor, uno vertical al tumor y otro perpendicular al anterior (ver figura 10). Este sistema fue diseñado de tal manera que la energía disipada era lo menos dañina posible para los tejidos no cancerosos. En el centro de uno de los elementos piezoeléctricos, se utilizó una sonda ecográfica como guía para monitorizar la imagen del tumor. Este sistema permite la reconstrucción de tejidos en 3D para la planificación del tratamiento y la obtención de imágenes en 2D para el

seguimiento durante el tratamiento. El sistema se ajustó de modo que los dos rayos ultrasónicos emitidos por los elementos piezoeléctricos incidieran aproximadamente en el centro del tumor. Durante el tratamiento con radiaciones no ionizantes no se observó ningún movimiento perceptible en la imagen monitorizada en tiempo real del tumor. Los ratones se trataron una vez al día durante tres días consecutivos. En cada sesión, los ratones fueron sometidos durante 40 min al efecto combinado de EMFs e HT inducido por HIFU. La energía total generada por los dos transductores HIFU en el tumor fue la correspondiente a una potencia de aprox. $60\text{W}/\text{cm}^2$. Para asegurarnos de que, en nuestras condiciones experimentales, se alcanzaba una temperatura de aproximadamente 52°C dentro del tumor, en experimentos de control anteriores se insertó un termopar (conectividad TE, Schaffhausen, Suiza) en diferentes tumores AsPC1 *in vivo*. Posteriormente, los tumores se sometieron a radiación HIFU para asegurarse de qué potencia era necesaria para alcanzar la temperatura requerida. El objetivo de este protocolo era maximizar el efecto anticancerígeno, pero teniendo en cuenta las limitaciones del modelo *in vivo*. Antes de cada sesión en el baño, los ratones fueron pretratados x 12 h con EMFs en sus jaulas. Estas jaulas estaban rodeadas por un bobinado de cobre (figura 13) que permitía que los ratones portadores de tumores recibieran una exposición constante y uniforme.

3.18. Tratamiento *in vivo* con gemcitabina y PT

El objetivo de este procedimiento era tratar de maximizar el efecto de los EMFs en el tumor en crecimiento. Los ratones fueron tratados con GEM (50 mg/kg) disuelta en suero salino fisiológico (25 mg de GEM/mL), que fue administrada por vía intraperitoneal, 1 hora antes de sesión de tratamiento con HT. Para 50 mg GEM/kg y 25g de peso del ratón, hay que administrar 1,25 mg de GEM (50 μ L de la solución anterior).

El PT fue administrado en la vena del rabo del ratón, disuelto en etanol (20 mg en 0,2 ml DMSO). Para 100 mg PT/kg y 25g de peso del ratón, hay que administrar 2,5 mg de PT disueltos en 25 μ L de la solución anterior.

3.19. Técnica de detección de células cancerosas *in vivo*

La detección de células cancerosas activas *in vivo* fue llevada a cabo mediante la reacción luciferina-luciferasa. Las células (AsPC1/Luciferase stable cell line, FenicsBIO, Halethorpe, MD, USA) cultivadas y recolectadas como anteriormente se explicó, se lavaron y resuspendieron en DMEM y fueron inoculadas por vía subcutánea en la parte lateral del cuerpo (5 x 10⁶ células/por cada ratón, hembra de 12 semanas de edad, Charles River Laboratories). Los ratones fueron alimentados con una dieta estándar (Letica, Rochester Hills, MI, USA). El crecimiento del tumor se midió cada 2 días usando calibradores. El volumen del tumor se calculó en mm³ según la siguiente fórmula:

Volumen= $0,5^a \times b^2$, donde a y b son los diámetros largo y corto respectivamente. La detección de bioluminiscencia de la actividad de las células cancerosas se realizó inyectando (i.p.) IVIS brite D-luciferina potásica (150 mg/kg), Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) en las células estables. La bioluminiscencia se detectó utilizando un sistema *IVIS Spectrum In Vivo Imaging* (Perkin-Elmer).

3.20. Evaluación de los efectos tóxicos del tratamiento

De acuerdo con la metodología standard del NIH USA para animales de experimentación (180), evaluamos el peso de los ratones, realizamos un hemograma completo y una bioquímica clínica estándar, para detectar posibles efectos tóxicos asociados a la aplicación del tratamiento combinado (EMFs, HT y GEM) *in vivo*. En lo referente al peso, o al aspecto físico, no fueron detectadas diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio tratados.

3.21. Declaración de ética experimental

Todos los experimentos con animales de experimentación fueron realizados en conformidad con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo, y con la legislación española (Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero) que traspone la directiva europea al ordenamiento jurídico español. Además, los protocolos fueron

aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universitat de València (referencia nº A1454405530866).

3.22. Análisis estadístico

Los datos se presentan como valores medios +/- desviación estándar (SD) para los experimentos llevados a cabo en las mismas condiciones. Los datos se estudiaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías (SPSS Statistics 29 para Windows; SPSS Inc, Chicago, IL). La homogeneidad de la varianza fue analizada mediante el *test de Levene*. La hipótesis nula fue aceptada para todos los valores de los tests en los que el valor de F fue no significativo para una $p > 0.05$. A los datos con un valor de F significativo ($p < 0.05$), se aplicó el *test de Tukey*. Una prueba ANOVA indica si los resultados son significativos en general, pero no indica exactamente dónde se encuentran esas diferencias. Una vez realizada una prueba ANOVA y encontrados resultados significativos, el test de Tukey permite averiguar qué medias de grupos específicos (comparadas entre sí) son diferentes. Cuando se hacen comparaciones múltiples es importante considerar la tasa de error por grupo. Para contrarrestar esta posible tasa de error, el método de Tukey ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza simultáneo resultante sea igual al valor especificado.

4. RESULTADOS

4.1. Efectos antitumorales de los EMFs y la HT

A partir de los antecedentes mencionados en la introducción del presente trabajo, nuestra primera estrategia experimental fue utilizar un rango de EMFs (100-500 KHz) que no aumenta, *per se*, la temperatura (se mantuvo estable en torno a los 37°C). Por otro lado, el protocolo para generar HT, en condiciones *in vitro*, fue diseñado pensando en la potencial aplicación a estudios *in vivo*. Un posible abordaje *in vivo*, que permita un aumento de la temperatura del tumor debería tener las siguientes características: a) rápido y específicamente focalizado en el tumor, y b) en una escala de temperatura que induzca un daño limitado en los tejidos circundantes al tumor. Pensando sobre todo en esto último, se expusieron las células tumorales a un rango de temperatura desde 37°C a un máximo de 52°C. Dicho rango de temperatura es fácil de lograr a través de diferentes metodologías y, si se concentran de forma eficaz solamente en el tumor, deberían causar efectos adversos limitados en los tejidos peritumorales circundantes. A partir de este razonamiento, se inocularon, subcutáneamente, células de carcinoma de páncreas humano AsPC1 en ratones *nude* inmunodeficientes (n=5) (181). Tras dos semanas de inoculación, el volumen tumoral alcanzó unos 75-100 mm³ y, al calentarse *in vivo* durante 20 o 40 minutos con un dispositivo HIFU experimental portador de un solo transductor (Holosonic S.L., Valencia, España), se observó que:

- a) La temperatura interna del animal (controlada con una sonda térmica colocada en el recto) se mantuvo por debajo de los 38°C.
- b) La temperatura tumoral (controlada con una sonda térmica colocada en la piel peritumoral) se incrementó hasta 52°C en menos de 1 minuto.

La disposición espacial del haz de energía generada por el HIFU fue Gaussiana proporcionando suficiente precisión al calentar el tumor, de forma que sólo en la piel circundante al tumor se observó inflamación (grado 2 tras 20 minutos, y grado 3 a los 40 minutos de tratamiento). La inflamación fue valorada en una escala de 0 a 4, definiendo cada número de la forma siguiente:

- 0 = Signos de inflamación ausentes
- 1 = Aparente aumento de neutrófilos polimorfonucleares en vasos sanguíneos y migración al tejido adyacente
- 2 = Inflamación más difusa, pero relativamente escasa
- 3 = Inflamación intermedia entre 2 y 4
- 4 = Máxima densidad de neutrófilos polimorfonucleares

Una vez que cesó la energía del HIFU, la temperatura del tumor retornó a 37°C en menos de 2 min, una disminución de la temperatura favorecida evidentemente por los conocidos mecanismos fisiológicos de pérdida de calor. Este experimento preliminar *in vivo* confirmó que la HT focalizada (incluso tan

elevada como a 52°C) es factible y tiene efectos secundarios limitados.

Habiendo confirmado la viabilidad del tratamiento en un modelo *in vivo*, se procedió a evaluar el efecto antitumoral de los EMFs y la HT en cultivos de células de melanoma (A2058), carcinoma de páncreas AsPC1, y carcinoma de mama triple negativo (MDA-MB-231). En la figura 14A se observa que, *in vitro*, los EMFs (100-200 kHz x 4h) afectan levemente a la viabilidad de las tres líneas de células tumorales estudiadas. La HT, hasta 52°C durante 40 min, provocó una disminución significativa (aunque sorprendentemente limitada) de dicha viabilidad (aproximadamente hasta el 72% en A2058, 77% en AsPC1, y el 46% en las células MDA-MB-231 de los valores control) (figura 14B). Sin embargo, en la figura 14C se observa que la combinación de las dos energías, EMFs e HT (protocolo de 4h), acentuaron la disminución de la viabilidad celular (aproximadamente hasta el 16%, 50% y 21% de los valores controles en A2058, AsPC1, y MDA-MB-231, respectivamente). Posteriormente, tras 24h adicionales en cultivo, la población de células tumorales no se recuperó y su viabilidad continuó disminuyendo hasta aproximadamente el 2.1% (A2058), el 3.8% (AsPC1) y el 1.6% (MDA-MB-231) de los valores control (figura 14C).

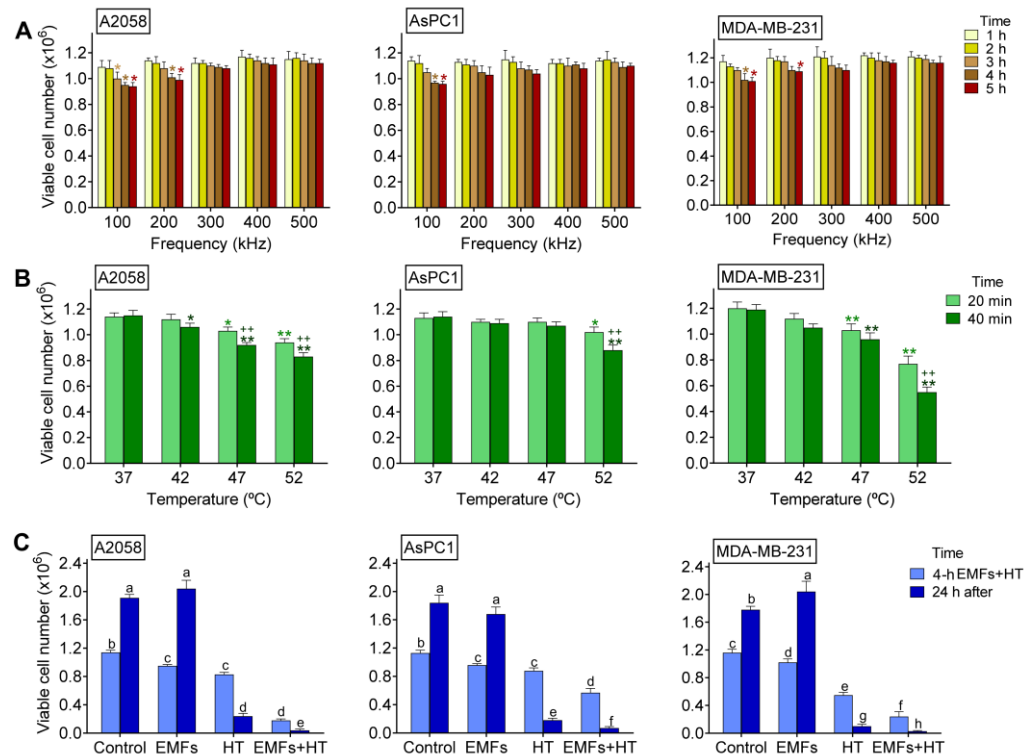


Figura 14. Viabilidad de las células A2058, AsPC1 y MDA-MB-231 expuestas a EMFs y/o HT. 24 horas tras la siembra las células fueron tratadas con: **(A) EMFs (100-500 kHz x 1-5 h)**, los valores control (0 kHz) fueron 1.14 ± 0.03 (A2058), 1.13 ± 0.04 (AsPC1) y 1.20 ± 0.05 (MDA-MB-231) ($\times 10^6$) células viables, * $p < 0.05$ comparando todas las condiciones vs controles (0 kHz) ($n=5$, t-test); **(B) HT (42-52°C, 20-40 min)**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparando todas las condiciones vs controles (37°C); ** $p < 0.01$ comparando 40 vs 20 min. ($n=5$, t-test). **(C) EMFs (100-500 kHz x 4h) e HT (52°C x 40 min)**, desde el min 120 al min 160 del período de 4h (tiempo de exposición a los EMFs)). Las células remanentes fueron cultivadas durante 24 horas sin tratamiento. Se utilizó una ANOVA para hacer comparaciones entre los diferentes grupos después de 4 horas de tratamiento con EMFs+HT y 24 horas después. Letras diferentes indican diferencias con $p < 0.05$ ($n=5$).

No obstante, esta pronunciada disminución en la viabilidad celular puede resultar engañosa ya que las células tumorales, en condiciones *in vivo*, pueden implementar mecanismos de resistencia a los efectos de las radiaciones no ionizantes, adaptarse, sobrevivir, y recuperar su crecimiento. *In vivo*, las estructuras complejas que rodean al tumor (estroma, vascularización, y otras células), más factores sistémicos y paracrinós, pueden favorecer dicha supervivencia. Es bien conocido que, incluso un pequeño porcentaje de la supervivencia tumoral puede transformarse, *a posteriori*, en un patrón de crecimiento explosivo. En este sentido, resulta clave considerar que la combinación de EMFs e HT no sea suficiente para erradicar un tumor y se precise su combinación con otras oncoterapias.

De forma paralela se investigó el efecto de los EMFs y la HT sobre la distribución del ciclo celular y el tipo de muerte celular inducida. En la figura 15A, se observa que el tratamiento con EMFs e HT no provocó cambios significativos en la distribución del ciclo celular en las diferentes células tumorales estudiadas, respecto a sus controles no tratados. Sin embargo, sí observamos que la pérdida de viabilidad celular inducida por la combinación de EMFs e HT se asocia principalmente a la muerte por apoptosis (figura 15B). Tanto el efecto de los EMFs o de la HT, analizados de forma independiente, no provocaron cambios en esta tendencia. Por ejemplo, en el caso de las células A2058, la

pequeña disminución en la viabilidad celular inducida por EMF o HT se asoció a la activación de la apoptosis ya que aproximadamente un $71\pm 7\%$ de las células no viables en el caso de las EMFs y un $87\pm 6\%$ en el caso de las HT fueron identificadas como apoptóticas.

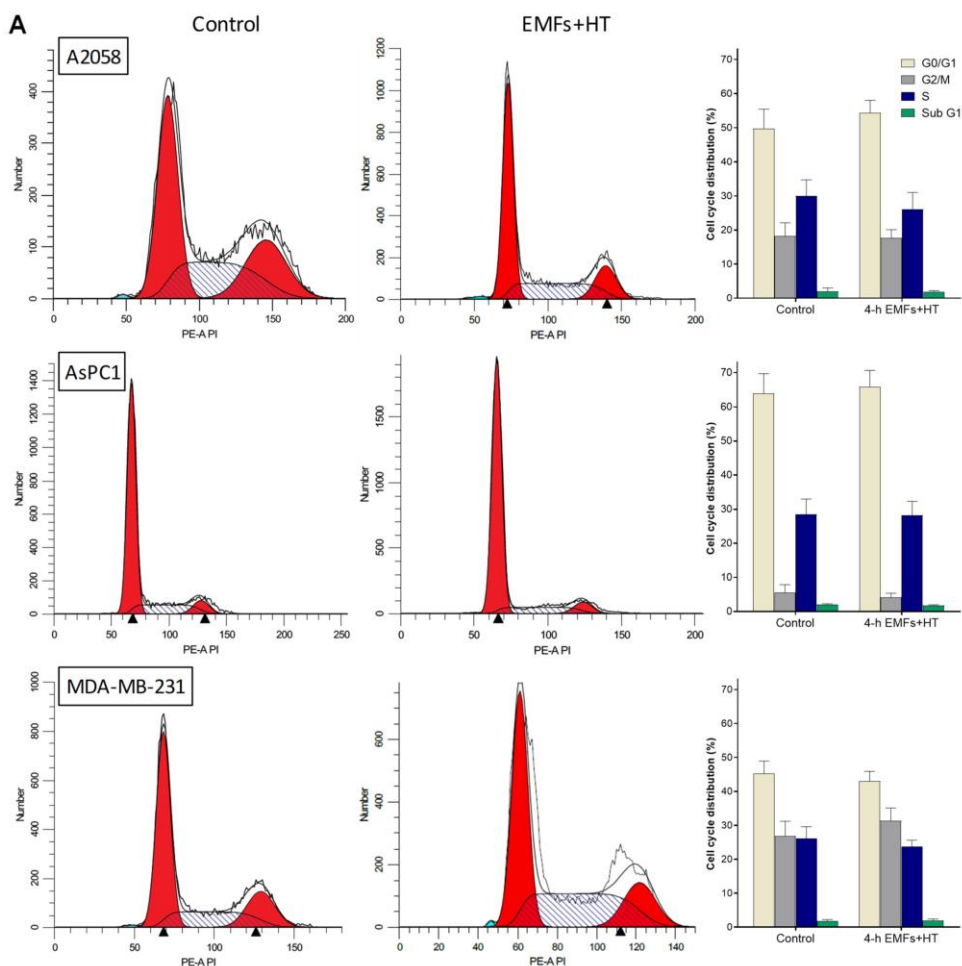


Figura 15A. Efecto de los EMFs y la HT sobre la distribución del ciclo celular. Análisis de citometría de flujo de la distribución del ciclo celular tras la exposición a EMFs e HT (n=5). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con EMFs + HT y los controles.

B

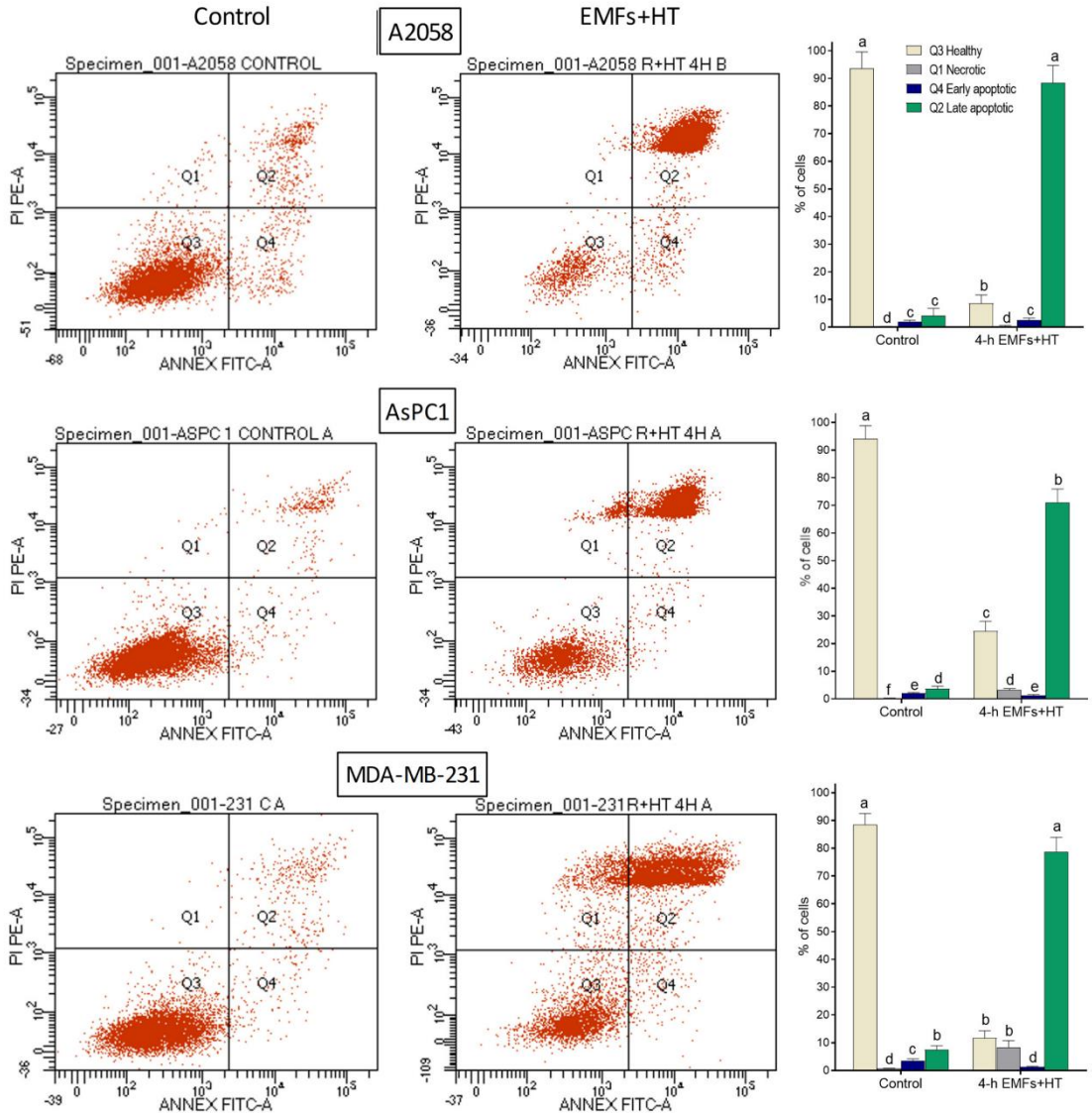


Figura 15B. Tipo de muerte celular inducida por el tratamiento con EMFs e HT. Análisis por citometría de flujo del % de células apoptóticas y necróticas. Se utilizó una ANOVA de dos vías para hacer comparaciones entre las células control tratadas con EMFs + HT y las diferentes subpoblaciones celulares en ambos grupos. Letras diferentes indican diferencias significativas con $p < 0.05$ ($n=5$).

Por otro lado, en las imágenes obtenidas mediante microscopía, se observó que el tratamiento con EMFs + HT provocó cambios drásticos en la forma de las células tumorales en cultivo (figura 16A). Las células tratadas con EMF e HT no se recuperaron en las siguientes 24 horas (figura 16A). Por lo que se infiere que a) el daño causado a las células tumorales no es reversible y b) las pocas células remanentes podrían, posiblemente, experimentar cierta debilidad ante el efecto citotóxico de diferentes quimioterapéuticos. El análisis de la muerte celular (figura 16B) y el incremento en la detección citosólica del factor inductor de la apoptosis y de citocromo C (figura 16C) confirmaron, posteriormente, que el tratamiento con EMFs e HT induce la activación de la muerte celular por apoptosis.

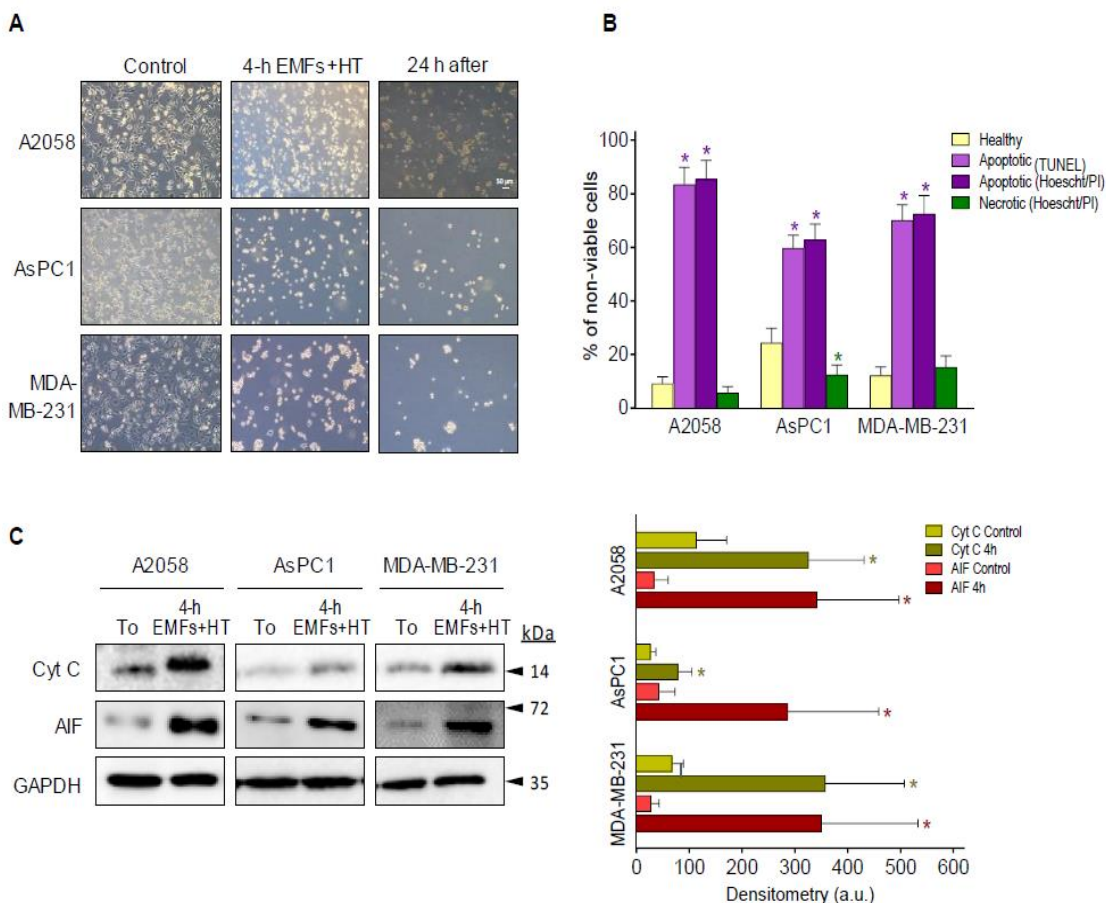


Figura 16. Efecto de los EMFs e HT sobre la activación de la apoptosis en las células cancerosas. (A) Imágenes de microscopía inversa (amplificación 100x) de células tumorales tratadas con EMFs e HT (como en la figura 14C) donde se observan drásticos cambios morfológicos asociados con la pérdida de viabilidad. (B) Análisis de muerte celular, tras la aplicación del protocolo de 4h (figura 14C), basado en las tinciones de Hoescht 33342 y de yoduro de propidio y el ensayo de TUNEL (ver la sección de Métodos). La viabilidad celular en los controles fue >98% en todos los casos. * $p < 0.01$ comparando células no viables versus células viables ($n=5$). (C) Western Blots para la detección de citocromo C y el factor inductor de la apoptosis (AIF) en la fracción citosólica (realizados tras la aplicación del protocolo de 4h, figura 14C). Los análisis densitométricos (a.u., unidades arbitrarias) representan los valores medios $\pm$ DS para $n=4$ por línea celular [* $p < 0.01$ comparando células tratadas con EMFs e HT (4h como en la figura 14C) versus los controles no tratados].

4.3. Los EMFs y la HT incrementan la permeabilidad lisosomal

La respuesta celular al choque térmico celular involucra a las HSP (proteínas de choque térmico). La Hsp70 es la principal HSP, proporciona termo-tolerancia y tiene un papel central en la traducción, post-traducción, prevención de agregados y plegamiento de proteínas agregadas (184). Hsp110, un cofactor de Hsp70, puede proporcionar una mayor tolerancia a la exposición celular a temperaturas extremas (185). En las células cancerosas, Hsp70 podría ser clave, ya que se sobre-expresa en diferentes tipos de cáncer y también desempeña un papel antiapoptótico que favorece la supervivencia de las células malignas (186). Como se muestra en la figura 17A, los niveles de Hsp70 no se ven afectados significativamente por la exposición a EMFs e HT (protocolo de 4 horas, como en la figura 14C), y solo 24 horas después de la exposición observamos en células MDA-MB-231 una disminución de aproximadamente un 36% en comparación con los controles. Sin embargo, la Hsp110 prácticamente desaparece tras la exposición a EMFs e HT, y sus niveles no se recuperan en las siguientes 24 horas (figura 17A).

Estos resultados demuestran claramente, en diferentes células tumorales, que los niveles de Hsp70 permanecen en (o cerca de) los valores de control a pesar de la exposición a EMFs e HT.

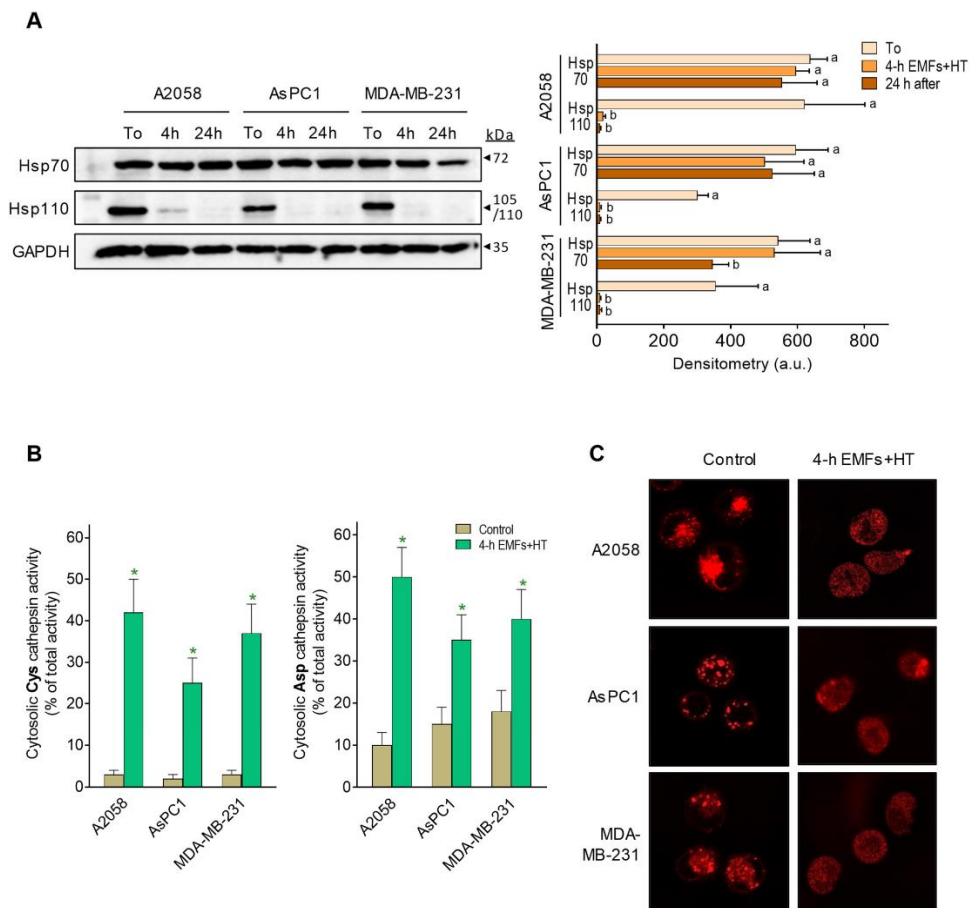


Figura 17. Efecto de EMFs e HT sobre los niveles de HSP70 y HSP110 y la permeabilidad lisosomal. (A) Niveles de Hsp70 y Hsp110 (western blots) en las células cancerosas después de la exposición a EMFs e HT y 24h después de la exposición (* $p < 0.01$, comparando células tratadas con EMFs e HT vs controles no tratados) (t-test). El análisis densitométrico (a.u., unidades arbitrarias) representa los valores medios $\pm$ DS para 4-5 experimentos diferentes por línea celular y tiempo. (B) Actividades de cisteín-catepsina y aspartil-catepsina medidas en la fracción citosólica después de la exposición a EMFs e HT ($n = 4-5$, * $p < 0,01$ (t-test), comparando células tratadas con EMFs e HT vs controles no tratados). (C) Imágenes representativas de la tinción de los lisosomas (LysoTracker) de las células tumorales donde se evidencia como el tratamiento con EMFs e HT induce la difusión del marcador lisosomal hacia el citosol. En todos los casos las células habían sido tratadas siguiendo el protocolo de 4h indicado en la figura 14C.

Nylandsted et al. demostraron que la Hsp70 se encuentra formando parte de la membrana de los lisosomas de las células tumorales, pero rara vez en la de las células normales, un hecho que facilita la supervivencia de las células tumorales al favorecer la integridad de sus lisosomas (187). Las HSP normalmente se unen a las membranas lipídicas y facilitan la estabilización de la membrana plasmática durante condiciones de estrés (188). La permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) se asocia a la liberación al citosol de catepsinas de cisteína (Cys-cathepsin) y aspartato (Asp-cathepsin) (189), que son inductores conocidos de la apoptosis dependiente de mitocondrias (190). Como se muestra en la figura 18, el tratamiento con EMFs e HT (protocolo de 4h, como en la figura 14C) provoca un aumento en las actividades de ambas catepsinas en el citosol (ver también la figura 17C que muestra como el contenido lisosomal difunde hacia el citosol), lo que sugiere que este aumento podría ser el mecanismo subyacente que activa la muerte por apoptosis (figura 15B). Para probar esta hipótesis, silenciemos la expresión de Hsp70 en células AsPC1 antes de someterlas al efecto de EMFs e HT. Usamos estas células como prueba de concepto debido a su relativa resistencia a los EMFs y a la HT a corto plazo (4h) (figura 14C). Los EMFs y la HT (protocolo de 4h, como en la figura 14C) causaron una disminución en la viabilidad de las células AsPC1 WT hasta un aprox. un 47% de los valores de control (las células necróticas, según el análisis microscópico, eran < 4% de todas las células no viables). El mismo estrés inducido por EMFs e HT en células

AsPC1 *knockout* para Hsp70 (utilizando un shRNA específico), disminuyó drásticamente la viabilidad a aprox. un 5% de los valores de control (el % de células apoptóticas y necróticas, según el análisis microscópico, fue de aproximadamente 27 y 73% de células no viables, respectivamente) ($p < 0,01$ comparando Hsp70-*knockout* versus células AsPC1 WT, $n=5$) (t-test).

La figura 18 muestra que, en las células AsPC1 tratadas con EMF y HT, la actividad de las catepsinas citosólicas aumenta aún más en células *knockout* para Hsp70. El alto porcentaje de células necróticas en las células AsPC1 *knockout* para Hsp70 no es sorprendente, ya que una LMP masiva, generalmente, produce muerte celular subapoptótica o necrótica (189). En conjunto, estos datos sugieren una relación directa entre los EMFs, la HT, la LMP, la Hsp70, las catepsinas y la activación de la muerte celular dependiente de mitocondria.

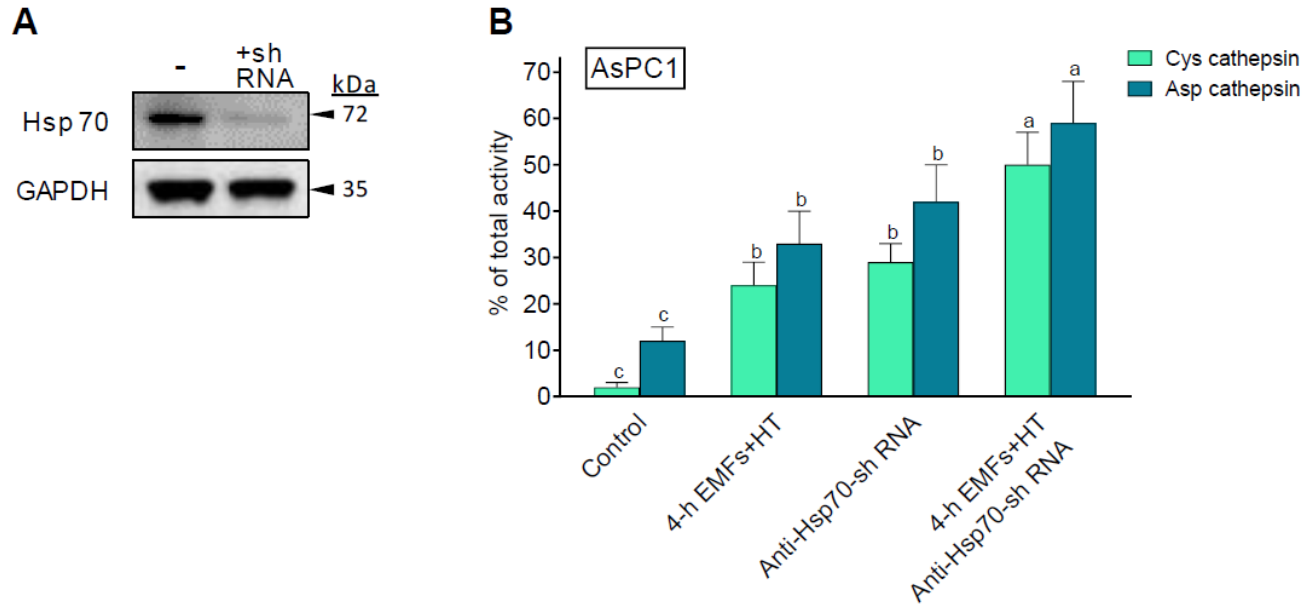


Figura 18. Efecto del silenciamiento de la Hsp70 (shRNA) sobre el aumento de las actividades catepsina citosólicas inducida por EMFs e HT en células AsPC1. (A) Los niveles de proteína Hsp70 (Western blots) se midieron en controles y en células tratadas con EMFs e HT pretratadas con shRNA anti-Hsp70 (n=4, $p<0,01$ comparando células tratadas con EMFs e HT frente a controles no tratados) (t-test). (B) La actividad cisteín-catepsina (Cys-cathepsin) y aspartil-catepsina (Asp-cathepsin) en la fracción citosólica fue medida tras la exposición a EMFs e HT (protocolo de 4 horas) en células AsPC1 y en células knockout para Hsp70. Se utilizó una ANOVA de una vía para hacer comparaciones entre las diferentes condiciones experimentales para cada actividad de catepsina. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con $p<0.05$, n=4-5.

4.2. Los EMFs y la HT inducen estrés oxidativo y la liberación de señales proapoptóticas mitocondriales

Posteriormente se analizó la inducción de la muerte celular por la exposición a EMFs e HT. Enfocamos nuestros experimentos principalmente en la combinación de EMFs e HT debido a su sinergismo antitumoral. Como se muestra en la tabla 2, el tratamiento con EMFs e HT aumenta el consumo de O_2 y la generación de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$) en las células tumorales. Estos efectos se asocian a una disminución del MMP, el mtGSH y el mtATP (todo consecuencia del daño causado por el aumento de ROS (182), y también a un aumento en el citosol de la actividad de caspasa 3 (tabla 2) y de los niveles de AIF y citocromo C (figura 16C) (183). En conjunto, estos hechos experimentales prueban que los EMFs y la HT afectan a la función mitocondrial induciendo la muerte por apoptosis de las células tumorales. Se sabe que la inhibición de la producción de energía celular, la generación de ROS, el desequilibrio de Ca^{2+} celular, las señales extracelulares inductoras de muerte, son todos estímulos capaces de inducir tanto apoptosis como necrosis celular. La tasa relativa de estos dos procesos (aumento de actividades proteasa y endonucleasa *versus* catástrofe bioenergética) determina si una célula sufre apoptosis o necrosis primaria (183), un hecho que suele reflejar la heterogeneidad de una población de células tumorales en crecimiento. Sin embargo, los EMFs y la HT causan principalmente la muerte de las células

tumorales por apoptosis, mientras que solo un pequeño % corresponde a necrosis (figura 16B). A partir de aquí, hay que dilucidar si la activación de la muerte celular es una consecuencia directa de la acción de los EMFs+HT sobre las mitocondrias o secundaria a otro/s mecanismo(s).

Tabla 2. Efecto de EMFs e HT sobre la generación de ROS y los mecanismos implicados en la activación de la apoptosis. Todos los parámetros se midieron en células cancerosas después de la exposición a EMFs e HT (protocolo de 4 horas como en la figura 14). *p<0,05, **p<0,01 comparando EMFs+HT versus controles no tratados (n=5-6, t-test).

	A2058		AsPC1		MDA-MB-231	
	-	+ EMFs+HT	-	+ EMFs+HT	-	+ EMFs+HT
O ₂ consumption (pmol/10 ⁶ cells x min)	627 ± 79	1067 ± 165**	784 ± 102	1226 ± 188**	551 ± 82	1046 ± 124**
H ₂ O ₂ (nmol/10 ⁶ cells x min)	0.77 ± 0.10	1.56 ± 0.31**	0.94 ± 0.15	1.47 ± 0.27*	0.62 ± 0.13	1.24 ± 0.29**
O ₂ ^{••} (nmol/10 ⁶ cells x min)	0.33 ± 0.04	0.69 ± 0.12**	0.45 ± 0.07	0.72 ± 0.15**	0.26 ± 0.05	0.48 ± 0.09**
MMP (TPM accumulation ratio, %)	100 ± 5	42 ± 15**	100 ± 4	56 ± 16**	100 ± 6	35 ± 12**
mtGSH (nmol/10 ⁶ cells)	4.2 ± 0.9	2.0 ± 0.5**	2.8 ± 0.6	1.3 ± 0.5**	3.5 ± 0.7	1.5 ± 0.5**
mtATP (mM)	1.05 ± 0.10	0.52 ± 0.14**	0.96 ± 0.12	0.41 ± 0.09**	0.92 ± 0.13	0.33 ± 0.08**
Caspase 3 (pmol/10 ⁶ cells x min)	1.87 ± 0.46	3.66 ± 0.39**	1.67 ± 0.35	3.15 ± 0.42**	2.05 ± 0.51	4.14 ± 0.67**

4.3. Los EMFs y la HT incrementan la permeabilidad lisosomal

La respuesta celular al choque térmico celular involucra a las HSP (proteínas de choque térmico). La Hsp70 es la principal HSP, proporciona termo-tolerancia y tiene un papel central en la traducción, post-traducción, prevención de agregados y plegamiento de proteínas agregadas (184). Hsp110, un cofactor de Hsp70, puede proporcionar una mayor tolerancia a la exposición celular a temperaturas extremas (185). En las células cancerosas, Hsp70 podría ser clave, ya que se sobre-expresa en diferentes tipos de cáncer y también desempeña un papel antiapoptótico que favorece la supervivencia de las células malignas (186). Como se muestra en la figura 17A, los niveles de Hsp70 no se ven afectados significativamente por la exposición a EMFs e HT (protocolo de 4 horas, como en la figura 14C), y solo 24 horas después de la exposición observamos en células MDA-MB-231 una disminución de aproximadamente un 36% en comparación con los controles. Sin embargo, la Hsp110 prácticamente desaparece tras la exposición a EMFs e HT, y sus niveles no se recuperan en las siguientes 24 horas (figura 17A).

Estos resultados demuestran claramente, en diferentes células tumorales, que los niveles de Hsp70 permanecen en (o cerca de) los valores de control a pesar de la exposición a EMFs e HT.

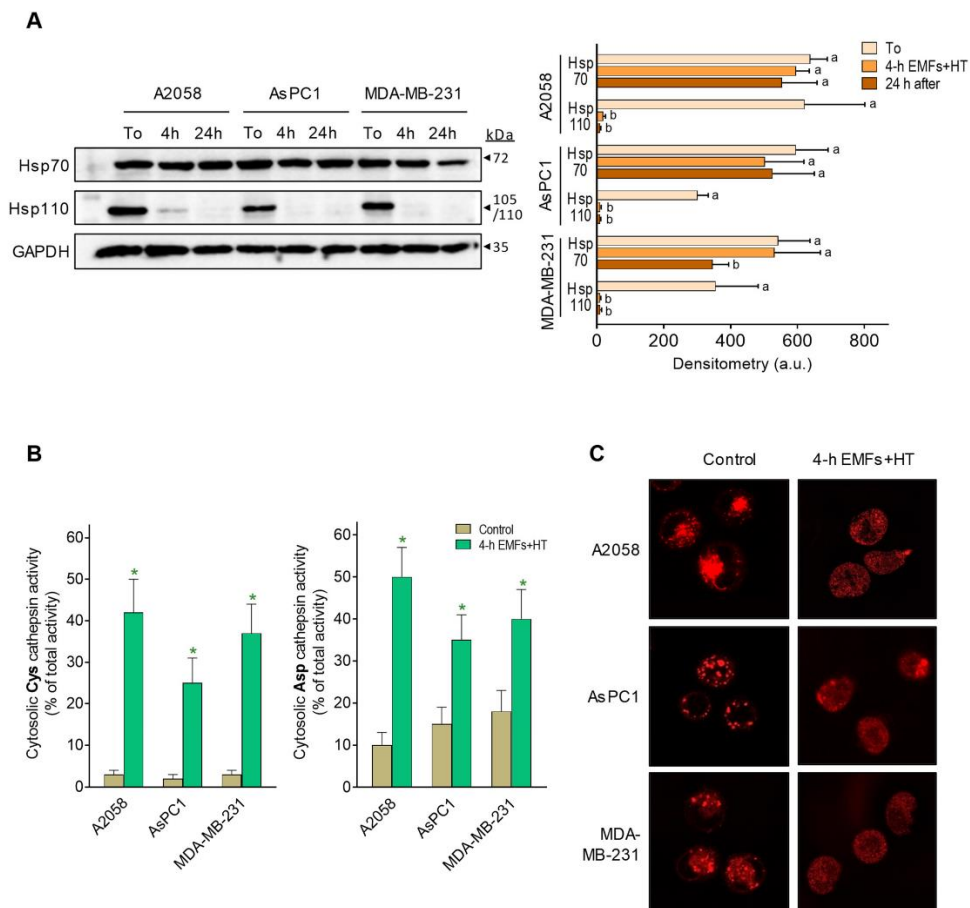


Figura 17. Efecto de EMFs e HT sobre los niveles de HSP70 y HSP110 y la permeabilidad lisosomal. (A) Niveles de Hsp70 y Hsp110 (western blots) en las células cancerosas después de la exposición a EMFs e HT y 24h después de la exposición (* $p < 0.01$, comparando células tratadas con EMFs e HT vs controles no tratados) (t-test). El análisis densitométrico (a.u., unidades arbitrarias) representa los valores medios $\pm$ DS para 4-5 experimentos diferentes por línea celular y tiempo. (B) Actividades de cisteín-catepsina y aspartil-catepsina medidas en la fracción citosólica después de la exposición a EMFs e HT ($n = 4-5$, * $p < 0.01$ (t-test), comparando células tratadas con EMFs e HT vs controles no tratados). (C) Imágenes representativas de la tinción de los lisosomas (LysoTracker) de las células tumorales donde se evidencia como el tratamiento con EMFs e HT induce la difusión del marcador lisosomal hacia el citosol. En todos los casos las células habían sido tratadas siguiendo el protocolo de 4h indicado en la figura 14C.

Nylandsted et al. demostraron que la Hsp70 se encuentra formando parte de la membrana de los lisosomas de las células tumorales, pero rara vez en la de las células normales, un hecho que facilita la supervivencia de las células tumorales al favorecer la integridad de sus lisosomas (187). Las HSP normalmente se unen a las membranas lipídicas y facilitan la estabilización de la membrana plasmática durante condiciones de estrés (188). La permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) se asocia a la liberación al citosol de catepsinas de cisteína (Cys-cathepsin) y aspartato (Asp-cathepsin) (189), que son inductores conocidos de la apoptosis dependiente de mitocondrias (190). Como se muestra en la figura 18, el tratamiento con EMFs e HT (protocolo de 4h, como en la figura 14C) provoca un aumento en las actividades de ambas catepsinas en el citosol (ver también la figura 17C que muestra como el contenido lisosomal difunde hacia el citosol), lo que sugiere que este aumento podría ser el mecanismo subyacente que activa la muerte por apoptosis (figura 15B). Para probar esta hipótesis, silenciamos la expresión de Hsp70 en células AsPC1 antes de someterlas al efecto de EMFs e HT. Usamos estas células como prueba de concepto debido a su relativa resistencia a los EMFs y a la HT a corto plazo (4h) (figura 14C). Los EMFs y la HT (protocolo de 4h, como en la figura 14C) causaron una disminución en la viabilidad de las células AsPC1 WT hasta un aprox. un 47% de los valores de control (las células necróticas, según el análisis microscópico, eran < 4% de todas las células no viables). El mismo estrés inducido por EMFs e HT en células

AsPC1 *knockout* para Hsp70 (utilizando un shRNA específico), disminuyó drásticamente la viabilidad a aprox. un 5% de los valores de control (el % de células apoptóticas y necróticas, según el análisis microscópico, fue de aproximadamente 27 y 73% de células no viables, respectivamente) ($p < 0,01$ comparando Hsp70-*knockout* versus células AsPC1 WT, $n=5$) (t-test).

La figura 18 muestra que, en las células AsPC1 tratadas con EMF y HT, la actividad de las catepsinas citosólicas aumenta aún más en células *knockout* para Hsp70. El alto porcentaje de células necróticas en las células AsPC1 *knockout* para Hsp70 no es sorprendente, ya que una LMP masiva, generalmente, produce muerte celular subapoptótica o necrótica (189). En conjunto, estos datos sugieren una relación directa entre los EMFs, la HT, la LMP, la Hsp70, las catepsinas y la activación de la muerte celular dependiente de mitocondria.

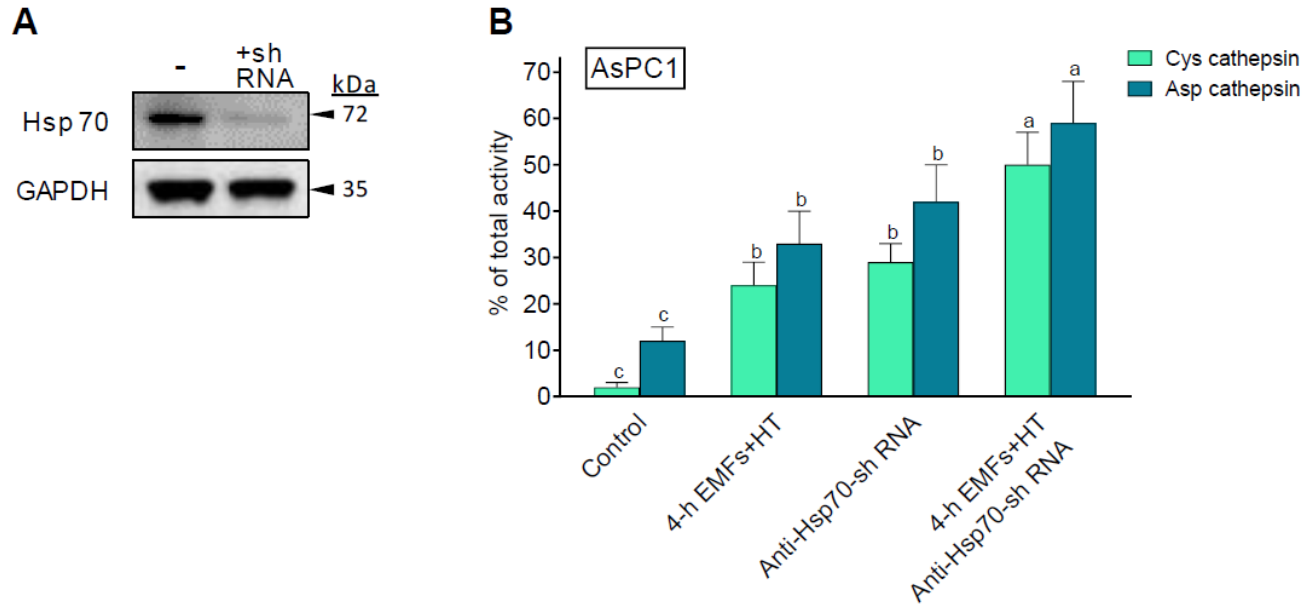


Figura 18. Efecto del silenciamiento de la Hsp70 (shRNA) sobre el aumento de las actividades catepsina citosólicas inducida por EMFs e HT en células AsPC1. (A) Los niveles de proteína Hsp70 (Western blots) se midieron en controles y en células tratadas con EMFs e HT pretratadas con shRNA anti-Hsp70 (n=4, $p<0,01$ comparando células tratadas con EMFs e HT frente a controles no tratados) (t-test). (B) La actividad cisteín-catepsina (Cys-cathepsin) y aspartil-catepsina (Asp-cathepsin) en la fracción citosólica fue medida tras la exposición a EMFs e HT (protocolo de 4 horas) en células AsPC1 y en células knockout para Hsp70. Se utilizó una ANOVA de una vía para hacer comparaciones entre las diferentes condiciones experimentales para cada actividad de catepsina. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con $p<0.05$, n=4-5.

4.2. Los EMFs y la HT inducen estrés oxidativo y la liberación de señales proapoptóticas mitocondriales

Posteriormente se analizó la inducción de la muerte celular por la exposición a EMFs e HT. Enfocamos nuestros experimentos principalmente en la combinación de EMFs e HT debido a su sinergismo antitumoral. Como se muestra en la tabla 2, el tratamiento con EMFs e HT aumenta el consumo de O_2 y la generación de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$) en las células tumorales. Estos efectos se asocian a una disminución del MMP, el mtGSH y el mtATP (todo consecuencia del daño causado por el aumento de ROS (182), y también a un aumento en el citosol de la actividad de caspasa 3 (tabla 2) y de los niveles de AIF y citocromo C (figura 16C) (183). En conjunto, estos hechos experimentales prueban que los EMFs y la HT afectan a la función mitocondrial induciendo la muerte por apoptosis de las células tumorales. Se sabe que la inhibición de la producción de energía celular, la generación de ROS, el desequilibrio de Ca^{2+} celular, las señales extracelulares inductoras de muerte, son todos estímulos capaces de inducir tanto apoptosis como necrosis celular. La tasa relativa de estos dos procesos (aumento de actividades proteasa y endonucleasa *versus* catástrofe bioenergética) determina si una célula sufre apoptosis o necrosis primaria (183), un hecho que suele reflejar la heterogeneidad de una población de células tumorales en crecimiento. Sin embargo, los EMFs y la HT causan principalmente la muerte de las células

tumorales por apoptosis, mientras que solo un pequeño % corresponde a necrosis (figura 16B). A partir de aquí, hay que dilucidar si la activación de la muerte celular es una consecuencia directa de la acción de los EMFs+HT sobre las mitocondrias o secundaria a otro/s mecanismo(s).

Tabla 3. Efecto de EMFs e HT sobre la generación de ROS y los mecanismos implicados en la activación de la apoptosis. Todos los parámetros se midieron en células cancerosas después de la exposición a EMFs e HT (protocolo de 4 horas como en la figura 14). *p<0,05, **p<0,01 comparando EMFs+HT versus controles no tratados (n=5-6, t-test).

	A2058		AsPC1		MDA-MB-231	
	-	+ EMFs+HT	-	+ EMFs+HT	-	+ EMFs+HT
O ₂ consumption (pmol/10 ⁶ cells x min)	627 ± 79	1067 ± 165**	784 ± 102	1226 ± 188**	551 ± 82	1046 ± 124**
H ₂ O ₂ (nmol/10 ⁶ cells x min)	0.77 ± 0.10	1.56 ± 0.31**	0.94 ± 0.15	1.47 ± 0.27*	0.62 ± 0.13	1.24 ± 0.29**
O ₂ ^{••} (nmol/10 ⁶ cells x min)	0.33 ± 0.04	0.69 ± 0.12**	0.45 ± 0.07	0.72 ± 0.15**	0.26 ± 0.05	0.48 ± 0.09**
MMP (TPM accumulation ratio, %)	100 ± 5	42 ± 15**	100 ± 4	56 ± 16**	100 ± 6	35 ± 12**
mtGSH (nmol/10 ⁶ cells)	4.2 ± 0.9	2.0 ± 0.5**	2.8 ± 0.6	1.3 ± 0.5**	3.5 ± 0.7	1.5 ± 0.5**
mtATP (mM)	1.05 ± 0.10	0.52 ± 0.14**	0.96 ± 0.12	0.41 ± 0.09**	0.92 ± 0.13	0.33 ± 0.08**
Caspase 3 (pmol/10 ⁶ cells x min)	1.87 ± 0.46	3.66 ± 0.39**	1.67 ± 0.35	3.15 ± 0.42**	2.05 ± 0.51	4.14 ± 0.67**

4.4. Efectos antitumorales de los EMFs y la HT combinados con quimioterapia estándar

El objetivo principal de cualquier estrategia contra el cáncer es lograr la eliminación completa de todas las células cancerosas en crecimiento. Como se muestra en la figura 14C, en nuestras condiciones experimentales, la exposición a EMFs e HT no elimina todas las células tumorales. En esto llama particularmente la atención la extraordinaria resistencia de las células malignas a una temperatura de hasta 52°C. Sin embargo, como se explicó anteriormente, la viabilidad celular extremadamente baja encontrada 24 horas después del tratamiento con EMFs e HT puede ser engañosa. Por lo tanto, para que nuestra estrategia fuese lo más eficaz posible, primero investigamos el efecto de la combinación de EMFs e HT con quimioterapia estándar (actualmente en uso contra los tipos de cáncer ensayados) (191–193). Como se muestra en la figura 19, la combinación de EMFs, HT (protocolo de 4h como en la figura 14C) y paclitaxel (PAC, en células A2058 y MDA-MB-231) o GEM (en células AsPC1) redujo drásticamente la viabilidad de las células tumorales al 2,6%, 1,7% y 5,3% de los valores control. La viabilidad celular se midió de nuevo 24 horas después de la exposición a la combinación de EMFs + HT + quimioterapia y en ningún caso se encontraron células viables (figura 19). En este último período de 24h se renovó el medio de cultivo para eliminar los restos de PAC o GEM.

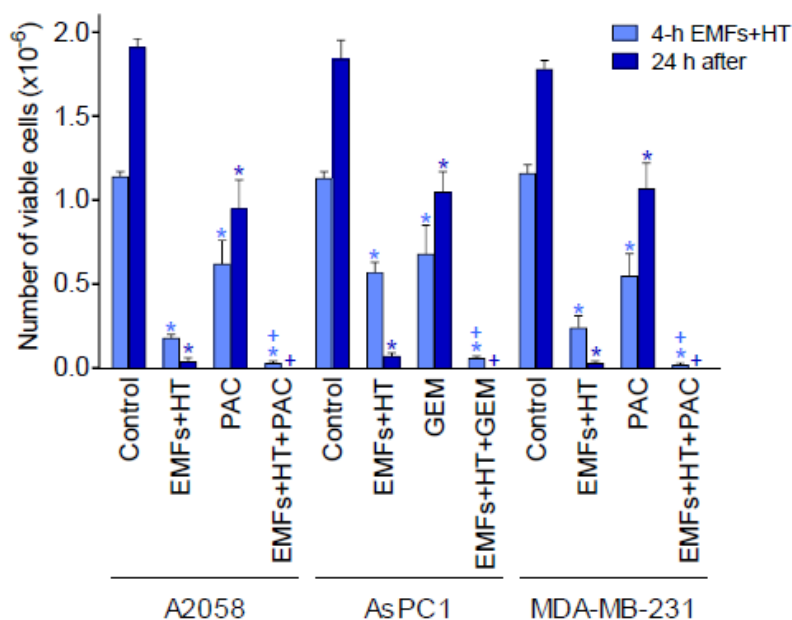


Figura 19. Efecto de los EMFs, la HT y la quimioterapia sobre la viabilidad de las células tumorales. Las células tumorales se sembraron 24h antes de iniciar los tratamientos. Las células se trataron con EMFs e HT (4h) como en la figura 14C. El paclitaxel (PAC, 1 μ M) estuvo presente en el medio de cultivo durante el protocolo de 4h (figura 14C). La gemcitabina (GEM, 25 μ M) estuvo presente en el medio de cultivo durante los últimos 30 min del protocolo de 4h. Al final del período de tratamiento de 4h, se cambió el medio y las células se mantuvieron en cultivo durante 24h adicionales. * $p < 0.01$ al comparar todas las condiciones con los controles; * $p < 0.01$ comparando EMFs+HT+PAC o EMFs+HT+GEM versus PAC o GEM ($n=5$, t-test).

Ambos fármacos se incubaron a concentraciones (1 μ M de PAC, 25 μ M de GEM) que reflejan las concentraciones biodisponibles tras su administración *in vivo* y durante el período de tiempo utilizado en nuestros ensayos *in vitro*. El PAC se administra, en la clínica, a dosis de 100-250 mg/m² por vía intravenosa (infusión de 24h) (194). Tomando la dosis más baja de 100 mg/m², y con

aprox. $1,8 \text{ m}^2/70 \text{ Kg}$ en humanos, esa dosis significa aprox. $2,6 \text{ mg/Kg} \times 24\text{h}$ o $0,107 \text{ mg/Kg} \times \text{h}$ ($0,428 \text{ mg/Kg} \times 4\text{h}$). El agua contenida en el cuerpo humano es de aprox. $0,7 \text{ L/Kg}$ de peso corporal. Por lo tanto, un paciente recibirá aprox. $0,612 \text{ mg}$ de $\text{PAC/L} \times 4\text{h}$. Dado que $854 \text{ }\mu\text{g}$ de PAC/L equivalen a $1 \text{ }\mu\text{M}$ (apenas ligeramente por encima de la concentración esperada usando la dosis de 100 mg/m^2), utilizamos $1 \text{ }\mu\text{M}$ de PAC en nuestros experimentos *in vitro*. De hecho, los niveles plasmáticos de PAC libre están cerca de $1 \text{ }\mu\text{M}$ durante un período de 4-5 h después de una dosis intravenosa de 135 mg/m^2 (175). Por su parte la GEM generalmente se administra en infusión i.v. de 1000 mg/m^2 durante 30 min una vez por semana x 7 semanas (195). Eso significa $25,7 \text{ mg/Kg} \times 30 \text{ min}$ o $36,7 \text{ mg}$ de GEM/L de agua corporal x 30 min. Sin embargo, aunque $263 \text{ }\mu\text{g}$ de GEM/L equivalen a aproximadamente $139 \text{ }\mu\text{M}$, las concentraciones plasmáticas medias de GEM oscilan entre $32 \text{ }\mu\text{M}$ a los 30 min tras una dosis de 1000 mg/m^2 , $8 \text{ }\mu\text{M}$ a los 60 min, y niveles indetectables a los 120 min (196). En base a esta farmacocinética calculamos una concentración de $25 \text{ }\mu\text{M}$ a añadir al medio de cultivo 30 min antes de terminar el período de 4h (como en la figura 14C).

4.5. Otras estrategias para potenciar el efecto anticancerígeno de los EMFs y la HT

A partir del efecto sobre la LMP inducido por EMFs e HT (ver arriba), también investigamos si las moléculas capaces de aumentar la LMP podrían mejorar el efecto anticancerígeno de la combinación de energías no ionizantes. Con este objetivo, ensayamos el efecto del PT, polifenol natural con efectos anticancerígenos demostrados (197). Como se muestra en la figura 20, el PT (20 μ M x 4h) solo disminuyó ligeramente el número de células cancerosas viables en comparación con los valores de control. La concentración de este polifenol se seleccionó teniendo en cuenta criterios farmacocinéticos desarrollados en estudios previos (198). El PT se puede administrar *in vivo* en forma de fosfato disódico de PT (LGC Standards, Middlesex, Reino Unido), al objeto de incrementar la solubilidad. La dosis administrada permite garantizar que el tumor sea expuesto a la concentración biodisponible equivalente a la de los estudios *in vitro* (Estrela JM, observaciones no publicadas). Cuando se combinaron EMFs e HT (como en la figura 14C) con PT, el número de células cancerosas viables disminuyó a aprox. 7,5 (A2058), 32,7 (AsPC1) y 6,7 (MDA-MB-231) % de los valores de control (figura 20).

Paralelamente, ensayamos una terapia dirigida anti-Hsp70 usando apoptozol (Az, N-(4-carboxamidobenzil)-2-(3,5-bis-trifluorometil)-4,5-bis-(4-metoxifenil)-imidazol, Merck). Az es

una molécula pequeña que inhibe la actividad ATPasa de la Hsp70 al unirse a su dominio ATPasa, sin afectar a otras Hsp, e induce la muerte de células cancerosas apoptóticas a través de la activación de caspasas (199). Los valores IC_{50} de Az fueron 4.5 ± 0.3 , 5.0 ± 0.5 y 4.0 ± 0.2 μM para las células A2058, AsPC1 y MDA-MB-231, respectivamente ($n = 5$ en todos los casos). Como se muestra en la figura 20, Az *per se* solo redujo el número de células cancerosas viables a aprox. el 74% (A2058), el 72% (AsPC1) y el 60% (MDA-MB-231) de los valores control (figura 19). Sin embargo, cuando el Az se combinó con EMFs e HT (como en la figura 14C), el número de células cancerosas viables disminuyó al 0% (A2058), 7,5% (AsPC1) y 0% (MDA-MB-231) respecto al valor de las células control (figura 20).

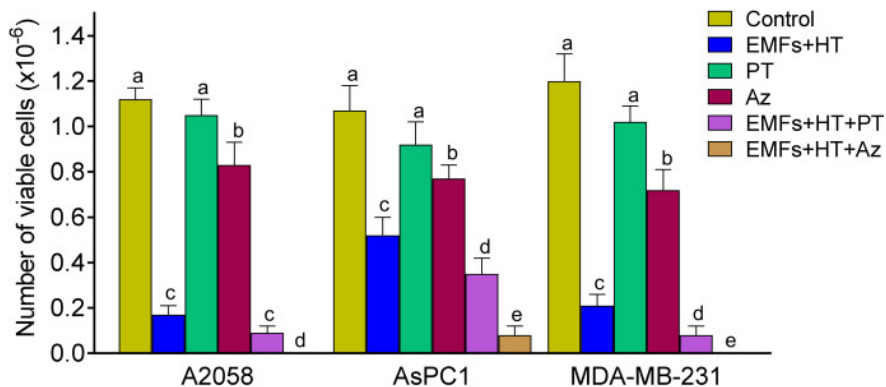


Figura 20. Viabilidad de las células cancerosas tratadas con EMFs + HT, un permeabilizador de los lisosomas (pterostilbeno, PT) y/o terapia dirigida anti-Hsp70 (apoptozol, Az). Tratamiento con EMFs y HT acorde a lo mostrado en la Figura 14C. Las concentraciones de PT (20 μM) o Az (4-5 μM), corresponden a los valores de IC_{50} . Fueron agregadas al medio de cultivo justo antes (PT) o 12 horas antes (Az) de iniciar el protocolo de 4 horas. Se utilizó una ANOVA de una vía para hacer comparaciones entre los diferentes grupos experimentales. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0.05$ ($n = 5$).

4.6. Efecto del tratamiento con EMFs, HT, GEM y PT sobre el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de páncreas humano

Como prueba de concepto de la eficacia de nuestro tratamiento, investigamos si la combinación de EMFs e HT (inducida por HIFU) podría mejorar el efecto de la quimioterapia estándar en ratones portadores de xenoinjertos de células de carcinoma de páncreas humano transfectadas con el gen de la luciferasa (AsPC1-Luc). La detección de bioluminiscencia permitió evaluar el crecimiento de los xenoinjertos en los ratones control y en los ratones tratados con EMFs e HT inducida por HIFU, con GEM o con la triple combinación.

Tal y como se evidencia en la figura 21A, comparativamente con los controles no tratados, el crecimiento de los xenoinjertos fue mucho menor en los ratones tratados con EMFs+HT o con EMFs+HT+GEM (un 14% y un 3-4% de los valores control, respectivamente). El tratamiento aislado con GEM, administrada en dos dosis (50 mg/Kg), para alcanzar en el tumor una concentración biodisponible equivalente a la evaluada en los estudios in vitro, no redujo, ni siguiera inicialmente el tamaño de los xenoinjertos, que tiempo después siguieron una línea de crecimiento, algo inferior pero paralela a la de los controles. La dosis de GEM administrada fue inferior a la utilizada en estudios previos en el mismo modelo tumoral, donde la GEM tuvo efectos semejantes a los observados en nuestro trabajo (200). Los

resultados de la figura 21A también demuestran la mayor eficacia antitumoral del tratamiento con EMFs+HT que, a diferencia de la GEM (quimioterápico de elección en los pacientes con cáncer de páncreas), sí consiguió inicialmente reducir ligeramente el tamaño de los xenoinjertos y, sobre todo, contener el crecimiento de los xenoinjertos cuyo tamaño fue a lo largo del tiempo muy inferior al de los ratones control y al de los ratones tratados sólo con GEM. Por su parte, con el tratamiento completo (EMFs+HT+GEM) se logró reducir todavía más el tamaño de los xenoinjertos (línea verde, figura 21A), lo cual podría facilitar la eliminación completa del tumor mediante cirugía y/o otras técnicas selectivas. Además, los efectos secundarios derivados de la aplicación de la terapia combinada fueron aceptables desde un punto de vista preclínico y reversibles con el tiempo (ver los estudios de toxicología más adelante).

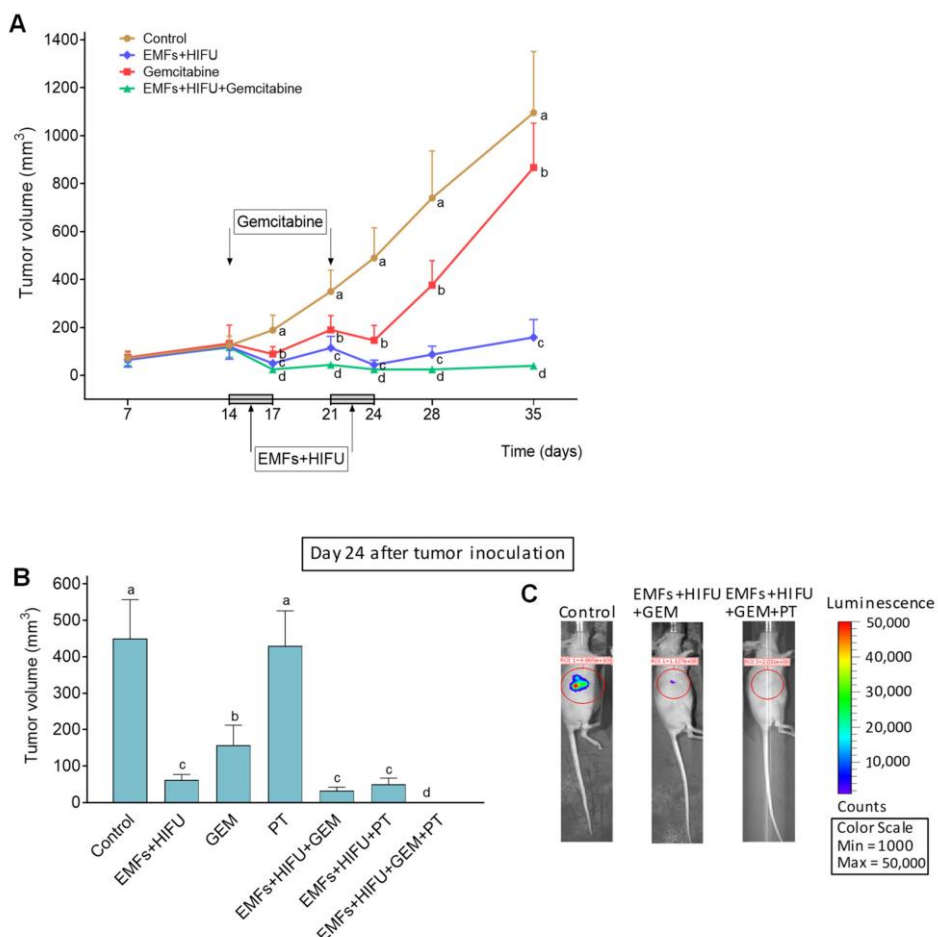


Figura 21. Efecto de los EMFs+HT (inducida por HIFU), GEM y/o PT sobre el crecimiento de xenoinjertos de carcinoma de páncreas (AsPC1). Los ratones fueron tratados con EMFs+HIFU una vez al día, durante 3 días consecutivos (de lunes a miércoles), empezando el día 14 y 21 tras la inoculación del tumor. La GEM (50 mg/Kg) fue administrada en dos dosis, los días 14 y 21, 24 horas antes del tratamiento EMFs e HIFU. El fosfato disódico de PT (100 mg/kg) fue administrado 30 min antes de iniciar cada sesión de tratamiento con EMFs e HT. **(A) Evolución (tamaño) de los xenoinjertos de los ratones tratados con EMFs+HIFU, GEM, o EMFs+HIFU+GEM.** Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar los diferentes grupos experimentales. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para $n = 15$ ratones por grupo. **(B) Tamaño de los xenoinjertos extraídos 24 días tras la inoculación.** Se utilizó una ANOVA de una vía para realizar comparaciones entre los diferentes grupos experimentales. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0,05$) para $n=12$ ratones por grupo. **(C) Imágenes obtenidas a partir de ratones control (no tratados), tratados con EMFs+HT+GEM o tratados con EMFs+HT+GEM+PT.**

Con el objetivo de potenciar la eficacia del tratamiento anterior se evaluó también el efecto del tratamiento con la sal de PT que fue administrada por vía intraperitoneal. La concentración de PT en el tumor en crecimiento fue de $118 \pm 4 \mu\text{M}$ ($n=7$) a los 30 minutos de su administración, $59 \pm 12 \mu\text{M}$ ($n=7$) a los 60 min, y $14 \pm 4 \mu\text{M}$ ($n=7$) a los 120 min ($n=7$). Como se muestra en la figura 21B, el tratamiento aislado con PT apenas modificó el crecimiento de los xenoinjertos, pero el tratamiento combinado EMFs+HT+GEM+PT sí indujo la regresión completa del crecimiento tumoral, ya que a los 24 días no se detectó bioluminiscencia (figura 21C). Además, se realizó seguimiento durante los 2 meses siguientes a la finalización del tratamiento (1 vez por semana mediante el ensayo de luciferasa-luciferina) y no se detectó bioluminiscencia en ninguno de los ratones que habían recibido el tratamiento completo, confirmando con ello, la eliminación completa de las células tumorales.

Pasado este tiempo, todos los ratones fueron sometidos a evaluación de su estado de salud, conforme a la metodología estándar del NIH (USA) (180). Teniendo en cuenta los datos referentes al peso de los animales (evaluados por el equipo veterinario), hemograma y bioquímica clínica (tabla 3), el tratamiento completo no comprometió los valores fisiológicos que se mantuvieron en niveles muy semejantes a los de los

controles dos meses tras finalizar el tratamiento. Para evitar el sacrificio innecesario de animales de experimentación, no se evaluó la toxicidad del tratamiento aislado con GEM, ya que se utilizaron dosis inferiores a las utilizadas en estudios previos (200). En conjunto, nuestros resultados indican que la terapia es segura y no se asocia a efectos tóxicos que puedan comprometer el estado de salud en los animales.

Tabla 4. Hematología y bioquímica clínica de los ratones portadores de de xenoinjertos de células de cáncer de páncreas (AsPC1) tratados con EMFs + HT + GEM + PT (protocolo idéntico a la figura 20.B). Para el análisis estadístico se utilizó una ANOVA de una vía para realizar comparaciones entre los diferentes grupos. Diferentes letras indican diferencias estadísticas $p < 0,05$ ($n=7$ ratones por grupo).

	Non-tumor bearing mice	Tumor-bearing mice	
		One day after treatment	Two months after treatment
Animal weight (g)	25.0 $\pm$ 1.2 ^b	20.5 $\pm$ 0.9 ^c	29.3 $\pm$ 1.5 ^a
Hematology			
Hematocrit (%)	38.7 $\pm$ 0.6 ^a	25.4 $\pm$ 1.3 ^b	37.5 $\pm$ 0.9 ^a
Hemoglobin (g/dL)	13.8 $\pm$ 0.2 ^a	8.6 $\pm$ 0.5 ^b	13.5 $\pm$ 0.4 ^a
Erythrocytes ($10^9/\mu\text{L}$)	8.9 $\pm$ 0.3 ^a	5.3 $\pm$ 0.4 ^b	8.4 $\pm$ 0.5 ^a
Mean red cell volume (μm^3)	41.7 $\pm$ 0.5 ^a	40.6 $\pm$ 0.6 ^b	42.1 $\pm$ 0.5 ^a
Mean red cell hemoglobin (pg)	15.0 $\pm$ 0.3 ^a	14.5 $\pm$ 0.4 ^a	15.1 $\pm$ 0.3 ^a
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	496 $\pm$ 27 ^a	184 $\pm$ 45 ^b	480 $\pm$ 33 ^a
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	7.0 $\pm$ 1.0 ^a	2.1 $\pm$ 0.5 ^b	6.5 $\pm$ 0.8 ^a
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	1.3 $\pm$ 0.2 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^b	1.2 $\pm$ 0.3 ^a
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	5.2 $\pm$ 0.6 ^a	1.3 $\pm$ 0.5 ^b	5.1 $\pm$ 0.4 ^a
Monocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	0.2 $\pm$ 0.05 ^a	0.1 $\pm$ 0.05 ^a	0.2 $\pm$ 0.1 ^a
Eosinophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.1 $\pm$ 0.05 ^a	0.02 $\pm$ 0.01 ^b	0.1 $\pm$ 0.05 ^a
Basophils ($10^3/\mu\text{L}$)	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^a
Clinical chemistry			
Urea (mg/dL)	50.5 $\pm$ 3.0 ^b	56.7 $\pm$ 2.5 ^a	51.4 $\pm$ 2.2 ^b
Uric acid (mg/dL)	2.7 $\pm$ 0.5 ^a	1.3 $\pm$ 0.2 ^b	2.4 $\pm$ 0.4 ^a
Total protein (g/dL)	5.7 $\pm$ 0.2 ^a	5.4 $\pm$ 0.3 ^a	5.6 $\pm$ 0.2 ^a
Albumin (g/dL)	4.5 $\pm$ 0.2 ^a	4.3 $\pm$ 0.1 ^a	4.5 $\pm$ 0.2 ^a
Creatinine (mg/dL)	0.6 $\pm$ 0.02 ^b	0.7 $\pm$ 0.03 ^a	0.6 $\pm$ 0.02 ^b
Glucose (mg/dL)	207 $\pm$ 25 ^a	151 $\pm$ 18 ^b	218 $\pm$ 26 ^a
Total bilirubin (mg/dL)	0.5 $\pm$ 0.2 ^a	0.8 $\pm$ 0.2 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^a
Direct bilirubin (mg/dL)	0.1 $\pm$ 0.02 ^b	0.2 $\pm$ 0.03 ^a	0.1 $\pm$ 0.02 ^b
Asp aminotransferase (IU/L)	220 $\pm$ 17 ^b	576 $\pm$ 102 ^a	239 $\pm$ 30 ^b
Ala aminotransferase (IU/L)	9.4 $\pm$ 2.1 ^c	178 $\pm$ 26.4 ^a	36.0 $\pm$ 10.5 ^b
γ -Glutamyl transpeptidase (IU/L)	2.0 $\pm$ 0.5 ^c	14.5 $\pm$ 3.7 ^a	3.5 $\pm$ 0.6 ^b
Alkaline phosphatase (IU/L)	151 $\pm$ 29 ^b	484 $\pm$ 86 ^a	187 $\pm$ 38 ^b
Lactate dehydrogenase (IU/L)	405 $\pm$ 55 ^b	1136 $\pm$ 277 ^a	439 $\pm$ 61 ^b
Sodium (mEq/L)	147 $\pm$ 15 ^a	156 $\pm$ 19 ^a	155 $\pm$ 21 ^a
Potassium (mEq/L)	7.7 $\pm$ 0.7 ^a	7.9 $\pm$ 0.8 ^a	7.5 $\pm$ 0.7 ^a
Chloride (mEq/L)	110 $\pm$ 8 ^a	105 $\pm$ 7 ^a	107 $\pm$ 11 ^a

5. DISCUSIÓN

¿Los EMFs provocan el calentamiento de las células? El mecanismo por el cual el campo magnético oscilante puede causar el calentamiento de un tejido es induciendo corrientes de Foucault en el tejido (201). Estas corrientes giran alrededor de las líneas del campo magnético en el tejido y por el efecto Joule podrían calentar las células tumorales. Un efecto debido a la conductividad, σ , del tejido vivo. Esta conductividad facilita las corrientes de Foucault microscópicas que fluyen de forma circular. La potencia por unidad de masa (P) que puede inducir un aumento de temperatura viene dada por la siguiente ecuación: $P = \pi^2 \cdot B^2 \cdot d^2 \cdot f^2 / (6 \cdot \rho \cdot D)$. Donde B es la densidad de flujo magnético, d es la profundidad del tejido sobre el que se aplica el campo magnético, f es la frecuencia del campo, ρ es la resistividad del tejido (inversa a la conductividad eléctrica) y D es la densidad de masa del tejido (202).

La conductividad del tejido tumoral, debido a las diferencias metabólicas, puede ser hasta cinco veces mayor que la conductividad de los tejidos sanos y tiene un valor aproximado de 0,15 Siemens/m a 100-300 kHz (203). La D del tejido biológico es variable (entre 900-1050 Kg/m³), pero se puede aproximar a la del agua, 1000 Kg/m³ (204). En nuestra configuración experimental, el valor de P es < 20 pW/Kg, un valor muy bajo. Por lo tanto, el mecanismo relacionado con el efecto de los EMFs no puede deberse al calentamiento. El efecto sinérgico con la HT

podría atribuirse, al menos en parte, a un aumento de la conductividad asociado a un aumento de la movilidad de las moléculas cargadas.

Hasta la fecha, los métodos de calentamiento utilizados para el tratamiento del cáncer son a) el calentamiento electromagnético [que, en orden ascendente de frecuencia y descendente en profundidad de penetración incluye a las radiofrecuencias, capacitiva (usando electrodos metálicos y 8-25 MHz) e inductiva (usando antenas extracorporales con frecuencias operativas que van desde 60 MHz a 150 MHz); el calentamiento por microondas (400-2500 MHz), por infrarrojos (usando lámparas infrarrojas, frecuencia >300 GHz) y por láser]; b) los ultrasonidos de alta intensidad y focalizados (HIFU, energía acústica a frecuencias de 0,5 a 10 MHz); c) la perfusión hipertérmica, generalmente combinada con quimioterapia; d) el calentamiento conductivo, como los implantes de agujas metálicas combinadas con agua caliente y termosemillas de paladio-níquel; y e) las nanopartículas magnéticas, expuestas a un campo magnético externo (0,1- 0,2 MHz) (133). Todos estos métodos tienen pros y contras. La metodología HIFU utiliza intensidades $> 5\text{W}/\text{cm}^2$, las cuales producen efectos térmicos y mecánicos, generando un aumento de temperatura tisular focalizada en un punto. La administración de HIFU permite un tratamiento preciso de áreas específicas, donde la lesión del tejido circundante dependerá de la temperatura alcanzada y el tiempo de exposición. En este sentido, dado que la

energía ultrasónica se concentra en un volumen específico de tejido, es clave tener en cuenta que la temperatura disminuirá (en base a un modelo gaussiano) a medida que nos alejemos de ese volumen específico.

Por lo tanto, para minimizar el daño a los tejidos normales, pero preservando la mayor eficacia posible, la combinación de EMFs y HIFU puede ofrecer las siguientes ventajas: a) no se ha demostrado que los EMFs de RF tengan una toxicidad significativa para los tejidos normales; b) el HIFU guiado por resonancia magnética (MRgFUS) puede dirigirse a volúmenes tumorales específicos (tan pequeños como unos pocos mm de diámetro); c) el HIFU se puede aplicar utilizando un programa de matriz rápida (una vez que se localiza el objetivo y se reconstruye el volumen y la forma del tumor en un sistema informático, el programa puede diseñar la aplicación secuencial de HIFU en una serie de puntos específicos, maximizando así eficiencia); d) trabajar con EMFs y HIFU permite limitar el aumento de la temperatura a un nivel que puede preservar mejor los tejidos normales circundantes; e) un diseño holográfico de las unidades transductoras piezoeléctricas HIFU (patente WO2020/084181A1, *Method for producing a lens and ultrasound device comprising the lens*), puede reducir su número y, por lo tanto, simplificar el sistema; f) si es necesario, los EMFs y el HIFU podrían aplicarse varias veces (por ejemplo, una vez al día) para maximizar su eficacia *in vivo*.

Sin embargo, a la hora de determinar el n° de haces de energía necesarios para evitar un aumento excesivo de temperatura en los tejidos sanos (al calentar el cáncer hasta 52°C), deben tenerse en cuenta aspectos esenciales como: a) las propiedades computacionales y las características de propagación de energía; b) la superposición de haces de energía puede causar efectos de calentamiento acumulativos y elevar potencialmente la temperatura más allá del límite deseado; c) la potencia y duración de cada haz individual debe ajustarse para controlar la cantidad de energía liberada en el objetivo y, así, minimizar el calentamiento de los tejidos sanos; d) la monitorización en tiempo real de la temperatura durante el proceso es esencial para asegurar un control adecuado; e) diferentes tejidos tienen conductividad térmica variable, lo cual incide sobre como el calor se disipa a través de ellos; f) la tasa específica de absorción o cantidad de energía absorbida por unidad de masa de tejido y la capacidad de calentar cada órgano y tejido. En nuestro procedimiento, el aplicador HIFU estaba constituido por dos dispositivos ultrasónicos de 60-mm de apertura operando a 1.0 MHz capaces de focalizar del orden de 1 longitud de onda en el agua, en este caso, considerando las interfases que cruzan los haces, estimamos en 5mm el diámetro transversal sobre el que se concentra la potencia ultrasónica, adecuado para calentar el volumen que encierra el tumor. A pesar de esto, debemos esperar un daño inducido por la HT en los tejidos peritumorales adyacentes. Un daño comparable al margen de seguridad de los cirujanos durante

una resección tumoral. Teniendo en cuente la precisión en la orientación de los ultrasonidos, utilizando el sistema robotizado de imagen guiada, del sistema HIFU (205) y los mecanismos fisiológicos de pérdida de calor de los tejidos, la temperatura a pocos mm (menos de 5mm) del objetivo debe disminuir drásticamente.

Según estas consideraciones técnicas, la combinación de EMFs y HIFU se puede implementar fácilmente para transferir nuestros hallazgos a aplicaciones de trabajo *in vivo* (ver figura 10).

Además, tanto los EMFs como el HIFU son técnicas no invasivas que se pueden combinar con otras terapias contra el cáncer (ver la sección de resultados). En este sentido, la presente contribución ofrece algunas opciones potencialmente eficaces. Los EMFs y la HT se pueden combinar con la quimioterapia convencional (figuras 19 y 21). Por otro lado, los EMFs y la HT también se pueden combinar con inductores de la LMP, como el PT o un fármaco específico dirigido contra la Hsp70 (figura 20). En la actualidad, el PT se ha probado en ensayos clínicos para diferentes indicaciones, pero nunca se ha administrado a humanos vía IV. Una novedad interesante es que la administración oral de co-cristales de PT (como los de PT y ácido picolínico), aumenta la biodisponibilidad del PT hasta 10 veces en comparación con la administración del estilbeno natural (206), pudiendo así evitar la necesidad de usar la vía de administración intravenosa. A favor del uso terapéutico del PT está su potencial para disminuir las

defensas antioxidantes dependientes de Nrf2 en las células tumorales. Por otro lado, aunque los ensayos que involucran una terapia dirigida anti-Hsp70 aún están en sus comienzos, recientemente, algunos fármacos lisosomotrópicos contra el cáncer (por ejemplo, nortriptilina, siramesina, desipramina) y sus nanoformulaciones se han diseñado para acumularse específicamente dentro de estos orgánulos. Estos medicamentos pueden mejorar la LMP o interferir con la actividad de las enzimas lisosomales y de complejos proteicos, como v-ATPasa y mTORC1 (207) (se puede encontrar una lista de inductores de muerte celular vía lisosomal (208)).

Con respecto a los mecanismos moleculares implicados, un aumento en la actividad de la catepsinas en el citosol activa la permeabilización de la membrana mitocondrial a través de la escisión de Bid, o mediante la activación de la fosfolipasa A2 y el consiguiente aumento del ácido araquidónico (209). Además, las catepsinas pueden provocar directamente la condensación de la cromatina (210), mientras que la acidificación del citosol también puede provocar la activación de la DNAasa II y la cromatinolisis (211).

Otro aspecto interesante que merece mayor investigación es el posible papel de las HSP mitocondriales en estos mecanismos. La generación de ROS aumenta con la temperatura (Tabla 2) (143). Por lo tanto, es posible que las HSP mitocondriales (y la Hsp70 en particular), además de sus funciones en el transporte y

plegamiento de proteínas, proteja a las proteínas y al ADN mitocondriales del daño térmico y por ROS. Inicialmente, no hay razones que puedan impedir una combinación múltiple como, por ejemplo, EMFs + HT + quimioterapia + un permeabilizador lisosomal, opción factible caso de encontrar una resistencia inesperada de las células cancerosas *in vivo*. En todo ello, los estudios preclínicos y los ensayos clínicos serán pasos necesarios. Naturalmente, no existen restricciones estrictas para combinar EMFs y HT con otras opciones terapéuticas como, por ejemplo, la inmunoterapia o las terapias dirigidas.

También es importante mencionar y tener en cuenta los posibles efectos contraproducentes de algunos estabilizadores lisosomales, como p.e. el ácido acetilsalicílico o la hidrocortisona (212). Este tipo de fármacos deberían evitarse durante el tratamiento del cáncer con nuestra estrategia. A pesar de las diferencias en los antecedentes genéticos y en el comportamiento *in vivo* comparando diferentes células cancerosas, la combinación de EMFs y HT parece afectarlas de manera similar (ver, por ejemplo, la figura 14B) y según el mismo mecanismo (ver, por ejemplo, la Tabla 2 y la figura 17). No obstante, los niveles de Hsp70 son un claro ejemplo de un mecanismo de resistencia a la hipertermia. La Hsp70 inhibe la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, por lo que reduce la activación de las caspasas y neutraliza el AIF (213). Además, la Hsp70 también se localiza en las membranas lisosomales y puede

proteger frente a la LMP inducida por diferentes estímulos (214). Por lo tanto, aunque los eventuales mecanismos de resistencia a los EMFs y HT deben explorarse en profundidad, es alentador el hecho de que ambas energías, si se aplican en los niveles y tiempos correctos, pueden ser altamente efectivas *in vivo*, tal y como se muestra en la figura 21.

En conclusión, nuestro trabajo demuestra que la combinación de EMFs e HT causa un daño irreversible en diferentes células cancerígenas (melanoma, carcinoma de páncreas y carcinoma de mama). El mecanismo implica la permeabilización de los lisosomas, la liberación de catepsinas al citosol y la activación de la muerte celular dependiente de las mitocondrias. La combinación de EMFs e HT con quimioterapia estándar, moléculas que promueven la permeabilización lisosomal y/o terapias dirigidas anti-Hsp70 pueden provocar una muerte completa de las células cancerígenas. Esta estrategia, basada en evidencias *in vivo* e *in vitro*, puede complementar diferentes oncoterapias en uso clínico, y pueden ser aplicadas a diferentes cánceres. La evaluación del estado de salud (siguiendo la metodología estándar del NIH) de los ratones tratados *in vivo* demostró que el tratamiento es seguro y, *per se*, no compromete la salud de los animales.

6. CONCLUSIONES

- La aplicación combinada de EMFs e HT disminuye muy significativamente la viabilidad de las células de melanoma (A2058), carcinoma de páncreas (AsPC1) y carcinoma de mama triple negativo (MDA-MB-231) en los cultivos celulares.
- El mecanismo antitumoral de la terapia implica la permeabilización de los lisosomas, la liberación de catepsinas al citosol y la activación de la muerte celular por apoptosis.
- La combinación EMFs e HT con quimioterapia estándar (paclitaxel o gemcitabina) reduce al 0% la viabilidad de los cultivos celulares a las 24 horas del tratamiento, demostrando el efecto sinérgico de los tratamientos.
- El tratamiento combinado con pterostilbeno redujo la viabilidad al 7.5% (A2058), 32.7% (AsPC1), y 6.7% (MDA-MB-231) de los valores control, pero la combinación con apoptozol (terapia dirigida anti-Hsp70) demostró mejores resultados (viabilidades del 0%, 7.5%, y 0%, respectivamente).
- La eficacia de esta nueva estrategia terapéutica viene respaldada por los resultados obtenidos *in vivo*, donde se consiguió la regresión total de un modelo subcutáneo de cáncer de páncreas (AsPC1) con el tratamiento combinado EMFs+HT+gemcitabina+pterostilbeno. El tratamiento con

EMFs e HT podría combinarse con otras oncoterapias y, si alcanzase la práctica clínica, contribuiría a mejorar el pronóstico en cánceres resistentes a terapias convencionales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* mayo de 2021;71(3):209-49.
2. Dong J, Thrift AP. Alcohol, smoking and risk of oesophago-gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 1 de octubre de 2017;31(5):509-17.
3. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health.* febrero de 2020;8(2):e180-90.
4. Mitrus I, Bryndza E, Sochanik A, Szala S. Evolving models of tumor origin and progression. *Tumor Biol.* 1 de agosto de 2012;33(4):911-7.
5. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo JV, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.* noviembre de 2012;12(11):767-75.
6. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Semin Cancer Biol.* diciembre de 2015;35 Suppl:S244-75.
7. Tellez-Gabriel M, Brown HK, Young R, Heymann MF, Heymann D. The Challenges of Detecting Circulating Tumor Cells in Sarcoma. *Front Oncol.* 2016;6:202.
8. Lytle NK, Barber AG, Reya T. Stem cell fate in cancer growth, progression and therapy resistance. *Nat Rev Cancer.* noviembre de 2018;18(11):669-80.
9. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.* 12 de marzo de 2020;5(1):28.

10. Obrador E, Salvador R, López-Blanch R, Jihad-Jebbar A, Alcácer J, Benlloch M, et al. Melanoma in the liver: Oxidative stress and the mechanisms of metastatic cell survival. *Semin Cancer Biol.* 1 de junio de 2021;71:109-21.
11. Liu YP, Zheng CC, Huang YN, He ML, Xu WW, Li B. Molecular mechanisms of chemo- and radiotherapy resistance and the potential implications for cancer treatment. *MedComm.* septiembre de 2021;2(3):315-40.
12. Fessart D, Robert J. [Mechanisms of cancer drug resistance]. *Bull Cancer (Paris).* enero de 2024;111(1):37-50.
13. Ramos A, Sadeghi S, Tabatabaeian H. Battling Chemoresistance in Cancer: Root Causes and Strategies to Uproot Them. *Int J Mol Sci.* enero de 2021;22(17):9451.
14. Bergman PJ. Cancer Immunotherapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* mayo de 2024;54(3):441-68.
15. Chhabra N, Kennedy J. A Review of Cancer Immunotherapy Toxicity: Immune Checkpoint Inhibitors. *J Med Toxicol Off J Am Coll Med Toxicol.* octubre de 2021;17(4):411-24.
16. Sharma A, Jasrotia S, Kumar A. Effects of Chemotherapy on the Immune System: Implications for Cancer Treatment and Patient Outcomes. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* mayo de 2024;397(5):2551-66.
17. Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. En: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>*
18. Fu Z, Mowday AM, Smaill JB, Hermans IF, Patterson AV. Tumour Hypoxia-Mediated Immunosuppression: Mechanisms and Therapeutic Approaches to Improve Cancer Immunotherapy. *Cells.* 24 de abril de 2021;10(5):1006.
19. Wirsdörfer F, de Leve S, Jendrossek V. Combining Radiotherapy and Immunotherapy in Lung Cancer: Can We Expect Limitations Due to Altered Normal Tissue Toxicity? *Int J Mol Sci.* 21 de diciembre de 2018;20(1):24.

20. Ajani JA, Izzo JG, Lee JS. Chemotherapy and radiotherapy resistance: complexity, reality, and promise. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de enero de 2009;27(1):162-3; author reply 163.
21. Somarelli JA. The Hallmarks of Cancer as Ecologically Driven Phenotypes. *Front Ecol Evol*. abril de 2021;9:661583.
22. Shen Y, Wang P, Li Y, Ye F, Wang F, Wan X, et al. miR-375 is upregulated in acquired paclitaxel resistance in cervical cancer. *Br J Cancer*. 9 de julio de 2013;109(1):92-9.
23. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med*. 15 de abril de 1999;340(15):1144-53.
24. Ramirez Beltran NA. Factores asociados a la radio y quimiorresistencia en cáncer de cuello uterino. 2021;
25. Li L ya, Guan Y di, Chen X sha, Yang J ming, Cheng Y. DNA Repair Pathways in Cancer Therapy and Resistance. *Front Pharmacol*. 8 de febrero de 2021;11:629266.
26. Wang R, Sun Y, Li C, Xue Y, Ba X. Targeting the DNA Damage Response for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2 de noviembre de 2023;24(21):15907.
27. Obata H, Ogawa M, Zalutsky MR. DNA Repair Inhibitors: Potential Targets and Partners for Targeted Radionuclide Therapy. *Pharmaceutics*. 11 de julio de 2023;15(7):1926.
28. Martorana F, Da Silva LA, Sessa C, Colombo I. Everything Comes with a Price: The Toxicity Profile of DNA-Damage Response Targeting Agents. *Cancers*. 14 de febrero de 2022;14(4):953.
29. Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Future Oncol Lond Engl*. mayo de 2014;10(7):1215-37.
30. Iksen null, Witayateeraporn W, Hardianti B, Pongrakhananon V. Comprehensive review of Bcl-2 family proteins in cancer apoptosis: Therapeutic strategies and

- promising updates of natural bioactive compounds and small molecules. *Phytother Res PTR*. mayo de 2024;38(5):2249-75.
31. Kaloni D, Diepstraten ST, Strasser A, Kelly GL. BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. febrero de 2023;28(1-2):20-38.
 32. Lee DH, Ha JH, Kim Y, Jang M, Park SJ, Yoon HS, et al. A conserved mechanism for binding of p53 DNA-binding domain and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *Mol Cells*. marzo de 2014;37(3):264-9.
 33. Qian S, Wei Z, Yang W, Huang J, Yang Y, Wang J. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol*. 12 de octubre de 2022;12:985363.
 34. Maji S, Panda S, Samal SK, Shriwas O, Rath R, Pellicchia M, et al. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Adv Cancer Res*. 2018;137:37-75.
 35. Lin XL, Zheng ZY, Zhang QS, Zhang Z, An YZ. Expression of miR-195 and its target gene Bcl-2 in human intervertebral disc degeneration and their effects on nucleus pulposus cell apoptosis. *J Orthop Surg*. 28 de junio de 2021;16(1):412.
 36. Makino K, Nakamura H, Shinojima N, Kuroda JI, Yano S, Mikami Y, et al. BCL2 expression is associated with a poor prognosis independent of cellular origin in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *J Neurooncol*. octubre de 2018;140(1):115-21.
 37. Bcl-xL expression and regulation in the progression, recurrence, and cisplatin resistance of oral cancer - PubMed [Internet]. [citado 6 de junio de 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111459/>
 38. Li X xi, Zhou J dong, Wen X mei, Zhang T juan, Wu D hong, Deng Z qun, et al. Increased MCL-1 expression predicts poor prognosis and disease recurrence in acute myeloid leukemia. *OncoTargets Ther*. 1 de mayo de 2019;12:3295-304.

39. Sies H. Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis. *Redox Biol.* mayo de 2021;41:101867.
40. Schumacker PT. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.* septiembre de 2006;10(3):175-6.
41. Li K, Deng Z, Lei C, Ding X, Li J, Wang C. The Role of Oxidative Stress in Tumorigenesis and Progression. *Cells.* 2 de marzo de 2024;13(5):441.
42. Luu Hoang KN, Anstee JE, Arnold JN. The Diverse Roles of Heme Oxygenase-1 in Tumor Progression. *Front Immunol.* 2021;12:658315.
43. Silva MM, Rocha CRR, Kinker GS, Pelegri AL, Menck CFM. The balance between NRF2/GSH antioxidant mediated pathway and DNA repair modulates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Sci Rep.* 27 de noviembre de 2019;9(1):17639.
44. Jyotsana N, Ta KT, DelGiorno KE. The Role of Cystine/Glutamate Antiporter SLC7A11/xCT in the Pathophysiology of Cancer. *Front Oncol.* 2022;12:858462.
45. Liu J, Xia X, Huang P. xCT: A Critical Molecule That Links Cancer Metabolism to Redox Signaling. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 4 de noviembre de 2020;28(11):2358-66.
46. Raghunath A, Sundarraj K, Arfuso F, Sethi G, Perumal E. Dysregulation of Nrf2 in Hepatocellular Carcinoma: Role in Cancer Progression and Chemoresistance. *Cancers.* 3 de diciembre de 2018;10(12):481.
47. Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2-induced antiapoptotic Bcl-xL protein enhances cell survival and drug resistance. *Free Radic Biol Med.* abril de 2013;57:119-31.
48. Qin JJ, Cheng XD, Zhang J, Zhang WD. Dual roles and therapeutic potential of Keap1-Nrf2 pathway in pancreatic cancer: a systematic review. *Cell Commun Signal CCS.* 11 de septiembre de 2019;17(1):121.

49. Zhou Y, Zhou Y, Yang M, Wang K, Liu Y, Zhang M, et al. Digoxin sensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine via inhibiting Nrf2 signaling pathway. *Redox Biol.* abril de 2019;22:101131.
50. Pirpour Tazehkand A, Akbarzadeh M, Velaie K, Sadeghi MR, Samadi N. The role of Her2-Nrf2 axis in induction of oxaliplatin resistance in colon cancer cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* julio de 2018;103:755-66.
51. Nelson WG, De Marzo AM, Yegnasubramanian S. USP2a activation of MYC in prostate cancer. *Cancer Discov.* marzo de 2012;2(3):206-7.
52. Hayden A, Douglas J, Sommerlad M, Andrews L, Gould K, Hussain S, et al. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin in bladder cancer. *Urol Oncol.* agosto de 2014;32(6):806-14.
53. Daga M, Pizzimenti S, Dianzani C, Cucci MA, Cavalli R, Grattarola M, et al. Ailanthone inhibits cell growth and migration of cisplatin resistant bladder cancer cells through down-regulation of Nrf2, YAP, and c-Myc expression. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 15 de marzo de 2019;56:156-64.
54. Cucci MA, Grattarola M, Dianzani C, Damia G, Ricci F, Roetto A, et al. Ailanthone increases oxidative stress in CDDP-resistant ovarian and bladder cancer cells by inhibiting of Nrf2 and YAP expression through a post-translational mechanism. *Free Radic Biol Med.* abril de 2020;150:125-35.
55. Ambrosio L, Argenziano M, Cucci MA, Grattarola M, de Graaf IAM, Dianzani C, et al. Carbosilane Dendrimers Loaded with siRNA Targeting Nrf2 as a Tool to Overcome Cisplatin Chemoresistance in Bladder Cancer Cells. *Antioxid Basel Switz.* 14 de octubre de 2020;9(10):993.
56. Rocha CRR, Kajitani GS, Quinet A, Fortunato RS, Menck CFM. NRF2 and glutathione are key resistance mediators to

- temozolomide in glioma and melanoma cells. *Oncotarget*. 26 de julio de 2016;7(30):48081-92.
57. Yu L, Gao LX, Ma XQ, Hu FX, Li CM, Lu Z. Involvement of superoxide and nitric oxide in BRAF(V600E) inhibitor PLX4032-induced growth inhibition of melanoma cells. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro*. diciembre de 2014;6(12):1211-7.
 58. Yu X, Wang Y, Tan J, Li Y, Yang P, Liu X, et al. Inhibition of NRF2 enhances the acute myeloid leukemia cell death induced by venetoclax via the ferroptosis pathway. *Cell Death Discov*. 18 de enero de 2024;10(1):35.
 59. Zhang J, Xu HX, Zhu JQ, Dou YX, Xian YF, Lin ZX. Natural Nrf2 Inhibitors: A Review of Their Potential for Cancer Treatment. *Int J Biol Sci*. 2023;19(10):3029-41.
 60. Romani AMP. Cisplatin in cancer treatment. *Biochem Pharmacol*. diciembre de 2022;206:115323.
 61. Barrera G, Cucci MA, Grattarola M, Dianzani C, Muzio G, Pizzimenti S. Control of Oxidative Stress in Cancer Chemoresistance: Spotlight on Nrf2 Role. *Antioxidants* [Internet]. abril de 2021 [citado 7 de marzo de 2024];10(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8064392/>
 62. Bekhet OH, Eid ME. The interplay between reactive oxygen species and antioxidants in cancer progression and therapy: a narrative review. *Transl Cancer Res*. septiembre de 2021;10(9):4196-206.
 63. Luo M, Zhou L, Huang Z, Li B, Nice EC, Xu J, et al. Antioxidant Therapy in Cancer: Rationale and Progress. *Antioxidants*. 8 de junio de 2022;11(6):1128.
 64. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. 1 de marzo de 2020;41(1):1-24.
 65. Feng L, Gao J, Xia W, Li Y, Lowe S, Yau V, et al. Association of sugar-sweetened beverages with the risk of

- colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Nutr.* octubre de 2023;77(10):941-52.
66. Anwanwan D, Singh SK, Singh S, Saikam V, Singh R. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* enero de 2020;1873(1):188314.
 67. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2009;472:467-77.
 68. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-63.
 69. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017;13(11):1387-97.
 70. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet.* 2019 Sep 28;394(10204):1159-1168. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31709-X.
 71. White ND. Hormonal Contraception and Breast Cancer Risk. *Am J Lifestyle Med.* 31 de enero de 2018;12(3):224-6.
 72. Libson S, Lippman M. A review of clinical aspects of breast cancer. *Int Rev Psychiatry Abingdon Engl.* febrero de 2014;26(1):4-15.
 73. Shokoohi M, Sedaghatshoar S, Arian H, Mokarami M, Habibi F, Bamarinejad F. Genetic advancements in breast cancer treatment: a review. *Discov Oncol.* 7 de febrero de 2025;16(1):127.
 74. Catherine Sánchez N. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Rev Médica Clínica Las Condes.* 1 de julio de 2013;24(4):553-62.

75. Wheeler HE, Maitland ML, Dolan ME, Cox NJ, Ratain MJ. Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. *Nat Rev Genet.* enero de 2013;14(1):23-34.
76. Loeb LA. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nat Rev Cancer.* junio de 2011;11(6):450-7.
77. Spath E, Schlager J. On the constituents of «Red Sandalwood» [*Pterocarpus santalinus*]. 2: The constitution of pterostilbene. *Ber Dtsch Chem Gesellsch.* 1940;73:881-4.
78. Tsai HY, Ho CT, Chen YK. Biological actions and molecular effects of resveratrol, pterostilbene, and 3'-hydroxypterostilbene. *J Food Drug Anal.* 1 de enero de 2017;25(1):134-47.
79. Schmidlin L, Poutaraud A, Claudel P, Mestre P, Prado E, Santos-Rosa M, et al. A Stress-Inducible Resveratrol O-Methyltransferase Involved in the Biosynthesis of Pterostilbene in Grapevine. *Plant Physiol.* noviembre de 2008;148(3):1630-9.
80. Chong J, Poutaraud A, Hugueney P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* 1 de septiembre de 2009;177(3):143-55.
81. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 17 de enero de 2011;50(3):586-621.
82. Estrela JM, Ortega A, Mena S, Rodriguez ML, Asensi M. Pterostilbene: Biomedical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2013;50(3):65-78.
83. Liu Y, You Y, Lu J, Chen X, Yang Z. Recent Advances in Synthesis, Bioactivity, and Pharmacokinetics of Pterostilbene, an Important Analog of Resveratrol. *Mol Basel Switz.* 6 de noviembre de 2020;25(21):5166.
84. Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 1 de febrero de 1991;51(3):794-8.

85. Obrador E, Salvador-Palmer R, Jihad-Jebbar A, López-Blanch R, Dellinger TH, Dellinger RW, et al. Pterostilbene in Cancer Therapy. *Antioxid Basel Switz.* 21 de marzo de 2021;10(3):492.
86. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. *J Cancer Res Ther.* 2021;17(1):22-8.
87. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med.* marzo de 2017;104:144-64.
88. Ortega AL, Mena S, Estrela JM. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers.* 26 de marzo de 2010;2(2):274-304.
89. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2016;81:163-75.
90. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* agosto de 2018;80:50-64.
91. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* diciembre de 2013;12(12):931-47.
92. Mitra T, Bhattacharya R. Phytochemicals modulate cancer aggressiveness: A review depicting the anticancer efficacy of dietary polyphenols and their combinations. *J Cell Physiol.* noviembre de 2020;235(11):7696-708.
93. Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2011;48(5-6):197-216.
94. Khalil MI, Agamy AF, Elshewemi SS, Sultan AS, Abdelmeguid NE. Pterostilbene induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells: Biochemical, pathological, and molecular markers. *Saudi J Biol Sci.* agosto de 2023;30(8):103717.

95. Chen RJ, Ho CT, Wang YJ. Pterostilbene induces autophagy and apoptosis in sensitive and chemoresistant human bladder cancer cells. *Mol Nutr Food Res.* diciembre de 2010;54(12):1819-32.
96. Wang Y, Ding L, Wang X, Zhang J, Han W, Feng L, et al. Pterostilbene simultaneously induces apoptosis, cell cycle arrest and cyto-protective autophagy in breast cancer cells. *Am J Transl Res.* 2012;4(1):44-51.
97. Lee PS, Chiou YS, Ho CT, Pan MH. Chemoprevention by resveratrol and pterostilbene: Targeting on epigenetic regulation. *BioFactors Oxf Engl.* enero de 2018;44(1):26-35.
98. McCormack D, McFadden D. Pterostilbene and cancer: current review. *J Surg Res.* abril de 2012;173(2):e53-61.
99. Surien O, Masre SF, Basri DF, Ghazali AR. Chemopreventive Effects of Oral Pterostilbene in Multistage Carcinogenesis of Skin Squamous Cell Carcinoma Mouse Model Induced by DMBA/TPA. *Biomedicines.* 28 de octubre de 2022;10(11):2743.
100. Surien O, Ghazali AR, Masre SF. Histopathological effect of pterostilbene as chemoprevention in N-nitroso-trichloroethylurea (NTCU)-induced lung squamous cell carcinoma (SCC) mouse model. *Histol Histopathol.* octubre de 2020;35(10):1159-70.
101. Pinto R, Ardoino L, Villani P, Marino C. In Vivo Studies on Radiofrequency (100 kHz-300 GHz) Electromagnetic Field Exposure and Cancer: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health.* 23 de enero de 2023;20(3):2071.
102. Gurney JG, van Wijngaarden E. Extremely low frequency electromagnetic fields (EMF) and brain cancer in adults and children: review and comment. *Neuro-Oncol.* julio de 1999;1(3):212-20.
103. Hardell L, Moskowitz JM. A critical analysis of the MOBI-Kids study of wireless phone use in childhood and adolescence and brain tumor risk. *Rev Environ Health.* 26 de septiembre de 2023;38(3):409-21.

104. Maffei ME. Magnetic Fields and Cancer: Epidemiology, Cellular Biology, and Theranostics. *Int J Mol Sci.* 25 de enero de 2022;23(3):1339.
105. Naarala J, Höytö A, Markkanen A. Cellular effects of electromagnetic fields. *Altern Lab Anim ATLA.* octubre de 2004;32(4):355-60.
106. Lai H, Levitt BB. Cellular and molecular effects of non-ionizing electromagnetic fields. *Rev Environ Health.* 7 de abril de 2023;
107. Saliev T, Begimbetova D, Masoud AR, Matkarimov B. Biological effects of non-ionizing electromagnetic fields: Two sides of a coin. *Prog Biophys Mol Biol.* enero de 2019;141:25-36.
108. Wust P, Stein U, Ghadjar P. Non-thermal membrane effects of electromagnetic fields and therapeutic applications in oncology. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group.* 2021;38(1):715-31.
109. Sun G, Li J, Zhou W, Hoyle RG, Zhao Y. Electromagnetic interactions in regulations of cell behaviors and morphogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:1014030.
110. Alipour M, Hajipour-Verdom B, Javan M, Abdolmaleki P. Static and Electromagnetic Fields Differently Affect Proliferation and Cell Death Through Acid Enhancement of ROS Generation in Mesenchymal Stem Cells. *Radiat Res.* 1 de octubre de 2022;198(4):384-95.
111. Rain BD, Plourde-Kelly AD, Lafrenie RM, Dotta BT. Induction of apoptosis in B16-BL6 melanoma cells following exposure to electromagnetic fields modeled after intercellular calcium waves. *FEBS Open Bio.* marzo de 2024;14(3):515-24.
112. Lai H. Genetic effects of non-ionizing electromagnetic fields. *Electromagn Biol Med.* 3 de abril de 2021;40(2):264-73.
113. Palumbo R, Capasso D, Brescia F, Mita P, Sarti M, Bersani F, et al. Effects on apoptosis and reactive oxygen species

- formation by Jurkat cells exposed to 50 Hz electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*. febrero de 2006;27(2):159-62.
114. Girgert R, Hanf V, Emons G, Gründker C. Signal transduction of the melatonin receptor MT1 is disrupted in breast cancer cells by electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*. abril de 2010;31(3):237-45.
 115. Hong P, Kudulaiti N, Wu S, Nie J, Zhuang D. Tumor treating fields: a comprehensive overview of the underlying molecular mechanism. *Expert Rev Mol Diagn*. enero de 2022;22(1):19-28.
 116. Wenger C, Miranda PC, Salvador R, Thielscher A, Bomzon Z, Giladi M, et al. A Review on Tumor-Treating Fields (TTFields): Clinical Implications Inferred From Computational Modeling. *IEEE Rev Biomed Eng*. 2018;11:195-207.
 117. Krenacs T, Meggyeshazi N, Forika G, Kiss E, Hamar P, Szekeley T, et al. Modulated Electro-Hyperthermia-Induced Tumor Damage Mechanisms Revealed in Cancer Models. *Int J Mol Sci*. 29 de agosto de 2020;21(17):6270.
 118. Chang F, Minc N. Electrochemical control of cell and tissue polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:317-36.
 119. Arvind R, Chandana SR, Borad MJ, Pennington D, Mody K, Babiker H. Tumor-Treating Fields: A fourth modality in cancer treatment, new practice updates. *Crit Rev Oncol Hematol*. diciembre de 2021;168:103535.
 120. Tanzhu G, Chen L, Xiao G, Shi W, Peng H, Chen D, et al. The schemes, mechanisms and molecular pathway changes of Tumor Treating Fields (TTFields) alone or in combination with radiotherapy and chemotherapy. *Cell Death Discov*. 11 de octubre de 2022;8:416.
 121. Lan Y, Zhang S, Pan Y, Wang M, Chen G. Research Progress on the Mechanism of Anti-Tumor Immune Response Induced by TTFields. *Cancers*. 29 de noviembre de 2023;15(23):5642.

- 122.Kutuk T, Atak E, La Rosa A, Kotecha R, Mehta MP, Chuong MD. Tumor treating fields: narrative review of a promising treatment modality for cancer. *Chin Clin Oncol*. diciembre de 2023;12(6):64.
- 123.Vergote I, Macarulla T, Hirsch FR, Hagemann C, Miller DS. Tumor Treating Fields (TTFields) Therapy Concomitant with Taxanes for Cancer Treatment. *Cancers*. 19 de enero de 2023;15(3):636.
- 124.Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions | *British Journal of Cancer* [Internet]. [citado 4 de noviembre de 2024]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41416-020-01136-5>
- 125.Christensen DA, Durney CH. Hyperthermia production for cancer therapy: a review of fundamentals and methods. *J Microw Power*. junio de 1981;16(2):89-105.
- 126.Rao W, Deng ZS, Liu J. A review of hyperthermia combined with radiotherapy/chemotherapy on malignant tumors. *Crit Rev Biomed Eng*. 2010;38(1):101-16.
- 127.Molaei MJ. Magnetic hyperthermia in cancer therapy, mechanisms, and recent advances: A review. *J Biomater Appl*. 12 de abril de 2024;8853282241244707.
- 128.Lee SY, Fiorentini G, Szasz AM, Szigeti G, Szasz A, Minnaar CA. Quo Vadis Oncological Hyperthermia (2020)? *Front Oncol*. 2020;10:1690.
- 129.Ahmed MB, Alghamdi AAA, Islam SU, Ahsan H, Lee YS. The Complex Roles of DNA Repair Pathways, Inhibitors, Hyperthermia, and Contact Inhibition in Cell Cycle Halts. *Mini Rev Med Chem*. 2023;23(5):514-29.
- 130.Pan J, Xu Y, Wu Q, Hu P, Shi J. Mild Magnetic Hyperthermia-Activated Innate Immunity for Liver Cancer Therapy. *J Am Chem Soc*. 2 de junio de 2021;143(21):8116-28.
- 131.Feddersen TV, Hernandez-Tamames JA, Franckena M, van Rhoon GC, Paulides MM. Clinical Performance and Future

- Potential of Magnetic Resonance Thermometry in Hyperthermia. *Cancers*. 24 de diciembre de 2020;13(1):31.
- 132.Kaur T, Sharma D. Expansion of thermometry in magnetic hyperthermia cancer therapy: antecedence and aftermath. *Nanomed*. septiembre de 2022;17(21):1607-23.
 - 133.Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, Brace CL, Ivkov R, Grüll H, et al. Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group*. 2020;37(1):711-41.
 - 134.Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. noviembre de 2015;20(11):1411-9.
 - 135.Adnan A, Muñoz NM, Prakash P, Habibollahi P, Cressman ENK, Sheth RA. Hyperthermia and Tumor Immunity. *Cancers*. 21 de mayo de 2021;13(11):2507.
 - 136.Mei X, Ten Cate R, van Leeuwen CM, Rodermond HM, de Leeuw L, Dimitrakopoulou D, et al. Radiosensitization by Hyperthermia: The Effects of Temperature, Sequence, and Time Interval in Cervical Cell Lines. *Cancers*. 3 de marzo de 2020;12(3):582.
 - 137.Kwon S, Jung S, Baek SH. Combination Therapy of Radiation and Hyperthermia, Focusing on the Synergistic Anti-Cancer Effects and Research Trends. *Antioxid Basel Switz*. 13 de abril de 2023;12(4):924.
 - 138.Roti Roti JL. Cellular responses to hyperthermia (40-46 degrees C): cell killing and molecular events. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group*. febrero de 2008;24(1):3-15.
 - 139.Kondo T, Qing-Li Z, Mizukami T, Saitoh JI. Hyperthermia-induced Cell Death. *Therm Med*. 2021;37(3):63-77.
 - 140.Klostergaard J, Leroux ME, Auzenne E, Khodadadian M, Spohn W, Wu JY, et al. Hyperthermia engages the intrinsic apoptotic pathway by enhancing upstream caspase activation to overcome apoptotic resistance in MCF-7 breast

- adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem.* 15 de mayo de 2006;98(2):356-69.
- 141.Ostberg JR, Repasky EA. Comparison of the effects of two different whole body hyperthermia protocols on the distribution of murine leukocyte populations. *Int J Hyperthermia.* 1 de enero de 2000;16(1):29-43.
 - 142.Moulin M, Carpentier S, Levade T, Arrigo AP. Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* septiembre de 2007;12(9):1703-20.
 - 143.Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group.* noviembre de 2014;30(7):513-23.
 - 144.Yang Y, Huangfu L, Li H, Yang D. Research progress of hyperthermia in tumor therapy by influencing metabolic reprogramming of tumor cells. *Int J Hyperthermia.* 31 de diciembre de 2023;40(1):2270654.
 - 145.Yang Y, Huangfu L, Li H, Yang D. Research progress of hyperthermia in tumor therapy by influencing metabolic reprogramming of tumor cells. *Int J Hyperthermia.* 31 de diciembre de 2023;40(1):2270654.
 - 146.Kapiszewska M, Hopwood LE. Mechanisms of membrane damage for CHO cells heated in suspension. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1988;114(1):23-9.
 - 147.Giorgi C, Baldassari F, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Marchi S, et al. Mitochondrial Ca²⁺ and apoptosis. *Cell Calcium.* 1 de julio de 2012;52(1):36-43.
 - 148.Pawlik A, Nowak JM, Grzanka D, Gackowska L, Michalkiewicz J, Grzanka A. Hyperthermia induces cytoskeletal alterations and mitotic catastrophe in p53-deficient H1299 lung cancer cells. *Acta Histochem.* enero de 2013;115(1):8-15.

149. Sukovas A, Silkuniene G, Trumbeckaite S, Jasukaitiene A, Degutyte-Fomins L, Mildaziene V, et al. Hyperthermia potentiates cisplatin cytotoxicity and negative effects on mitochondrial functions in OVCAR-3 cells. *J Bioenerg Biomembr.* agosto de 2019;51(4):301-10.
150. Trumbeckaite S, Cesna V, Jasukaitiene A, Baniene R, Gulbinas A. Different mitochondrial response to cisplatin and hyperthermia treatment in human AGS, Caco-2 and T3M4 cancer cell lines. *J Bioenerg Biomembr.* octubre de 2018;50(5):329-38.
151. Salvador D, Bastos V, Oliveira H. Hyperthermia Enhances Doxorubicin Therapeutic Efficacy against A375 and MNT-1 Melanoma Cells. *Int J Mol Sci.* 21 de diciembre de 2021;23(1):35.
152. Wang Q, Zhang H, Ren Q qian, Ye T he, Liu Y ming, Zheng C sheng, et al. Sublethal hyperthermia enhances anticancer activity of doxorubicin in chronically hypoxic HepG2 cells through ROS-dependent mechanism. *Biosci Rep.* 11 de junio de 2021;41(6):BSR20210442.
153. Le Guevelou J, Chirila ME, Achard V, Guillemin PC, Lorton O, Uiterwijk JWE, et al. Combined hyperthermia and radiotherapy for prostate cancer: a systematic review. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group.* 2022;39(1):547-56.
154. Deger S, Böhmer D, Roigas J, Türk I, Budach V, Loening SA. Interstitial hyperthermia using thermoseeds in combination with conformal radiotherapy for localized prostate cancer. *Front Radiat Ther Oncol.* 2002;36:171-6.
155. Hu Y, Li Z, Mi DH, Cao N, Zu SW, Wen ZZ, et al. Chemoradiation combined with regional hyperthermia for advanced oesophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pharm Ther.* abril de 2017;42(2):155-64.
156. Sengedorj A, Hader M, Frey B, Fietkau R, Ott OJ, Gaip US, et al. Interaction of Radiotherapy and Hyperthermia with the

- Immune System: a Brief Current Overview. *Curr Stem Cell Rep.* 1 de septiembre de 2022;8(3):129-38.
157. Scheidegger S, Mingo Barba S, Gaip US. Theoretical Evaluation of the Impact of Hyperthermia in Combination with Radiation Therapy in an Artificial Immune—Tumor-Ecosystem. *Cancers.* 17 de noviembre de 2021;13(22):5764.
 158. Kobayashi S, Ohki A, Tanoue M, Inaoka Y, Murase K. Comparative Study of Extracellular and Intracellular Magnetic Hyperthermia Treatments Using Magnetic Particle Imaging. *Open J Appl Sci.* 8 de diciembre de 2017;7(12):647-60.
 159. Das P, Colombo M, Prosperi D. Recent advances in magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de febrero de 2019;174:42-55.
 160. Silva PL, Savchuk OA, Gallo J, García-Hevia L, Bañobre-López M, Nieder JB. Mapping intracellular thermal response of cancer cells to magnetic hyperthermia treatment. *Nanoscale.* 5 de noviembre de 2020;12(42):21647-56.
 161. Prachee I, Wu F, Cranston D. Oxford's clinical experience in the development of high intensity focused ultrasound therapy. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group.* septiembre de 2021;38(2):81-8.
 162. Jenne JW, Preusser T, Günther M. High-intensity focused ultrasound: principles, therapy guidance, simulations and applications. *Z Med Phys.* diciembre de 2012;22(4):311-22.
 163. JDMS November/December 2016 Podcast: Using High-Intensity Focused Ultrasound as a Means to Provide Targeted Drug Delivery [Internet]. [citado 6 de junio de 2024]. Disponible en: https://html5-player.libsyn.com/embed/episode/id/5130638/height/27/width/200/theme/standard-mini/autonext/no/thumbnail/yes/autoplay/no/preload/no/no_addthis/no/direction/backward/no-cache/true/
 164. Bachu VS, Kedda J, Suk I, Green JJ, Tyler B. High-Intensity Focused Ultrasound: A Review of Mechanisms and Clinical

Applications. Ann Biomed Eng. septiembre de 2021;49(9):1975-91.

165. Bakavicius A, Marra G, Macek P, Robertson C, Abreu AL, George AK, et al. Available evidence on HIFU for focal treatment of prostate cancer: a systematic review. *Int Braz J Urol Off J Braz Soc Urol*. 2022;48(2):263-74.
166. Contini M, Hollander MHJ, Vissink A, Schepers RH, Jansma J, Schortinghuis J. A Systematic Review of the Efficacy of Microfocused Ultrasound for Facial Skin Tightening. *Int J Environ Res Public Health*. 13 de enero de 2023;20(2):1522.
167. Izadifar Z, Izadifar Z, Chapman D, Babyn P. An Introduction to High Intensity Focused Ultrasound: Systematic Review on Principles, Devices, and Clinical Applications. *J Clin Med*. 7 de febrero de 2020;9(2):460.
168. Stratton JA. *Electromagnetic Theory*. John Wiley & Sons; 2007. 642 p.
169. Valdivia AEO, Osornio CM, Vargas-Rodríguez YM. PBL with the Application of Multiple and Nonlinear Linear Regression in Chemical Kinetics and Catalysis. *Am J Educ Res*. 25 de enero de 2021;9(1):31-7.
170. Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Itoh Y, Hasegawa J, Yamabe K, et al. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-XL. *Cancer Res*. 1 de mayo de 1996;56(9):2161-6.
171. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 7 de mayo de 1976;72:248-54.
172. Scarlett JL, Sheard PW, Hughes G, Ledgerwood EC, Ku HH, Murphy MP. Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporine-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett*. 23 de junio de 2000;475(3):267-72.
173. James AM, Wei YH, Pang CY, Murphy MP. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or

- MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J.* 1 de septiembre de 1996;318 (Pt 2)(Pt 2):401-7.
- 174.López-Blanch R, Salvador-Palmer R, Estrela JM, Obrador E. An Intercellular Flow of Glutathione Regulated by Interleukin 6 Links Astrocytes and the Liver in the Pathophysiology of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Antioxid Basel Switz.* 16 de diciembre de 2021;10(12):2007.
 - 175.Obrador E, Navarro J, Mompo J, Asensi M, Pellicer JA, Estrela JM. Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo. *Biochem J.* 1 de julio de 1997;325 (Pt 1)(Pt 1):183-9.
 - 176.Ford SR, Chenault KH, Bunton LS, Hampton GJ, McCarthy J, Hall MS, et al. Use of firefly luciferase for ATP measurement: other nucleotides enhance turnover. *J Biolumin Chemilumin.* 1996;11(3):149-67.
 - 177.Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM, Viña J. Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 1994;234:367-71.
 - 178.Zhu Q, Xu YM, Wang LF, Zhang Y, Wang F, Zhao J, et al. Heat shock protein 70 silencing enhances apoptosis inducing factor-mediated cell death in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cancer Biol Ther.* mayo de 2009;8(9):792-8.
 - 179.Park EJ, Ahn YD, Lee JY. In vivo study of enhanced chemotherapy combined with ultrasound image-guided focused ultrasound (USgFUS) treatment for pancreatic cancer in a xenograft mouse model. *Eur Radiol.* septiembre de 2018;28(9):3710-8.
 - 180.Guide to NCL In Vivo Studies: Efficacy, Pharmacokinetics & Toxicology. En: National Cancer Institute's Nanotechnology Characterization Laboratory Assay Cascade Protocols [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2005 [citado 17 de julio de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604930/>

181. Benlloch M, Obrador E, Valles SL, Rodriguez ML, Sirerol JA, Alcácer J, et al. Pterostilbene Decreases the Antioxidant Defenses of Aggressive Cancer Cells In Vivo: A Physiological Glucocorticoids- and Nrf2-Dependent Mechanism. *Antioxid Redox Signal*. 10 de junio de 2016;24(17):974-90.
182. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 10 de agosto de 2020;38(2):167-97.
183. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. mayo de 2000;6(5):513-9.
184. Lepock JR. How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group*. diciembre de 2005;21(8):681-7.
185. Oh HJ, Chen X, Subjeck JR. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem*. 12 de diciembre de 1997;272(50):31636-40.
186. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(2):86-103.
187. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, Fehrenbacher N, Lademann U, Høyer-Hansen M, et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med*. 16 de agosto de 2004;200(4):425-35.
188. Calvaresi V, Truelsen LT, Larsen SB, Petersen NHT, Kirkegaard T, Rand KD. Conformational dynamics of free and membrane-bound human Hsp70 in model cytosolic and endo-lysosomal environments. *Commun Biol*. 7 de diciembre de 2021;4(1):1369.
189. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 27 de octubre de 2008;27(50):6434-51.

- 190.Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cysteine cathepsins: signaling pathways in apoptosis. *Biol Chem.* junio de 2007;388(6):555-60.
- 191.Specenier P. Efficacy of nab-paclitaxel in treating metastatic melanoma. *Expert Opin Pharmacother.* abril de 2019;20(5):495-500.
- 192.Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules.* 27 de noviembre de 2019;9(12):789.
- 193.Sarvepalli D, Rashid MU, Rahman AU, Ullah W, Hussain I, Hasan B, et al. Gemcitabine: A Review of Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Crit Rev Oncog.* 2019;24(2):199-212.
- 194.Sharifi-Rad J, Quispe C, Patra JK, Singh YD, Panda MK, Das G, et al. Paclitaxel: Application in Modern Oncology and Nanomedicine-Based Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:3687700.
- 195.Toschi L, Finocchiaro G, Bartolini S, Gioia V, Cappuzzo F. Role of gemcitabine in cancer therapy. *Future Oncol Lond Engl.* febrero de 2005;1(1):7-17.
- 196.Ciccolini J, Serdjabi C, Peters GJ, Giovannetti E. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemother Pharmacol.* julio de 2016;78(1):1-12.
- 197.Mena S, Rodríguez ML, Ponsoda X, Estrela JM, Jäättelä M, Ortega AL. Pterostilbene-induced tumor cytotoxicity: a lysosomal membrane permeabilization-dependent mechanism. *PloS One.* 2012;7(9):e44524.
- 198.Priego S, Feddi F, Ferrer P, Mena S, Benlloch M, Ortega A, et al. Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. *Mol Cancer Ther.* octubre de 2008;7(10):3330-42.

- 199.Ko SK, Kim J, Na DC, Park S, Park SH, Hyun JY, et al. A small molecule inhibitor of ATPase activity of HSP70 induces apoptosis and has antitumor activities. *Chem Biol.* 19 de marzo de 2015;22(3):391-403.
- 200.Awasthi N, Zhang C, Schwarz AM, Hinz S, Wang C, Williams NS, et al. Comparative benefits of Nab-paclitaxel over gemcitabine or polysorbate-based docetaxel in experimental pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* octubre de 2013;34(10):2361-9.
- 201.Aguiar PM, Jacquinet JF, Sakellariou D. Experimental and numerical examination of eddy (Foucault) currents in rotating micro-coils: Generation of heat and its impact on sample temperature. *J Magn Reson San Diego Calif* 1997. septiembre de 2009;200(1):6-14.
- 202.J. Peters M. Estimation of the electrical conductivity of human tissue. *Electromagnetics.* 2001;21(7-8):545-57.
- 203.Miklavčič D, Pavšelj N, Hart FX. Electric properties of tissues. *Wiley Encycl Biomed Eng.* 2006;
- 204.Miller WH, Hartmann-Siantar C, Fisher D, Descalle MA, Daly T, Lehmann J, et al. Evaluation of beta-absorbed fractions in a mouse model for ⁹⁰Y, ¹⁸⁸Re, ¹⁶⁶Ho, ¹⁴⁹Pm, ⁶⁴Cu, and ¹⁷⁷Lu radionuclides. *Cancer Biother Radiopharm.* agosto de 2005;20(4):436-49.
- 205.Fura Ł, Dera W, Dziekoński C, Świątkiewicz M, Kujawska T. Experimental evaluation of targeting accuracy of ultrasound imaging-guided robotic HIFU ablative system for the treatment of solid tumors in pre-clinical studies. *Appl Acoust.* 15 de diciembre de 2021;184:108367.
- 206.A Novel, Extremely Bioavailable Cocrystal of Pterostilbene | Crystal Growth & Design [Internet]. [citado 21 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.cgd.0c01716>
- 207.Allemailm KS, Almatroudi A, Alrumaihi F, Almatroodi SA, Alkurbi MO, Basfar GT, et al. Novel Approaches of Dysregulating Lysosome Functions in Cancer Cells by

- Specific Drugs and Its Nanoformulations: A Smart Approach of Modern Therapeutics. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:5065-98.
- 208.Domagala A, Fidyt K, Bobrowicz M, Stachura J, Szczygiel K, Firczuk M. Typical and Atypical Inducers of Lysosomal Cell Death: A Promising Anticancer Strategy. *Int J Mol Sci*. 1 de agosto de 2018;19(8):2256.
 - 209.Jäättelä M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*. 12 de abril de 2004;23(16):2746-56.
 - 210.Isahara K, Ohsawa Y, Kanamori S, Shibata M, Waguri S, Sato N, et al. Regulation of a novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinases. *Neuroscience*. 1999;91(1):233-49.
 - 211.Barry MA, Eastman A. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch Biochem Biophys*. enero de 1993;300(1):440-50.
 - 212.Alamo C, Ferrándiz B, López-Muñoz F, Alguacil LF. Influence of butibufen on enzyme activity and lysosomal stabilization ex vivo: a comparative study with hydrocortisone and acetylsalicylic acid. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. junio de 1995;17(5):303-10.
 - 213.Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle Georget Tex*. noviembre de 2006;5(22):2592-601.
 - 214.Petersen NHT, Kirkegaard T, Olsen OD, Jäättelä M. Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability. *Cell Cycle Georget Tex*. 15 de junio de 2010;9(12):2305-9.