



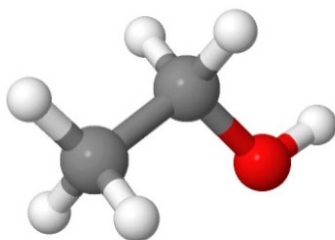
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,
Fisiología, Genética e Inmunología
Instituto Universitario de Investigaciones
Biomédicas y Sanitarias

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado:
Investigación Aplicada a las Ciencias Sanitarias

Efecto del etanol sobre la viabilidad de las células leucémicas humanas expuestas a hipertermia



MERCEDES GLORIA QUINTANA RAMÍREZ

Las Palmas de Gran Canaria
2025

Esta tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Unidad Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de los Catedráticos de Bioquímica y Biología Molecular Dr. José Martín Quintana Aguiar y Dr. Francisco Jesús Estévez Rosas, a quienes expreso mi más profundo agradecimiento.

A Papá, Mamá y Carlos

ABREVIATURAS

AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i> . Factor inductor de apoptosis.
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i> . Factor activador de proteasas apoptóticas.
BAD	<i>BCL-2 associated agonist of cell death</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BAK	<i>BCL-2 antagonist killer 1</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BAX	<i>BCL-2 associated X</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BCL-2	<i>B-cell leukemia/lymphoma 2</i> . Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
BCL-2-A1	Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2, también conocida como A1 o BFL-1.
BCL-X_L	<i>B-cell lymphoma extra-large</i> . Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
BCL-W	Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
BER	<i>Base excision repair</i> . Mecanismo de reparación de las bases nitrogenadas del ADN mediante eliminación.
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BIK	Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BIM	<i>BCL-2-interacting mediator of cell death</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BMF	<i>BCL-2 modifying factor</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
BOK	<i>BCL-2-related ovarian killer</i> . Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
CARD	<i>Caspase-recruitment domain</i> . Dominio de reclutamiento de caspasa.

CCCP	<i>Carbonil cianuro m-clorofenil-hidrazona.</i>
c-FLIP	<i>Cellular FLICE-inhibitory protein.</i> Proteína inhibidora de la autoactivación de caspasa-8.
ciAP1/2	<i>Inhibitors of apoptosis proteins 1/2.</i> Proteínas parálogas de la familia IAPs, también conocidas como BIRC2 y BIRC3, respectivamente.
DCF-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína.
DD	<i>Death domain.</i> Dominio de muerte.
DED	<i>Death effector domain.</i> Dominio efector de muerte.
DISC	<i>Death-inducing signaling complex.</i> Complejo de señalización inductor de muerte.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DTT	Ditiotreitol.
DHE	Dihidroetidio.
DPI	Cloruro de difenilenoyodonio.
EDTA	Ácido etilen-diamin-tetra-acético.
EGTA	Ácido etilenglicol-bis- <i>N,N'</i> -tetraacético.
FADD	<i>Fas-associating protein with a novel death domain.</i> Proteína adaptadora asociada a FAS con dominio de muerte.
FAS	Receptor de muerte perteneciente a la superfamilia TNFR, también denominado APO1 o CD95.
FASL	<i>FAS ligand.</i> Ligando del receptor de muerte FAS.
FBS	Suero bovino fetal.
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory.</i> Observatorio Global del Cáncer. Es una plataforma web interactiva desarrollada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), dependiente de la Organización Mundial de la Salud. Presenta las estadísticas globales del cáncer,

para informar sobre el control y la investigación de esta patología.

GSH	Glutatión.
HEPES	<i>Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico.</i>
HRK	<i>Harakiri.</i> Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
HSP70	<i>70 kDa Heat shock protein.</i> Proteína perteneciente a la familia de proteínas del choque térmico.
HSE	<i>Heat shock element. Elemento de respuesta del choque térmico. Secuencia de ADN al que se une específicamente el factor de transcripción HSF1.</i>
HSF1	<i>Heat shock factor 1.</i> Factor de transcripción del choque térmico 1.
HT	Hipertermia.
IAPs	<i>Inhibitors of apoptosis proteins.</i> Familia de ocho proteínas funcionalmente y estructuralmente relacionadas que regulan la muerte celular.
JC-1	Yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboanina.
MCL-1	<i>Myeloid cell leukemia sequence 1.</i> Proteína antiapoptótica de la familia BCL-2.
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization.</i> Permeabilización de la membrana mitocondrial externa.
MPT	<i>Mitochondrial permeability transition.</i> Permeabilidad mitocondrial transitoria.
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio.
NAC	<i>N</i> -Acetil-L-cisteína.
NOX	NADPH oxidase. Familia de enzimas con actividad NADPH oxidasa.
NOXA	Proteína proapoptótica de la familia BCL-2, también conocida como PMAIP1.

PARP-1	<i>Poli(ADP-ribosa) polimerasa-1.</i>
PBS	Tampón fosfato salino.
PMSF	Fluoruro de metilsulfonilfenilo.
PUMA	<i>P53-upregulated modulator of apoptosis.</i> Proteína proapoptótica de la familia BCL-2.
PVDF	Fluoruro de poli-vinilideno.
ROS	<i>Reactive oxygen species.</i> Especies reactivas de oxígeno.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase.</i> Factor proteico conocido también como DIABLO que bloquea a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP).
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20.
TEMED	<i>N,N,N,N-tetrametil-etilendiamina.</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor.</i> Factor necrótico tumoral.
TNFRSF	<i>TNF receptor superfamily.</i> Superfamilia formada por 29 receptores relacionados con el receptor de TNF.
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1.</i> Receptor 1 de TNF, perteneciente a la superfamilia TNFRSF.
TNFSF	<i>TNF superfamily.</i> Superfamilia formada por 19 ligandos relacionados con TNF.
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand.</i> Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF.
TRAILR1	<i>TRAIL receptor 1.</i> Receptor 1 de TRAIL, perteneciente a la superfamilia TNFRSF, también conocido como DR4.
TRAILR2	<i>TRAIL receptor 2.</i> Receptor 2 de TRAIL, perteneciente a la superfamilia TNFRSF, también denominado DR5.
XIAP	<i>X-Linked inhibitor of apoptosis protein.</i> Proteína inhibidora de la apoptosis de la familia IAPs que está codificada por un gen ligado al cromosoma X. Se le conoce, además, como BIRC4.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
<i>El cáncer</i>	1
<i>La hipertermia, un tratamiento prometedor frente al cáncer</i>	2
<i>La hipertermia induce muerte celular por apoptosis y aumento de los niveles de las proteínas del choque térmico</i>	5
<i>Activación de la apoptosis por la vía intrínseca</i>	7
<i>Activación de la apoptosis por la vía extrínseca</i>	13
II. OBJETIVOS	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	19
REACTIVOS	19
<i>Reactivos y material para los cultivos celulares</i>	19
<i>Reactivos para la determinación de la actividad caspasa</i>	19
<i>Reactivos para el análisis por western blot</i>	19
<i>Reactivos para el análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia</i>	20
<i>Otros reactivos</i>	20
INFRAESTRUCTURA UTILIZADA	21
MÉTODOS	22
<i>Cultivos celulares</i>	22

<i>Tratamiento con hipertermia</i>	23
<i>Análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia</i>	25
<i>Cuantificación de las células apoptóticas por citometría de flujo: fases del ciclo celular</i>	25
<i>Determinación de la actividad caspasa</i>	26
<i>Análisis de la expresión, procesamiento y translocación de las proteínas por western blot</i>	28
<i>Análisis del potencial de la membrana mitocondrial por citometría de flujo</i>	30
<i>Determinación de las especies reactivas de oxígeno intracelulares</i>	32
<i>Determinación del número de células y de la viabilidad celular</i>	32
<i>Valoración de la actividad metabólica por reducción del MTT</i>	33
<i>Análisis estadístico</i>	34
IV. RESULTADOS	35
<i>El etanol potencia el efecto citotóxico de la hipertermia en las células leucémicas U-937</i>	35
<i>El etanol incrementa la apoptosis desencadenada por la hipertermia en células U-937.....</i>	38
<i>Efecto diferencial del etanol sobre la muerte por apoptosis activada por la hipertermia en células leucémicas humanas ...</i>	41
<i>El procesamiento y la actividad catalítica de las caspasas aumenta por el etanol en células U-937 expuestas a hipertermia.....</i>	46
<i>Las caspasas son esenciales en la inducción de la apoptosis por la hipertermia y en el aumento de la citotoxicidad por el etanol</i>	49

<i>La vía extrínseca es imprescindible para la activación de la apoptosis inducida por la hipertermia y para la potenciación por el etanol</i>	50
<i>El etanol potencia la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales sin perturbar el potencial de la membrana mitocondrial en células U-937 expuestas a hipertermia</i>	51
<i>El etanol modula la expresión de los factores proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia BCL-2 en células U-937 expuestas a hipertermia</i>	54
<i>El etanol debe estar presente durante el periodo de tratamiento con hipertermia para lograr el efecto potenciador sobre la muerte celular</i>	56
<i>El etanol no influye sobre la autofagia en células U-937 expuestas a hipertermia</i>	58
<i>Las especies reactivas de oxígeno no están implicadas en la potenciación de la muerte celular por el etanol en células U-937 expuestas a hipertermia</i>	60
<i>La expresión de HSP70 inducida por la hipertermia es bloqueada en las células donde el etanol potencia la apoptosis</i>	64
<i>El etanol no modifica la capacidad citotóxica del etopósido</i>	65
V. DISCUSIÓN	67
VI. CONCLUSIONES	79
VII. BIBLIOGRAFÍA	81
VIII. ANEXOS	97

El cáncer

Según la Organización Mundial de la Salud el cáncer es un amplio grupo de enfermedades que pueden iniciarse en cualquier órgano o tejido del cuerpo a partir de células anormales que se multiplican sin control y que pueden invadir zonas contiguas y/o diseminarse a otros órganos. Este último proceso invasivo, denominado metástasis, es el principal causante de muerte por cáncer.

Se han descrito diez capacidades que adquieren las células cancerígenas y con las que se favorece el crecimiento del tumor y la diseminación de las células tumorales [1,2]. Estas son: i) inmortalidad replicativa (superación del límite de Hayflick); ii) señalización proliferativa sostenida; iii) insensibilidad a los supresores de la proliferación; iv) evasión de la muerte celular por apoptosis; v) inducción de angiogénesis, esto es, formación de nuevos vasos sanguíneos; vi) capacidad de invasión y metástasis; vii) reprogramación del metabolismo energético (efecto Warburg); viii) evasión del sistema inmune; ix) contribución al mantenimiento de un microambiente inflamatorio; x) inestabilidad y mutación genómica.

A pesar de los notables avances en la prevención, el diagnóstico precoz y los tratamientos, la incidencia del cáncer continúa aumentando. De acuerdo con los datos publicados por el Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN), en el año 2022 se diagnosticaron en todo el planeta alrededor de 19.3 millones de nuevos casos y se contabilizaron 9.7 millones de fallecimientos. Se estima que en el 2050 la incidencia estará en torno a 35 millones de nuevos casos, lo que supone un aumento del 77% respecto a los niveles observados en el año 2022, y la mortalidad asociada aumentará hasta los 12 millones. Por regiones, la incidencia del cáncer en Europa es desproporcionadamente elevada, así como la mortalidad asociada a esta enfermedad. Este continente presenta, a nivel global, aproximadamente la quinta parte de las cifras de cáncer (22.4%) y de las muertes (20.4%), a pesar de que la densidad de su población representa menos del 10% de la población mundial. Debido al aumento de la esperanza de vida se estima que la prevalencia de la enfermedad aumente también gradualmente. Las

estimaciones sugieren que aproximadamente una de cada cinco personas desarrollará cáncer a lo largo de su vida, y que alrededor de uno de cada nueve hombres y una de cada doce mujeres morirá por esa causa [3]. El cáncer continúa siendo una enfermedad demoledora a pesar de los grandes esfuerzos realizados en investigación con el fin de profundizar en su conocimiento y poder desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas. Los tratamientos clásicos para hacer frente al cáncer son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Otras opciones terapéuticas más recientes y en auge son la terapia dirigida, la inmunoterapia y la hipertermia, también conocida como hipertermia oncológica o termoterapia.

La hipertermia, un tratamiento prometedor frente al cáncer

La hipertermia es una opción terapéutica frente al cáncer en la que un área específica del cuerpo, o bien el cuerpo entero, es expuesto a una fuente de energía con el fin de incrementar la temperatura por encima de los valores fisiológicos, normalmente en el intervalo de 39-45 °C, con el fin de conseguir efectos terapéuticos [4,5]. La utilización de esta tecnología en la práctica clínica implica la disponibilidad de equipamiento especializado que consigue la elevación controlada de la temperatura mediante distintas técnicas como son la radiación electromagnética, los ultrasonidos, la perfusión o la conductividad [6]. Actualmente se investiga el uso de nanopartículas con propiedades magnéticas para conseguir incrementar la temperatura localmente y específicamente dentro del tumor [7,8].

El efecto terapéutico depende de la temperatura y de la duración de la exposición, lo que se conoce como dosis térmica. A mayor temperatura y dosis térmica la eficacia es más alta, pero también se asocia con niveles más elevados de toxicidad térmica. Habitualmente la temperatura elegida es de 43 °C y la duración del tratamiento suele ser de sesenta minutos como máximo [9]. La hipertermia ha demostrado ser una potente modalidad de tratamiento frente al cáncer cuando se combina con quimioterapia o radioterapia [10-13]. El tratamiento se aplica típicamente una o dos veces por semana y la combinación ha demostrado potenciar el efecto terapéutico [14].

La hipertermia influye en el efecto de los agentes antitumorales a través de varios mecanismos. El microambiente de los tumores sólidos, en comparación con el tejido sano, se caracteriza por presentar hipoxia y pH ácido, consecuencia de una vascularización anómala y del aumento en la glucólisis. Esa vascularización aberrante favorece el calentamiento selectivo del tumor respecto al tejido sano circundante debido a que el flujo sanguíneo, responsable de la disipación del calor, es menor en el tumor [15,16]. Diversos estudios señalan, además, que durante la hipertermia aumenta el flujo sanguíneo y la oxigenación del tejido tumoral, lo que puede ser beneficioso: i) para el acceso al tejido enfermo de los agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos [17,18] y ii) para mejorar la eficacia de la radioterapia o quimioterapia, ya que la formación de especies reactivas del oxígeno que desencadenan estos tratamientos aumenta notablemente cuando los niveles de O_2 se elevan, lo que a su vez deriva en un mayor daño del ADN [5].

Se sabe que las células tumorales que se encuentran en un ambiente hipóxico son más resistentes a la radioterapia que las células tumorales que se hallan en un ambiente aeróbico (todos los tumores contienen regiones tumorales hipóxicas). Por el contrario, las células tumorales en un contexto de hipoxia no son resistentes a la hipertermia. Esto ha permitido el desarrollo de la termoradioterapia, es decir, el uso racional de la hipertermia y la radioterapia [19].

Muchas terapias antitumorales están basadas en la toxicidad que conlleva la rotura de las dos cadenas del ADN inducida por la radiación ionizante o, indirectamente, por los agentes químicos. Los mecanismos de reparación del ADN, sin embargo, son muy eficientes y protegen a las células del daño genotóxico de esa rotura, de modo que reducen la eficacia de las terapias. Los agentes que inhiben los sistemas de reparación del ADN potencian la citotoxicidad de las roturas en la terapia del cáncer. Es el caso de la hipertermia que, a través de mecanismos poco definidos, interfiere con los sistemas encargados de la reparación del ADN y esto explica que la máxima sensibilización del tratamiento antitumoral con radioterapia e

hipertermia se alcanza cuando ambos agentes se administran simultáneamente [19]. Se ha descrito que el supresor de tumores BRCA2, que es esencial para estabilizar la horquilla de replicación estancada y promover la reparación del ADN mediante recombinación homóloga, así como para la segregación de los cromosomas durante la mitosis [20,21], es degradado en respuesta al tratamiento con hipertermia a través de un mecanismo que requiere de la participación del proteosoma [22].

La efectividad de la hipertemia para incrementar la eficacia antitumoral de la radiación sin alterar significativamente su toxicidad ha sido demostrada en diferentes ensayos clínicos en fase II y en fase III sobre el cáncer de cérvix, de mama, de cabeza y cuello, y en melanoma [19]. Varios estudios clínicos indican, además, que la hipertermia también potencia la eficacia de los agentes quimioterapéuticos convencionales como cisplatino, mitomicina, etopósido, ifosfamida y doxorrubicina frente a distintos tipos de tumores, sin incrementar la toxicidad de manera significativa. Además de los mencionados mecanismos inhibitorios sobre la reparación del ADN, la hipertermia favorece la internalización del fármaco y el estrés oxidativo, procesos que contribuyen a la potenciación antitumoral [23,24].

Un aspecto muy poco estudiado es cómo afecta la hipertermia al metabolismo celular. Se sabe que la fosforilación oxidativa, cuya función es proveer de energía en forma de ATP a la célula, es más sensible que la vía glucolítica. La hipertermia provoca la inhibición de la fosforilación oxidativa, posiblemente debido a que las mitocondrias son más sensibles a la elevación de la temperatura y sufren alteraciones funcionales, y esto tiene dos consecuencias: i) aumenta la oxigenación del tumor porque se reduce el consumo de oxígeno mitocondrial para la producción de energía, ii) disminuye el pH extracelular, consecuencia de una mayor producción de lactato en el tumor al aumentar la actividad glucolítica. Ambos factores, oxigenación del tumor y reducción del pH extracelular, han

demostrado favorecer la eficacia de la hipertermia en la destrucción celular [24,25].

La hipertermia induce muerte celular por apoptosis y aumento de los niveles de las proteínas del choque térmico

La respuesta de las células a la hipertermia depende en gran medida de la intensidad y de la duración del tratamiento. La exposición de las células a una situación de estrés térmico conduce a la activación de diferentes vías de señalización; unas implicadas en la supervivencia celular, como es la biosíntesis de las proteínas del choque térmico (HSP), y otras con la activación de la muerte celular, habitualmente mediante apoptosis [26].

La respuesta celular al choque térmico es un proceso biológico evolutivamente conservado que se activa por las condiciones de estrés fisiológico o de estrés ambiental, como el aumento de la temperatura. Es un mecanismo de defensa frente al efecto deletéreo de la desnaturalización de proteínas celulares que son esenciales. Esta función la llevan a cabo las proteínas del choque térmico, que son una familia de proteínas esenciales que intervienen en el plegamiento correcto de las proteínas recién sintetizadas, evitan la formación de agregados de proteínas mal plegadas, intervienen en la translocación de proteínas a otros orgánulos e incluso facilitan la degradación de proteínas por el proteosoma. Además, modulan muchos sistemas de señalización intracelulares, afectando a procesos como el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis [27].

Las proteínas de la familia HSP se clasifican en función del peso molecular, oscilando entre 10 kDa y 100 kDa. Las más estudiadas son HSP60, HSP70 y HSP90. Aunque muchas de las proteínas de esta familia son inducidas por diferentes estímulos de estrés, entre los que se encuentran la elevación de la temperatura y los agentes químicos, otras se expresan de forma constitutiva en condiciones fisiológicas [28]. Esencialmente, estas proteínas dirigen la reparación de los daños causados por la situación de estrés con la finalidad de lograr la

supervivencia celular. En general, niveles elevados de las proteínas de la familia HSP se correlacionan con un aumento de la protección celular [29].

Cuando las células no son capaces de reparar los daños causados por la hipertermia habitualmente mueren por apoptosis. La muerte celular, independientemente de la modalidad, se manifiesta con alteraciones morfológicas. En la apoptosis, estos cambios consisten en la reducción del volumen celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de evaginaciones en la membrana celular que terminan transformándose en vesículas que son fagocitadas en condiciones fisiológicas. Todas estas alteraciones son manifestaciones de los cambios bioquímicos que ocurren en la célula. Los mediadores moleculares fundamentales de la apoptosis son las caspasas (Figura 1), un grupo de cisteín-proteasas que promueve la rotura de una gran variedad de proteínas con funciones muy diversas. En general, la secuencia reconocida por estas proteasas está formada por cuatro aminoácidos, el último de los cuales es un residuo de aspartato. La ruptura proteolítica tiene lugar inmediatamente después de este aminoácido [30].

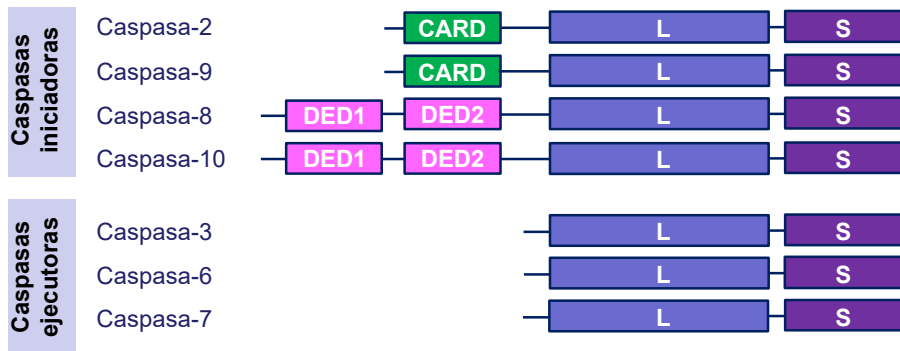


Figura 1. Organización estructural y clasificación funcional de las caspasas de mamíferos involucradas en la apoptosis. Todas las procaspasas presentan tres regiones denominadas prodominio, subunidad larga (L) y subunidad corta (S). Las regiones L y S están separadas por uno o varios lugares que son sensibles a la ruptura por la propia caspasa una vez esta es activada (ruptura autocatalítica) o por una proteasa diferente, comúnmente por otra caspasa. Las caspasas iniciadoras presentan prodominios largos que contienen regiones denominadas DED1, DED2 o CARD, que interaccionan con proteínas adaptadoras. Por el contrario, las caspasas

ejecutoras tienen prodominios cortos que carecen de lugares de interacción con otras proteínas. Las caspasas iniciadoras existen en las células como monómeros inactivos y se activan mediante dimerización. La fragmentación autoproteolítica posterior, entre las subunidades L y S, va a favorecer que el dímero activo sea mucho más estable. Las caspasas responsables de ejecutar la apoptosis preexisten en las células como dímeros inactivos en el citosol y también son activadas por la rotura autocatalítica entre las subunidades L y S. Las caspasas maduras, activas, están constituidas por un tetrámero formado por dos subunidades L y dos subunidades S. Se muestra un esquema simplificado de la estructura lineal de las procaspasas; tanto la longitud de la cadena polipeptídica como la posición relativa de las regiones que contienen pueden diferir entre las diferentes procaspasas.

En condiciones fisiológicas las células apoptóticas conservan la integridad de la membrana plasmática y cierto grado de actividad metabólica mientras el proceso avanza irreversiblemente, pudiendo ser reconocidas y eliminadas rápidamente por macrófagos y otras células fagocíticas. Por el contrario, en los cultivos celulares, salvo que las células presenten actividad fagocítica, la membrana de las células apoptóticas acaba perdiendo su integridad. Esto origina que la célula apoptótica termine exhibiendo una morfología necrótica, proceso este que es conocido como necrosis secundaria [31]. La apoptosis puede iniciarse a través de dos vías que han sido ampliamente estudiadas. Son las denominadas vía intrínseca, también conocida como vía mitocondrial debido al papel esencial que desempeña este orgánulo, y la vía extrínseca, denominada así porque la activación del proceso es dependiente de un grupo de receptores que se localizan en la superficie de la membrana celular, conocidos como receptores de muerte [32].

Activación de la apoptosis por la vía intrínseca

Las perturbaciones en el microambiente intracelular o extracelular, como son el daño en el ADN, el estrés del retículo endoplasmático, la hipoxia, las alteraciones en la red de microtúbulos, los defectos en la mitosis, el aumento de las especies reactivas de oxígeno o el déficit de factores de crecimiento son algunos de los desencadenantes de la vía intrínseca de la apoptosis. La etapa más crítica en esta vía es el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP), proceso que está controlado por un grupo de proteínas reguladoras de la apoptosis con propiedades antiapoptóticas o

proapoptóticas pertenecientes a la familia BCL-2. Las proteínas de esta familia presentan similitud estructural con la proteína BCL-2, el prototipo de inhibidor de la apoptosis. Todas ellas contienen al menos una región que presenta homología con alguno de los cuatro dominios característicos de la proteína BCL-2, denominados BH1, BH2, BH3 y BH4 [33,34] (Figura 2).

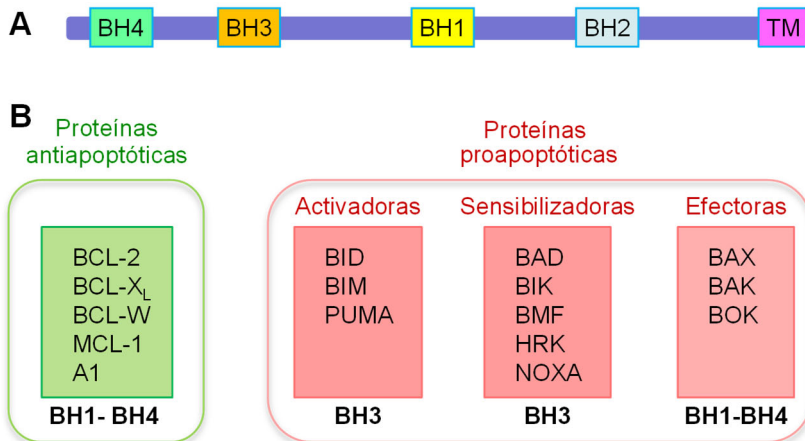


Figura 2. Organización estructural y funcional de las proteínas de la familia BCL-2. (A) Representación esquemática de la organización estructural de las proteínas de la familia BCL-2, identificándose las regiones con homología BCL-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4), enumeradas por orden cronológico de identificación, y la región transmembrana (TM). (B) Las proteínas de la familia BCL-2 se clasifican en antiapoptóticas y proapoptóticas. Las tres clases de proteínas proapoptóticas son las activadoras, las sensibilizadoras y las efectoras. Todas las proteínas activadoras y sensibilizadoras presentan solamente la región 3 con homología BCL-2, por lo que son conocidas como proteínas solo BH3. Las proteínas proapoptóticas efectoras y las proteínas antiapoptóticas comparten las cuatro regiones con homología BCL-2 (BH1-BH4).

Las proteínas que poseen los cuatro dominios (BH1-BH4) presentan una estructura terciaria altamente conservada en la que el dominio BH3 forma parte de una hendidura que funciona como receptor para el dominio BH3 de los otros miembros de la familia. Entre ellas se encuentran las proteínas antiapoptóticas y las proteínas proapoptóticas con capacidad para formar poros, estas últimas también denominadas efectoras. Se han propuesto varios modelos de competición con la finalidad de explicar de qué forma las proteínas de

la familia BCL-2 interaccionan entre sí en la membrana mitocondrial externa para controlar la permeabilidad de la misma. El destino final de la célula probablemente dependa de una compleja red de interacciones entre los miembros de la familia BCL-2, que está condicionada por la cantidad existente en un momento dado de los distintos factores y por la afinidad entre ellos [35,36].

En condiciones fisiológicas la membrana mitocondrial externa es permeable a moléculas de tamaño inferior a 5 kDa y durante la permeabilización se forman poros a través de los cuales pueden pasar al citosol proteínas de masa molecular muy superior, hasta 100 kDa [33,37]. En respuesta a un determinado estímulo apoptótico, el aumento de la permeabilidad mitocondrial está mediado por BAX y por BAK, únicos componentes de la familia BCL-2 que han demostrado capacidad para formar poros en la membrana mitocondrial externa [36]. Aunque BOK tiene la capacidad de formar poros estructuralmente análogos a los que forman BAX y BAK, aún no se ha logrado demostrar de forma inequívoca que induzca directamente la permeabilización de la membrana mitocondrial. Esta proteína de la familia BCL-2 se localiza únicamente en el retículo endoplasmático, lo que parece indicar que su papel en la regulación de la apoptosis sea más limitado y que pudiera desempeñar otras funciones como la transferencia de calcio a la mitocondria [38,39].

En situaciones normales la localización de BAX fluctúa entre el citosol y la membrana mitocondrial externa, proceso que se conoce como retrotranslocación. Por el contrario, BAK se encuentra principalmente en la membrana mitocondrial externa debido a la interacción de la hélice α -9 presente en su extremo C-terminal con la bicapa lipídica. La menor hidrofobicidad de la hélice α -9 de BAX explica por qué esta proteína también puede encontrarse en el espacio citosólico [39]. Una vez se activa la apoptosis, la retrotranslocación se interrumpe. En la membrana mitocondrial externa, las proteínas BAX y BAK son activadas por las proteínas proapoptóticas que solo poseen el dominio BH3, pudiéndolo hacer directamente (proteínas activadoras) y también de manera indirecta (proteínas sensibilizadoras) [40,41]. Las

proteínas activadoras son BID, BIM y PUMA, y tienen la facultad de interaccionar de forma transitoria en la membrana mitocondrial externa con BAX y con BAK. Como consecuencia de los contactos ocurren importantes cambios conformacionales en estas últimas que desencadenan los siguientes eventos: i) liberación de las proteínas activadoras, ii) homodimerización, iii) oligomerización a partir de los dímeros, iv) formación del poro mitocondrial y, v) incremento de la permeabilidad mitocondrial [42] (Figura 3).

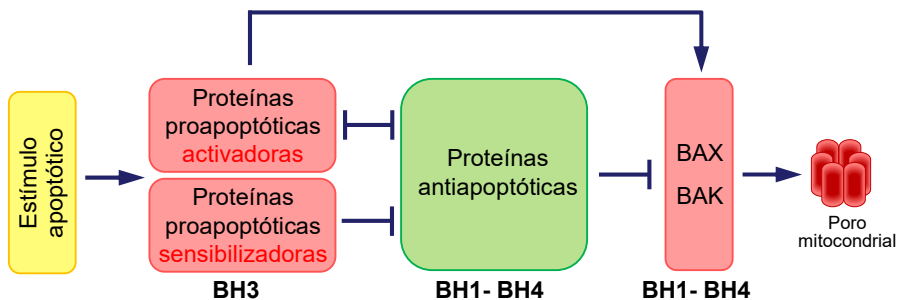


Figura 3. Activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Las proteínas antiapoptóticas intervienen protegiendo a la célula de la muerte por apoptosis, secuestrando a las proteínas activadoras y neutralizando directamente a las proteínas efectoras. La vía intrínseca se activa una vez aumentan los niveles de las proteínas proapoptóticas activadoras y sensibilizadoras, en respuesta a diferentes estímulos como son el daño en el ADN (radiación, agentes químicos) o en los orgánulos, la inhibición de vías de señalización, la falta de nutrientes o de factores de crecimiento, etc. El incremento en la proporción de proteínas con funciones proapoptóticas frente a las que desempeñan propiedades antiapoptóticas lleva asociado que se perturbe la compleja red de interacciones entre los distintos factores. En estas condiciones, las proteínas proapoptóticas activadoras interaccionan directamente con las proteínas efectoras formadoras de poro (BAX y BAK) y secuestran a las proteínas antiapoptóticas. A diferencia de las proteínas activadoras, las proteínas sensibilizadoras inducen la formación de poros de manera indirecta ya que se unen a las proteínas antiapoptóticas e inducen la liberación y activación de las proteínas efectoras que, en forma libre, oligomerizan en la membrana mitocondrial externa y promueven el aumento de la permeabilidad de este orgánulo.

El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa es neutralizado por los miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2 tales como BCL-2, BCL-2-A1 (también conocido como BFL-1), BCL-W, BCL-X_L y MCL-1. Todos estos factores contienen los cuatro dominios BH; se encuentran generalmente insertados en la membrana

mitocondrial externa, o en la del retículo endoplasmático, a través de la hélice $\alpha 9$ de la región transmembrana y se unen y neutralizan a los miembros proapoptóticos. La mayoría de los factores antiapoptóticos inhiben la capacidad de BAX y de BAK para oligomerizar y formar poros en la mitocondria, a través de una acción directa (secuestrándolos en la membrana mitocondrial externa) o bien indirecta (secuestrando a los activadores BH3 proapoptóticos). En el caso de BCL-X_L, su función antiapoptótica la ejerce mediante retrotranslocación de BAX y BAK desde la mitocondria al citosol, lo que consigue reducir los niveles de estos últimos en la membrana mitocondrial externa [43]. Es importante destacar que algunas de las proteínas BH3 proapoptóticas como BAD, BMF y HRK, promueven la permeabilidad mitocondrial en ausencia de contacto físico con BAX y con BAK. Son conocidas como proteínas sensibilizadoras y actúan uniéndose a las proteínas antiapoptóticas, limitando la disponibilidad de estas últimas e impidiendo que puedan secuestrar a BAX, a BAK o a sus proteínas activadoras con dominio BH3 (Figura 3).

El incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa favorece el acceso al citosol de factores apoptogénicos que residen en el espacio intermembrana. Entre estas proteínas mitocondriales están el citocromo *c* (12 kDa), SMAC (22 kDa) y AIF (67 kDa) [44]. En el citosol, el citocromo *c* y la desoxiadenosina trifosfato (dATP) se unen a la proteína APAF-1, desencadenando cambios conformacionales en esta última que promueven su oligomerización en una estructura heptamérica en la que quedan expuestos sus dominios CARD. La unión a esta estructura de siete moléculas de procaspasa-9 a través de sus correspondientes prodominios CARD origina una entidad molecular superior denominada apoptosoma y que es el lugar donde se lleva a cabo la activación de esta caspasa iniciadora (Figura 4). La dimerización de la procaspasa-9 a nivel del apoptosoma parece ser un evento fundamental en su activación [45].

Las caspasas ejecutoras promueven el desmantelamiento celular y son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis como son la fragmentación del ADN, la externalización

de la fosfatidilserina y la formación de cuerpos apoptóticos [46]. El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa conduce a la disipación del potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Esta está causada por la disminución de la cantidad de citocromo *c* en el espacio intermembrana, donde actúa como transportador de electrones entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria, viéndose afectado por tanto el gradiente electroquímico. Las funciones que dependen del potencial mitocondrial, como la síntesis de ATP y el transporte de proteínas codificadas por genes nucleares al interior de la mitocondria, también se van a ver comprometidas [47].

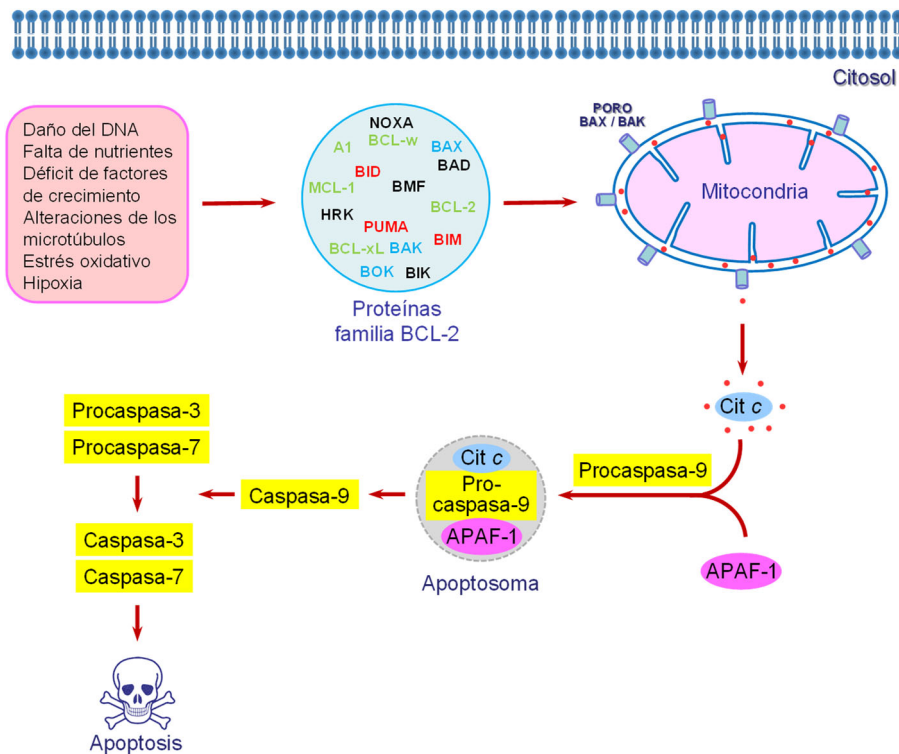


Figura 4. Activación de la vía intrínseca de la apoptosis. La vía intrínseca se activa en respuesta a una gran diversidad de estímulos extracelulares o intracelulares como pueden ser las alteraciones en la estructura del ADN provocadas por agentes físicos o químicos (radiación, estrés oxidativo, limitación de nutrientes metabólicos, déficit de factores de crecimiento e hipoxia). El aumento en la proporción de las proteínas que desempeñan funciones proapoptóticas frente a las antiapoptóticas conlleva que se altere la compleja red de interacciones entre los distintos miembros de la familia BCL-2. En estas condiciones las proteínas proapoptóticas con propiedades

activadoras interaccionan directamente con las proteínas efectoras con capacidad para formar poros (BAX y BAK) y promueven el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y la liberación al citosol de factores apoptogénicos, el más importante de los cuales es el citocromo *c*. En el citosol, el citocromo *c* junto con la proteína APAF-1 y con dATP estimulan la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-9 que, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras (principalmente a la caspasa-3) responsables del desmantelamiento de las estructuras y funciones esenciales de la célula. Aunque la participación de BAX y BAK en el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa está ampliamente documentada y no parece ofrecer dudas, aún no se conoce sin embargo de qué forma estas proteínas efectoras permeabilizan la membrana mitocondrial ni la naturaleza química (proteica o lipídica) del poro funcional. La información experimental existente sobre BOK es mucho más limitada; se desconoce su contribución a la apoptosis en condiciones de ausencia de las otras dos proteínas efectoras y cómo promueve la permeabilidad mitocondrial.

Activación de la apoptosis por la vía extrínseca

La vía extrínseca de la apoptosis (Figura 5) se inicia a través de perturbaciones en el medio extracelular e implica la participación de una serie de receptores, denominados receptores de muerte, que se localizan en la membrana plasmática y que son activados por la unión a ligandos específicos de naturaleza proteica [48]. Entre los receptores de muerte se incluye a varios miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) como son: i) TNFR1, ii) TRAILR1, conocido también como DR4, iii) TRAILR2, denominado también DR5 y iv) FAS, igualmente conocido como CD95 y APOA1 [49,50]. Entre los ligandos destacan FASL, TRAIL y TNF, siendo este último el miembro fundador de la superfamilia de proteínas relacionadas con TNF [51].

La formación del complejo ligando-receptor implica inicialmente la trimerización del ligando y unión a su correspondiente receptor en la superficie celular, promoviendo la trimerización de este último. El resultado final es una estructura proteica hexamérica que desencadena en el espacio intracelular la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC), una estructura molecular implicada en la activación de la procaspasa-8, y también de la procaspasa-10 [52]. Tras la unión del ligando se estabiliza la estructura homotrimérica del receptor y este último sufre importantes cambios conformacionales en el lado intracelular con las siguientes

consecuencias: i) los dominios de muerte (DD) del receptor quedan expuestos en la superficie, pudiendo interactuar con los dominios de muerte presentes en el extremo C-terminal de la proteína adaptadora, denominada FADD; ii) los dominios efectores de muerte (DED) situados en el extremo N-terminal de la proteína adaptadora interactúan, a su vez, con los dominios DED de la procaspasa-8. La interacción a través de los dominios DED favorece la homodimerización de la procaspasa-8 y, consecuentemente, su activación. La activación de la caspasa-8 puede verse afectada: i) por c-FLIP, un factor proteico que está estructuralmente relacionado con la caspasa-8 y que compite por la unión al complejo de señalización DISC; ii) posiblemente también mediante fosforilación [53].

Una vez activada la vía extrínseca, la apoptosis puede ejecutarse siguiendo dos alternativas. En las células denominadas de tipo I, como son los timocitos o los linfocitos maduros, la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras es llevada a cabo únicamente por la caspasa-8 ya que su actividad es suficiente para promover la apoptosis. En las células de tipo II, entre las que se encuentran los hepatocitos, las células β -pancreáticas o la mayoría de las células tumorales, la activación de las caspasas ejecutoras por la acción directa de la caspasa-8 es muy limitada, debido principalmente a la presencia de inhibidores de las caspasas ejecutoras en el espacio citosólico. Uno de estos inhibidores es XIAP, un miembro perteneciente a la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) que bloquea la actividad catalítica de la caspasa-3, de la caspasa-7 y, en menor extensión, puede también afectar la actividad proteolítica de la caspasa-9 [54]. Para superar este bloqueo la proteína proapoptótica BID (inactiva) es transformada en el citosol en su forma truncada (activa), denominada t-BID, por la acción proteolítica de la caspasa-8. La forma activa de BID puede ahora insertarse en la membrana mitocondrial externa donde funciona como activador de BAX y de BAK, favoreciendo el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Esto tiene como consecuencia la liberación al citosol tanto de citocromo c, que promueve la activación de la caspasa-9, como de SMAC, que neutraliza el efecto inhibitorio de XIAP sobre las caspasas efectoras.

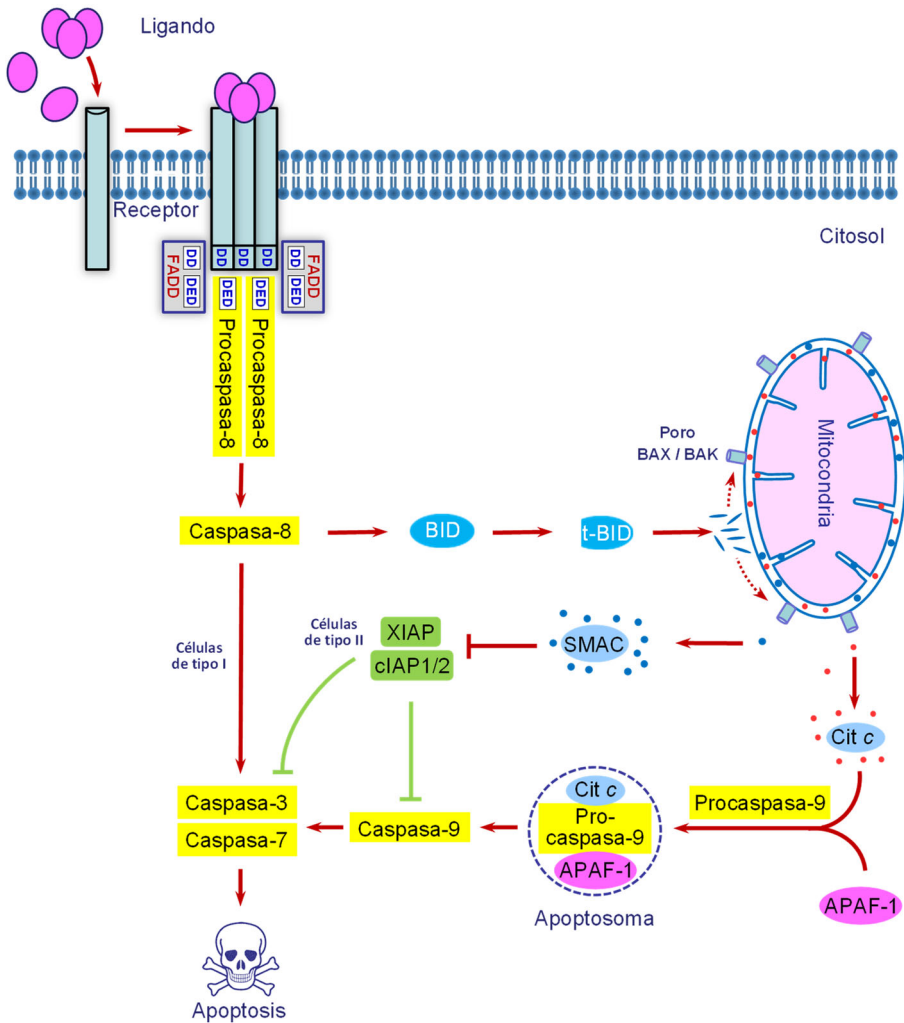


Figura 5. Activación de la vía extrínseca de la apoptosis. La vía extrínseca se inicia con la unión de los receptores de muerte presentes en la membrana celular a sus ligandos específicos, que pueden existir en forma soluble o bien encontrarse en la membrana celular. Existen evidencias de que el ligando, en forma de trímero, se une al receptor y promueve que este se asocie también de la misma forma, originándose una estructura molecular con una proporción 3:3, tres moléculas de ligando y tres moléculas de receptor. Una vez formado el hexámero, los receptores sufren cambios conformacionales intracelulares complejos, exponiéndose una región denominada dominio de muerte (DD) que presenta afinidad por una proteína adaptadora (FADD) que desempeña la función de servir de puente entre el receptor y la procaspasa-8. Esta estructura macromolecular intracelular formada por el receptor, la proteína adaptadora y la procaspasa-8 se conoce como complejo de señalización inductor de muerte (DISC) y en ella la procaspasa-8 adquiere actividad autocatalítica, liberándose caspasa-8 con mayor capacidad para acceder a los sustratos proteicos. En las células

de tipo I, la actividad caspasa-8 es suficiente para activar a la caspasa-3 y a la caspasa-7 y, por lo tanto, para la ejecución de la apoptosis. Sin embargo, en las células de tipo II los niveles endógenos de ciertos inhibidores de la caspasa-3 y de la caspasa-7 como XIAP son muy elevados y es necesario neutralizarlos para que la apoptosis pueda iniciarse. Esto se logra a través del incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa mediante la participación de t-BID, activador proapoptótico cuya formación es dependiente de la actividad proteolítica de la caspasa-8. La liberación al citosol de la proteína mitocondrial SMAC conlleva la neutralización de XIAP y que las caspasas ejecutoras aumenten su actividad enzimática, pudiendo llevar a cabo la rotura de múltiples sustratos de naturaleza proteica. En estas condiciones, la activación de la caspasa-9 que precede a la liberación de citocromo c auspiciada por t-BID contribuye también a la amplificación de la señal apoptótica. Aunque XIAP también puede inhibir a la caspasa-9, la afinidad por esta caspasa ejecutora es notablemente inferior.

El etanol es un compuesto natural que se metaboliza principalmente por enzimas localizadas en el hígado, entre las que se encuentran la *alcohol deshidrogenasa*, el *citocromo P450 2E1* y el *sistema microsomal de oxidación de etanol*. Las diferentes vías que intervienen en la metabolización del etanol conducen a la formación de acetaldehído, un producto que puede favorecer el estrés oxidativo mediante la generación de especies reactivas de oxígeno [55] y que es responsable, al menos en parte, de los efectos hepatotóxicos ampliamente conocidos. Se ha descrito que el etanol: i) mejora la susceptibilidad de las células leucémicas humanas a la muerte celular apoptótica [56]; ii) potencia la apoptosis inducida por TRAIL en colon, linfocitos T leucémicos y células de cáncer de próstata [57-59]; iii) estimula la apoptosis inducida por genisteína en las células de cáncer de cuello uterino humano [60]; iv) aumenta la toxicidad de la radiación ionizante en células de hepatocarcinoma [61].

En base a lo anterior y teniendo en cuenta el uso cada vez más frecuente de la hipertermia como estrategia terapéutica frente al cáncer se plantea como hipótesis valorar el posible impacto del etanol sobre las propiedades antitumorales de este tratamiento. El objetivo del presente estudio ha sido, por lo tanto, investigar la influencia del etanol sobre la muerte celular inducida por hipertermia en células de leucemia humana, determinar su efecto sobre las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis, y valorar si altera la expresión de las proteínas de la familia BCL-2.

Para lograr los objetivos planteados se utilizó la línea de leucemia mieloide aguda humana U-937, utilizada como modelo *in vitro* en numerosos estudios sobre la muerte celular desencadenada por el calor [4]. Los resultados de este trabajo revelan que la eficacia de la hipertermia en la inducción de la muerte celular por apoptosis aumenta notablemente cuando el tratamiento se hace en combinación con concentraciones no tóxicas de etanol y que este incremento se correlaciona con la reducción intracelular de los niveles de la proteína citoprotectora HSP70. Para ampliar los conocimientos sobre el tratamiento combinado, se investigó también el efecto del alcohol en otras líneas celulares de leucemia humana como son HL-60, MOLT-3 y K-562.

REACTIVOS

Reactivos y material para los cultivos celulares

El medio de cultivo RPMI 1640 y el suero bovino fetal se obtuvieron de Gibco. La mezcla concentrada (100x) de los antibióticos estreptomicina y penicilina G fue de Biowest. El material plástico estéril como botellas de cultivo de 75 cm², platos de 100 mm, placas de 6, 12 y 96 pocillos, pipetas de 5 ml y de 10 ml, tubos de poliestireno de 5 ml y de 12 ml, y tubos tipo Falcon de 50 ml se adquirieron de Becton-Dickinson. El azul de tripán y el dimetilsulfóxido (DMSO), ambos estériles, fueron de Sigma.

Reactivos para la determinación de la actividad caspasa

Los inhibidores específicos de caspasas benciloxi-carbonil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-(OMe)-fluorometilcetona (z-DEVD-fmk), benciloxi-carbonil-isoleucil-glutamil-treonil-aspartil-(OMe)-fluorometilcetona (z-IETD-fmk) y benciloxi-carbonil-leucil-glutamil-histidil-aspartil-(OMe)-fluorometilcetona (z-LEHD-fmk) así como los sustratos colorimétricos de caspasas *N*-acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-*p*-nitroanilina (Ac-DEVD-*p*NA), *N*-acetil-isoleucil-glutamil-treonil-aspartil-*p*-nitroanilina (Ac-IETD-*p*NA) y *N*-acetil-leucil-glutamil-histidil-aspartil-*p*-nitroanilina (Ac-LEHD-*p*NA) fueron obtenidos de Sigma. El inhibidor general de caspasas benciloxi-carbonil-valil-alanil-aspartil (OMe)-fluorometilcetona (z-VAD-fmk) se adquirió de Tocris.

Reactivos para el análisis por western blot

La mezcla de acrilamida y bisacrilamida (bis *N,N'*-metilen-bis-acrilamida) (40% p/v, proporción de monómeros totales respecto al agente entrecruzante 29:1), el dodecil sulfato sódico (SDS), el *N,N,N,N*-tetrametil-etilendiamina (TEMED), el persulfato amónico, y el marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein Dual Color Standards (10 kDa-250 kDa) se obtuvieron de Bio-Rad. La glicina, el β -mercaptoetanol, el azul de bromofenol, así como trizma-base y trizma-HCl fueron de Sigma.

Los anticuerpos primarios que reconocen a caspasa-3 (Cat# ADI-AAP-113-F, RRID:AB_11180615), caspasa-8 (Cat# ADI-AAM-118-E, RRID:AB_2038943) y caspasa-9 (Cat# ADI-AAM-139-E, RRID:AB_2038946) se obtuvieron de Enzo Life Sciences. Los anticuerpos dirigidos frente a BCL-2 (Cat# 2872, RRID:AB_10693462), BCL-X_L (Cat# 2764, RRID:AB_2228008), MCL-1 (Cat# 4572, RRID:AB_2281980), BAX (Cat# 2772, RRID:AB_10695870), BID (Cat# 2002, RRID:AB_10692485) y α -tubulina (Cat# 2125, RRID:AB_2619646) fueron de Cell Signaling. Los anticuerpos que reconocen a PARP (Cat# 551024, RRID:AB_394008), citocromo c (Cat# 556433, RRID:AB_396417), SMAC/DIABLO (Cat# 612246, RRID:AB_399569) y Beclin-1 (Cat# 612112, RRID:AB_399483) se adquirieron de BD Biosciences. Los anticuerpos frente a HSP70 (Cat# sc-24, RRID:AB_627760) y c-IAP1/2 (Cat# sc-12410, RRID:AB_2227909) fueron de Santa Cruz Biotechnology.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano anti-IgG de ratón (Cat# NA9310, RRID:AB_772193) y anti-IgG de conejo (Cat# NA9340, RRID:AB_772191) fueron de GE Healthcare. Las membranas de PVDF (difluoruro de polivinilideno) y el sustrato de revelado por quimioluminiscencia se obtuvieron de Millipore.

Reactivos para el análisis por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia

El paraformaldehído, la bisbencimida (Hoechst 33258), la proteinasa K, la RNasa A, el yoduro de propidio, el cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP), el yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-bencimidazol-carbocianina (JC-1) fueron proporcionados por Sigma.

Otros reactivos

El tampón fosfato salino (PBS) concentrado (10x) estéril, el ácido *N*-(2-hidroxietil) piperazino *N'*-(2-etanosulfónico) (HEPES), el ácido etilenglicol-bis-*N,N'*-tetraacético (EGTA), el ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), el hidróxido de sodio (NaOH), el ácido clorhídrico (HCl), el cloruro de sodio (NaCl), el cloruro de potasio (KCl), el bromuro de 3-

[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el glicerol, la sacarosa, la albúmina de suero bovino (BSA), los inhibidores de proteasas [fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, y pepstatina], los inhibidores de fosfatasas (fluoruro sódico, β -glicerofosfato sódico, ortovanadato sódico y pirofosfato sódico), los detergentes no iónicos (tween 20 y tritón X-100), los antioxidantes glutatión (GSH), *N*-acetil-L-cisteína (NAC), 5-dihidroxi-1,3-benzenodisulfónico (Tiron), cloruro de difenilenoyodonio (DPI) y alopurinol, y el agente reductor ditiotreitól (DTT) se adquirieron a Sigma. El etanol utilizado en los experimentos fue de grado absoluto (99.9% de pureza) y se obtuvo de BDH. El etanol empleado para la esterilización de las superficies y utensilios de trabajo directamente relacionados con el cultivo de las diferentes líneas celulares fueron de Artemi. El agua desionizada y bidestilada se generó con un equipo Milli-Q (Water Purification System) de Millipore. El reactivo de Bradford fue adquirido a Bio-Rad.

INFRAESTRUCTURA UTILIZADA

Para llevar a cabo los cultivos celulares y el mantenimiento de las células se emplearon las campanas de flujo laminar Cultair y Faster BHA 48 (ambas de Cultek), el incubador de CO₂ Shel Lab (Sheldon Manufacturing), el microscopio de contraste de fases Axiovert 135 (Zeiss), la centrífuga de velocidad intermedia Universal 320R (Hettich) y el baño termostático digital WB01 (LBX Instruments). Para la obtención del número de células y la viabilidad celular en los experimentos indicados se utilizó el contador automático de células TC-10 (Bio-Rad) y para la esterilización de material plástico y de líquidos (agua bidestilada y tampones) se usó un autoclave de la marca Matachana.

El análisis de las fases del ciclo celular y la valoración de la externalización de la fosfatidilserina (apoptosis), así como la determinación del potencial de la membrana mitocondrial interna se realizó con el citómetro de flujo BD FACSVersé (Becton-Dickinson).

Para el estudio de la morfología nuclear se utilizó el microscopio invertido de fluorescencia Axiovert 200M (Zeiss).

Para determinar la expresión de las proteínas se empleó el equipo de electroforesis / transferencia Mini-Protean Tetra System, la fuente de alimentación PowerPac 300 y el equipo de detección por quimioluminiscencia ChemiDoc, todos de Bio-Rad. Para la sonicación de las células se empleó el sonicador Labsonic 2000 (Braun-Biotech)

El calentamiento en seco de las muestras de proteínas se consiguió con un termobloque digital Dry Bath-Dual Block (Labnet). El baño de agua empleado para tratar a las células con hipertermia estaba equipado con varios módulos independientes (P-Selecta). La valoración colorimétrica de la actividad caspasa y la cuantificación de las proteínas se realizó con un lector de microplacas (Modelo 680, Bio-Rad).

La centrifugación de las placas de 96 pocillos durante los ensayos de MTT se realizó con la centrífuga CS-15 R (Beckman). Otras centrífugas empleadas a lo largo del estudio fueron el modelo Universal 32 R (Hettich) y las microcentrífugas refrigeradas de alta velocidad Allegra X-22R (Beckman Coulter) y Mikro 200R (Hettich).

MÉTODOS

Cultivos celulares

Las células U-937 (DSMZ Cat# ACC-5, RRID:CVCL_0007), HL-60 (DSMZ Cat# ACC-3, RRID:CVCL_0002), MOLT-3 (DSMZ Cat# ACC-84, RRID:CVCL_0624) y K-562 (DSMZ Cat# ACC-10, RRID:CVCL_0004) se obtuvieron de la colección alemana de cultivos celulares DSMZ.

Las células se cultivaron en medio de crecimiento RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado mediante calor y con antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin), en una atmósfera húmeda, a 37 °C y 5% de CO₂. Durante la propagación de las células, a estas se les cambió el

medio de cultivo de dos a tres veces por semana y se mantuvo en todo momento a una densidad inferior a 5×10^5 células/ml.

La determinación del número y la viabilidad celular se llevó a cabo con el método de exclusión del azul de tripán, utilizando para ello una cámara de Neubauer (hematocitómetro) y un microscopio invertido de contraste de fases Axiovert 135 (Zeiss). Las células se duplicaron aproximadamente cada 24 horas y se les realizó el cambio de medio de crecimiento el día anterior y también el mismo día del experimento. Se aseguró que la viabilidad celular fuera igual o superior al 95% para dar comienzo el experimento.

Tratamiento con hipertermia

Las células se transfirieron a tubos de polipropileno estériles, se centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó por decantación el medio de crecimiento. El precipitado de células se resuspendió con medio de crecimiento fresco previamente ajustado a 37 °C, hasta alcanzar una densidad aproximada de 0.5×10^6 células/ml. Las células (~ 10 ml) se distribuyeron en platos de cultivo estériles de 100 mm, se les añadió etanol hasta alcanzar el porcentaje especificado en cada experimento y se mantuvieron en el incubador durante 30 minutos a 37 °C. Las células de cada plato se recogieron y rápidamente se distribuyeron en dos tubos de poliestireno estériles, con la misma cantidad de células en cada uno de ellos. A continuación, los tubos conteniendo células tratadas con etanol y los tubos con células libres de etanol se sumergieron en un baño de agua ajustado previamente a 37 °C (control) o bien a 43 °C (tratamiento con hipertermia), durante 30 minutos. Posteriormente las células se transfirieron a platos de 100 mm o bien a placas de 12 o 96 pocillos estériles, dependiendo del objetivo del estudio. Las células se incubaron seguidamente a 37 °C durante los periodos de tiempo especificados en cada experimento (periodo de recuperación) y finalmente se recogieron en tubos de poliestireno para llevar a cabo el análisis biológico correspondiente (Figura 6).

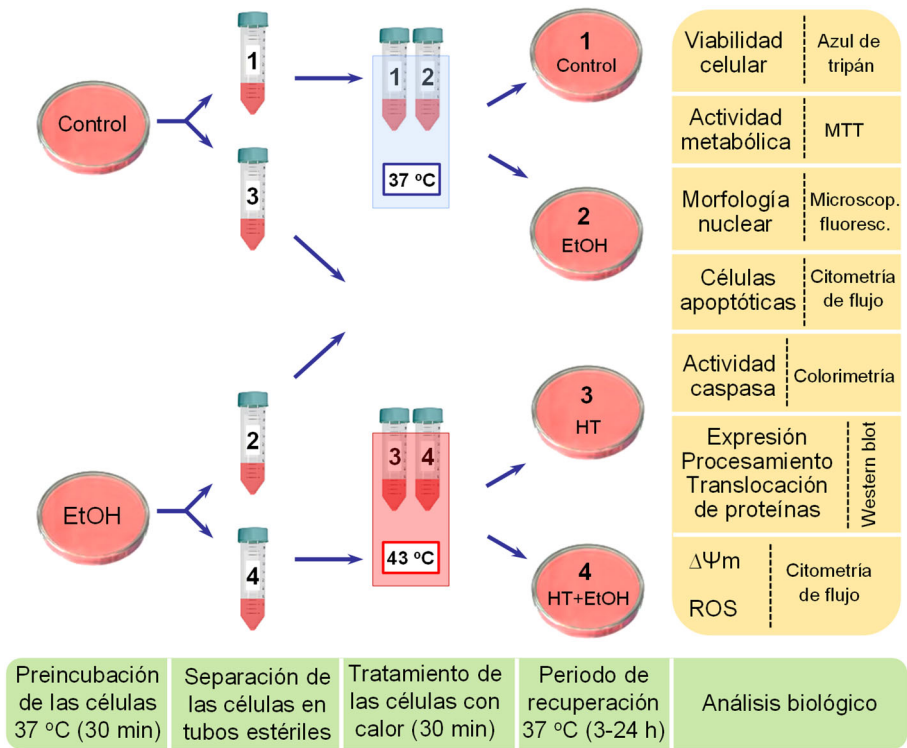


Figura 6. Esquema del proceso metodológico utilizado para estudiar el efecto del etanol sobre la muerte celular inducida por hipertermia en células de leucemia humanas que crecen en suspensión. Las células se preincubaron en ausencia o presencia del porcentaje de etanol (EtOH) especificado en cada experimento, durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, las células de cada grupo experimental se recogieron y se separaron de manera equitativa en dos tubos estériles. Los tubos se sumergieron seguidamente en un baño de agua ajustado a 37 °C o 43 °C durante 30 minutos tras lo cual las células se transfirieron a platos de 100 mm o bien a placas de 12 o 96 pocillos (dependiendo del objetivo del ensayo) y se incubaron a 37 °C durante un tiempo que osciló entre 3 y 24 horas (periodo de recuperación). Finalmente, se recogieron las células y se llevó a cabo el análisis biológico especificado para cada experimento y consistente en la determinación de: i) la viabilidad celular, ii) la actividad metabólica, iii) la apoptosis, iv) la actividad caspasa, v) la expresión, el procesamiento y la translocación de proteínas, vi) el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y vii) las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Análisis de la morfología nuclear por microscopía de fluorescencia

Una vez concluido el tiempo de recuperación se recogieron las células, se transfirieron a tubos de poliestireno de 5 ml de capacidad y se centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el medio de crecimiento por aspiración con vacío, se lavaron las células con 2 ml de PBS y se centrifugaron nuevamente en idénticas condiciones. El precipitado celular se resuspendió con 50 μ l de paraformaldehído al 3% (p/v) en PBS y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 500 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó por aspiración la disolución de paraformaldehído. Una vez fijadas, las células se lavaron con 2 ml de PBS e inmediatamente se tiñeron con 15 μ l de una disolución que contenía 20 μ g/ml de trihidrocloruro de bisbencimida (Hoechst 33258) en PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La muestra teñida se colocó sobre un portaobjetos de vidrio, se cubrió con un cubreobjetos y se analizó la morfología de los núcleos en un microscopio de fluorescencia. Las células cuyos núcleos se encontraban fragmentados en pequeños cuerpos densos o que exhibían condensación de la cromatina fueron consideradas apoptóticas, mientras que las células que contenían núcleos no condensados y con la cromatina dispersa se tomaron como no apoptóticas [62].

Cuantificación de las células apoptóticas por citometría de flujo: fases del ciclo celular

Una vez concluido el periodo de recuperación las células se transfirieron a tubos de polipropileno de 5 ml de capacidad y se centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el medio de crecimiento por aspiración con vacío, se resuspendió el precipitado celular con 1 ml de PBS frío y se centrifugó en las mismas condiciones anteriores. Las células se resuspendieron con 50 μ l de PBS frío y se fijaron seguidamente con 1 ml de etanol al 70%, enfriado previamente a -20 °C. La mezcla se agitó con moderación y los tubos se mantuvieron a -20 °C hasta el día siguiente. Posteriormente los tubos se

centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó la fracción etanólica y las células se lavaron con 1 ml de PBS frío. Tras una nueva etapa de centrifugación en frío, el precipitado de células se resuspendió con 200 μ l de PBS conteniendo yoduro de propidio (50 μ g/ml) y RNasa A (100 μ g/ml) y se incubó en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las células se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSVersé (Becton-Dickinson) del siguiente modo: las muestras se irradiaron a 488 nm con un láser de argón para estimular la excitación del complejo ADN-propidio y la fluorescencia emitida por el propidio que forma parte del complejo (E_{max} = 617 nm) se capturó con el detector BlueD, equipado con el espejo 560LP y el filtro 586/42. En cada muestra se analizaron 10 000 células y los fragmentos celulares fueron excluidos del análisis.

La fluorescencia emitida por los fluorocromos que pueden unirse al ADN, como ocurre con el yoduro de propidio, permite determinar en una población celular el porcentaje de células encontradas en cada una de las fases del ciclo celular. De esta forma, las células con capacidad para dividirse pueden encontrarse en la fase G_1 (primer pico), en la fase S (o de síntesis de ADN) o en la fase G_2/M (segundo pico). Las células presentes en la fase G_1 contienen menor cantidad de ADN que las células presentes en la fase S y estas a su vez tendrán menor cantidad de ADN que las células que se encuentran en la fase G_2/M , y estas últimas tendrán doble cantidad de ADN que aquellas que se encuentran en la fase G_1 del ciclo celular. Las células que exhiben reducida tinción del ADN por el yoduro de propidio, resultado de contener menor cantidad de cromatina o fragmentación de la misma, se localizan a la izquierda del pico G_1 (fracción sub- G_1) y son consideradas apoptóticas.

Determinación de la actividad caspasa

Para la determinación de la actividad caspasa se partió de 5×10^6 células (0.5×10^6 /ml) y, una vez finalizado el experimento, las células se transfirieron a tubos de poliestireno de 12 ml de capacidad y se centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el medio

por aspiración y las células se sometieron a dos ciclos de lavado con PBS. Para ello se resuspendieron las células con 5 ml de PBS frío, se centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a 4 °C y al precipitado celular obtenido se le realizó la misma operación por segunda vez. Posteriormente las células se solubilizaron en frío con tampón de lisis [50 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% CHAPS] conteniendo inhibidores de proteasas (0.1 mM PMSF, 10 µg/ml de aprotinina y 10 µg/ml de pepstatina A) a razón de 30 µl de tampón por cada millón de células, se pasaron diez veces a través de una aguja de calibre 29G y se centrifugaron a 16000 *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron las proteínas siguiendo el método de Bradford [63]. Las muestras se ajustaron a la misma cantidad de proteínas utilizando como diluyente el anterior tampón de lisis con inhibidores de proteasas. Una fracción de las muestras (20 µg de proteínas) se utilizó para evaluar la actividad caspasa.

Este método determina la hidrólisis de los sustratos cromogénicos específicos de caspasas. Los sustratos utilizados fueron: i) *N*-acetil-aspartil-glutamil-valil-aspartil-*p*-nitroanilina (Ac-DEVD-*p*NA), para determinar la actividad de la caspasa-3 y de la caspasa-7; ii) *N*-acetil-isoleucil-glutamil-treonil-aspartil-*p*-nitroanilina (Ac-IETD-*p*NA), para valorar la actividad caspasa-8; iii) *N*-acetil-leucil-glutami-histidil-aspartil-*p*-nitroanilina (Ac-LEHD-*p*NA), para evaluar la actividad caspasa-9. Los diferentes sustratos se disolvieron con tampón de ensayo a una concentración de 2 mM y se conservaron a -20 °C.

El ensayo de la actividad caspasa se realizó en una placa de 96 pocillos de ½ área. Cada muestra se valoró por triplicado en un volumen de reacción de 50 µl, consistente en 5 µl de muestra (conteniendo 10 µg de proteínas), 5 µl de sustrato cromogénico específico de caspasa (200 µM) y 40 µl de tampón de ensayo [50 mM HEPES (pH 7.4), 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, 100 mM NaCl, 10% glicerol]. La placa se incubó 1 hora a 37 °C y la liberación del cromóforo *para*-nitroanilina (*p*NA) se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas (Modelo 680, Bio-Rad). Para obtener los valores

específicos de absorbancia, es decir exclusivamente debido a la actividad caspasa, a los valores de absorbancia de las muestras se les restó el valor medio de la absorbancia inespecífica, obtenido a partir de los blancos. Estos contenían 5 μ l de tampón de lisis (en vez de muestra), 5 μ l del sustrato específico de caspasa (200 μ M) y 40 μ l de tampón de ensayo.

Análisis de la expresión, procesamiento y translocación de las proteínas por western blot

Para el estudio de la expresión, procesamiento y translocación de las proteínas se partió aproximadamente de 5×10^6 de células/plato, y una vez finalizado el experimento las células se transfirieron a tubos de poliestireno de 12 ml de capacidad y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el medio mediante aspiración y el precipitado celular se lavó dos veces con PBS frío. Para ello se resuspendió el precipitado de células con 5 ml de este tampón salino, se centrifugó a 500 g durante 10 minutos a 4 °C y al precipitado celular obtenido se le efectuó la misma operación por segunda vez. Una vez realizados los dos lavados con PBS, el precipitado celular obtenido fue procesado de diferente forma con el fin de obtener un lisado celular completo, con proteínas solubles y proteínas de membrana, o bien para obtener la fracción citosólica enriquecida, formada exclusivamente por proteínas solubles.

i) Obtención del lisado celular. Las células se solubilizaron con el tampón de lisis A [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100] conteniendo inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 5 μ g/ml de leupeptina, 5 μ g/ml de aprotinina y 5 μ g/ml de pepstatina A) e inhibidores de fosfatasa (2 mM pirofosfato sódico, 2 mM ortovanadato sódico, 10 mM fluoruro sódico, 20 mM β -glicerofosfato sódico) a razón de 30 μ l de tampón por cada 1×10^6 células, y se mantuvieron durante 15 minutos en hielo; a continuación las muestras se sonicaron en frío (tres ciclos de 5 segundos), se centrifugaron a 16 000 g durante 10 minutos a 4 °C y la fracción soluble (sobrenadante) se transfirió a tubos de microcentrífuga limpios, que

se conservaron a -20 °C hasta el momento del análisis. Este procedimiento se realizó para determinar los niveles de expresión y/o procesamiento proteolítico de procaspasa-3, procaspasa-8, procaspasa-9, PARP, BID, BCL-2, BCL-X_L, MCL-1, c-IAP1/2, HSP70 y α -tubulina, proteínas que se encuentran en el espacio citosólico, asociadas a membranas o en el núcleo.

ii) Obtención de la fracción citosólica. Las células se resuspendieron con el tampón isotónico B [20 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 250 mM sacarosa] conteniendo inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 5 μ g/ml de leupeptina, 5 μ g/ml de aprotinina y 5 μ g/ml de pepstatina A), a razón de 30 μ l de tampón por cada 1x10⁶ células, y se mantuvieron durante 15 minutos en hielo; a continuación, las células se lisaron haciéndolas pasar a través de una aguja de calibre 29G y se centrifugaron a 1000 *g* durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado (fracción nuclear) se desechó y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo limpio que se centrifugó a 22 000 *g* durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante (fracción citosólica soluble) se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y las muestras se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Este procedimiento se realizó para evaluar la translocación de citocromo *c* y SMAC al citosol y, de manera indirecta, de BAX a la mitocondria.

Para la cuantificación de las proteínas en las diferentes muestras se siguió el método de Bradford. Dentro de cada experimento, y para poder llevar a cabo los estudios comparativos, las muestras se ajustaron a la misma concentración de proteínas, utilizando para ello el tampón específico empleado para su obtención. Se tomaron volúmenes idénticos de los lisados celulares (25 μ l, 50 μ g de proteínas) y se calentaron durante 10 minutos a 95 °C en tampón de carga TC [50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 15% sacarosa, 2 mM EDTA, 3% SDS, 5 mM β -mercaptoetanol y 0.01% azul de bromofenol]. Seguidamente, las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida conteniendo 0.1% SDS. Se seleccionó una reticulación del 7.5% para valorar el procesamiento de las procaspasas y de PARP, y para

determinar los niveles de expresión de HSP70 y de α -tubulina. Para conocer la expresión de BID, BAX y citocromo c se eligió una reticulación de poliacrilamida del 15%. Como referencia se utilizó el marcador coloreado de pesos moleculares Precision Plus Protein Dual Color Standards (10 kDa-250 kDa) de Bio-Rad. Una vez las proteínas se separaron en función de sus pesos moleculares, estas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) que se conservó a 4 °C hasta su análisis.

Para la determinación de la expresión y/o procesamiento de las proteínas, las membranas se incubaron con 5 ml de tampón TBST [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20] con 10% (p/v) de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente (etapa de bloqueo), seguido de una incubación con 2 ml del anticuerpo primario específico (1:1000), diluido en TBST con 3% (p/v) de leche desnatada, durante 24 horas a 4 °C y con agitación suave. El anticuerpo primario específico para α -tubulina se utilizó como evidencia de que las muestras analizadas contenían la misma cantidad de proteínas. Las membranas se sometieron a tres ciclos de lavados con 5 ml de TBST durante 15 minutos a temperatura ambiente cada uno, y se incubaron a continuación con un anticuerpo secundario apropiado (1:10 000), diluido en TBST con 3% (p/v) de leche desnatada, durante 1 hora y con agitación suave. Finalmente, las membranas se lavaron con TBST a temperatura ambiente, y las proteínas específicas se visualizaron utilizando el kit comercial Immobilon Western (Millipore) y detectando la señal quimioluminiscente emitida mediante un equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

Análisis del potencial de la membrana mitocondrial por citometría de flujo

Las células (0.5×10^6 células/pocillo) se incubaron con 10 μ M de la sonda fluorescente JC-1 a 37 °C durante los últimos 30 minutos del periodo de recuperación, y una vez finalizado el experimento se transfirieron a tubos de poliestireno de 5 ml de capacidad y se centrifugaron a 500 g durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el

sobrenadante por aspiración con vacío y las células se lavaron con 2 ml de PBS a 4 °C y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores. El precipitado celular resultante se resuspendió con 200 µl de PBS frío y las células se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSVerse (Becton-Dickinson), utilizando una longitud de onda de excitación de 488 nm y los detectores BlueD (equipado con el espejo 560LP y el filtro 586/42) y BlueE (equipado con el espejo 507LP y el filtro 527/32) para capturar la fluorescencia emitida por los agregados y por los monómeros de JC-1, respectivamente. Se analizaron 10 000 células de cada muestra y los restos celulares se excluyeron del análisis.

La sonda JC-1 ha sido muy utilizada para evaluar el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de las células. Esta molécula fluorescente presenta una carga positiva que le permite acumularse en las mitocondrias energizadas, principalmente en las células sanas. Las elevadas concentraciones que se alcanzan en el interior de estos orgánulos promueven que JC-1 tienda a formar agregados consigo mismo. Los agregados de JC-1 presentan un espectro de emisión que es diferente al que exhiben los monómeros. De esta forma, cuando la molécula JC-1 es excitada a 488 nm si se encuentra en forma de monómero emite fluorescencia con un pico máximo a 529 nm (verde), mientras que si se encuentra formando agregados el pico máximo de emisión se desplaza a 590 nm (rojo). Consecuentemente, la despolarización mitocondrial está asociada con una reducción en la intensidad de fluorescencia a 590 nm. El uso más extendido de JC-1 está relacionado con la detección de la despolarización mitocondrial en el estudio de la apoptosis. La disipación del potencial mitocondrial puede ser un evento temprano en el mecanismo de inducción de apoptosis, como ha sido demostrado en numerosos estudios [64,65].

La representación gráfica bidimensional de la fluorescencia emitida por los monómeros (eje de abcisas) y la fluorescencia emitida por los agregados (eje de ordenadas) permite visualizar a las células sanas con elevado potencial mitocondrial (máxima fluorescencia de los agregados, cuadrante superior) de las que no lo son (mínima fluorescencia de los agregados, cuadrante inferior), como es el caso de

las células apoptóticas. Como control positivo se utilizaron células tratadas durante 30 minutos con 50 μ M de carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP), un potente ionóforo de protones que desencadena rápidamente la disipación del potencial mitocondrial.

Determinación de las especies reactivas de oxígeno intracelulares

Para valorar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se emplearon las sondas fluorescentes diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2 -DCF-DA) y dihidroetidio (DHE), sensibles a la oxidación por el peróxido de hidrógeno y por el anión superóxido, respectivamente. Las células (0.5×10^6 células/pocillo) se incubaron con 10 μ M de las sondas anteriores a 37 °C durante los últimos 30 minutos del periodo de recuperación, seguidamente se transfirieron a tubos de poliestireno de 5 ml de capacidad y se centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración con vacío y las células se lavaron con 2 ml de PBS a 4 °C y se centrifugaron en las mismas condiciones anteriores. El precipitado celular resultante se resuspendió con 200 μ l de PBS frío y las células se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSVerse (Becton-Dickinson). Se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y el detector BlueE (equipado con el espejo 507LP y el filtro 527/32) para recoger la fluorescencia emitida por la sonda oxidada DCF-DA (diclorofluoresceína diacetato) o el detector BlueD (equipado con el espejo 560LP y el filtro 586/42) para capturar la fluorescencia emitida por la sonda oxidada 2-hidroxi-etidio (HE). Se analizaron 10 000 células de cada muestra y los restos celulares se excluyeron del análisis. La intensidad de la fluorescencia emitida se correlaciona directamente con la producción de ROS dentro de la célula.

Determinación del número de células y de la viabilidad celular

Una vez finalizado el tratamiento y el tiempo de recuperación programado, las células se transfirieron a tubos de poliestireno de 5 ml de capacidad y se centrifugaron a 500 *g* durante 10 minutos a 4 °C. El medio de crecimiento (sobrenadante) se eliminó por aspiración

mediante vacío y las células se resuspendieron con 1 ml de PBS frío. Seguidamente se mezclaron a temperatura ambiente 20 μ l de la suspensión celular con 20 μ l de una disolución salina (0.85% de cloruro sódico) conteniendo 0.4% (p/v) del colorante azul de tripán. De la mezcla anterior se tomaron alícuotas de 10 μ l y se analizaron en un contador automático de células (Modelo TC-10, Bio-Rad). Para cada muestra original se determinó el número de células totales, el número de células viables y el porcentaje de viabilidad.

Valoración de la actividad metabólica por reducción del MTT

Una vez finalizados los 30 minutos del periodo de tratamiento con calor, las células se recogieron en tubos de poliestireno estériles y de cada grupo se transfirieron seis muestras de 100 μ l (50 000 células) a una placa de 96 pocillos. Las células se colocaron en el incubador a 37 °C durante 24 horas (periodo de recuperación) y a continuación la placa se centrifugó a 500 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante mediante aspiración con vacío. Seguidamente a cada pocillo se le añadió 100 μ l de una disolución de MTT (0.5 mg/ml de MTT, en RPMI con antibióticos) y la placa se incubó durante 2 horas a 37 °C. La reacción se paró añadiendo a cada pocillo 100 μ l de una disolución de SDS al 20% (p/v) en 0.02 M de ácido clorhídrico y la placa se incubó a 37 °C durante 24 horas.

La actividad metabólica de las células se cuantificó por su capacidad de transformar el MTT, de color amarillo, en un producto de color púrpura e insoluble, reacción que está catalizada por el enzima mitocondrial *succinato deshidrogenasa*. La absorbancia de las muestras se determinó a 570 nm, utilizando un lector de microplacas (Modelo 680, Bio-Rad). La absorbancia específica de cada muestra se calculó deduciendo la absorbancia media obtenida de los pocillos utilizados como blancos, consistentes estos en tres pocillos sin células y a los que se les añadió 100 μ l de la disolución de MTT anterior. Las absorbancias específicas de las muestras se transformaron en porcentajes, tomando como 100% la absorbancia específica media de los controles.

La pérdida de capacidad de las células para reducir el MTT en respuesta a un tratamiento determinado puede indicar inhibición de la proliferación celular (agente citostático), incremento de la muerte celular (agente citotóxico) o ambos. Este método, aunque es muy útil para determinar la actividad citotóxica de los agentes químicos y físicos, debe apoyarse con otras técnicas, como la exclusión del azul de tripán, para definir con más precisión de qué forma el agente de interés afecta a las células.

Análisis estadístico

En todos los casos, las determinaciones para cada grupo experimental se realizaron por triplicado o cuadruplicado, y los valores representados se corresponden a datos de tres experimentos como mínimo (Media $\pm$ E.S.M.). La comparación entre los distintos tratamientos se realizó por el método de la t de Student o análisis de la varianza, considerando significativos los valores de $P < 0.05$.

El etanol potencia el efecto citotóxico de la hipertermia en las células leucémicas U-937

Las células U-937 constituyen un modelo celular que ha sido ampliamente utilizado para estudiar el efecto que exhiben los agentes químicos y físicos sobre la respuesta celular inducida por el calor, principalmente porque esta respuesta es muy rápida e intensa.

Para estudiar el efecto del etanol sobre las células U-937 expuestas a hipertermia se utilizaron concentraciones no tóxicas de dicho alcohol. Las células se cultivaron en ausencia o presencia de etanol (0.25%, 0.5% y 1%) durante 1 hora y luego se sometieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C). Las células se recogieron y analizaron después de un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C. Como se muestra (Figura 7A), se observó una clara disminución en la reducción del MTT en las células tratadas solamente con hipertermia. La disminución de la actividad mitocondrial fue más evidente en las células expuestas a hipertermia en combinación con concentraciones crecientes de etanol. Así, la menor actividad mitocondrial, aproximadamente el 25% respecto a su control, fue observada en el grupo tratado con hipertermia en combinación con etanol al 1%.

Puesto que una disminución en el porcentaje de reducción del MTT puede indicar que existe inhibición de la proliferación celular, aumento de la muerte celular, o ambos, también se evaluó el efecto del etanol sobre el número de células, utilizando para ello el método de exclusión del azul de tripán. Como se muestra (Figura 7B), el número de células viables disminuyó en respuesta a la hipertermia (~ 57% de células viables en comparación con el control), y concentraciones crecientes de etanol aumentaron enormemente la eficacia de la hipertermia (~10% de células viables en comparación con el control en las células tratadas con etanol al 1%). Los resultados también demostraron que el etanol por sí solo no tuvo ningún efecto sobre el número de células.

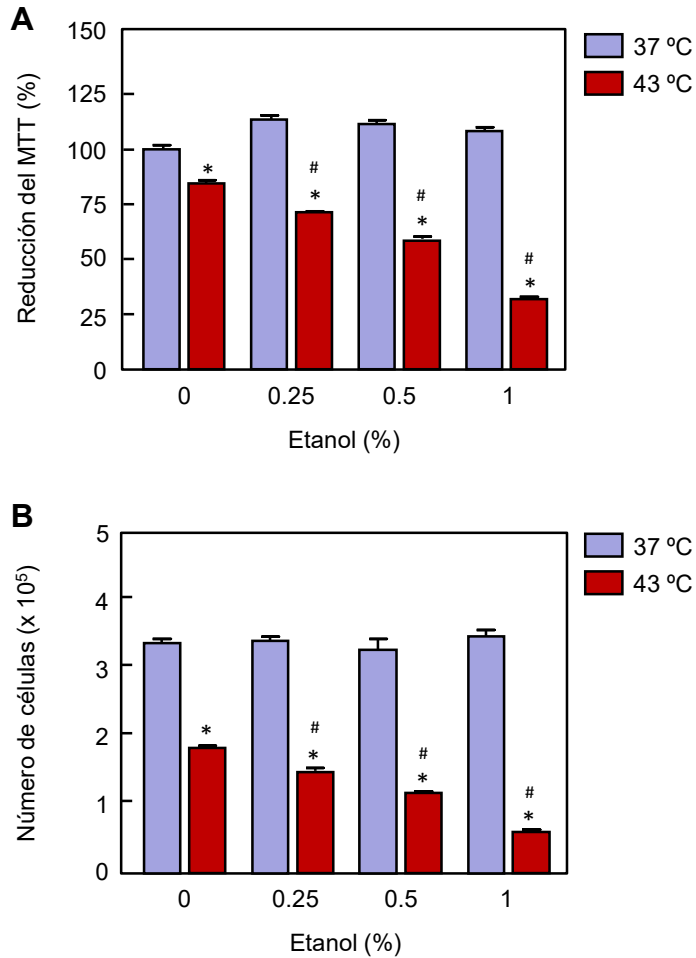


Figura 7. Efecto del etanol sobre la viabilidad de las células U-937 expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia o presencia de las indicadas concentraciones de etanol durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a continuación a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y posteriormente se analizaron tras un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C. (A) La actividad mitocondrial (i.e. viabilidad celular) se evaluó mediante el ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio (MTT). (B) El número de células viables se determinó mediante el método de la exclusión del azul de tripán, utilizando un contador automático de células. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C ; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

Consistente con los resultados anteriores, las células U-937 cultivadas en presencia de etanol a 37 °C presentaron morfología redondeada y citosol difuso, características de las células sanas, cuando se visualizaron mediante microscopía de contraste de fases después de un periodo de recuperación de 24 horas (Figura 8). Por el contrario, la combinación de hipertermia y etanol aumentó notablemente el número de células que presentaron citosol granular y aspecto insano, en comparación con el grupo tratado únicamente con hipertermia. En conjunto estos resultados sugieren que el etanol potencia la citotoxicidad que exhibe la hipertermia en células U-937.

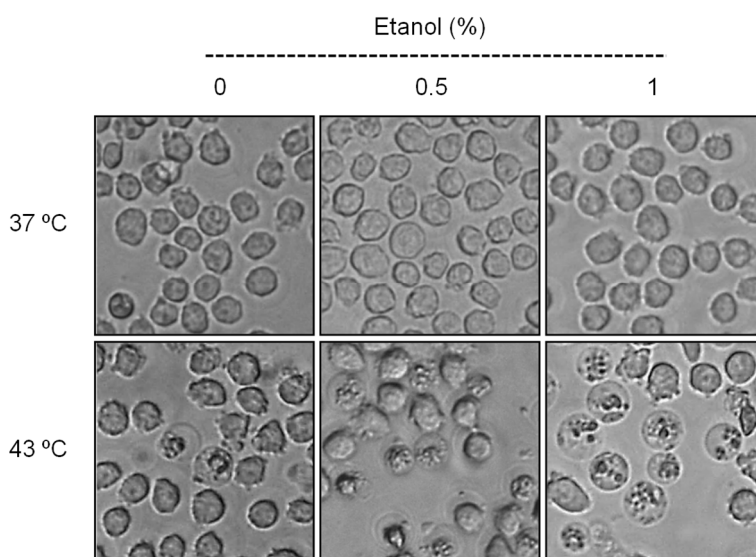


Figura 8. Efecto del etanol sobre la viabilidad de las células U-937 expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia o presencia de las concentraciones de etanol indicadas durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y posteriormente se analizaron tras un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C. Las células se observaron por microscopía de contraste de fases; se muestra un campo representativo de cada grupo experimental.

El etanol incrementa la apoptosis desencadenada por la hipertermia en células U-937

La apoptosis es una de las modalidades de muerte celular. Constituye un importante proceso fisiológico que ocurre en los tejidos y que es fundamental para el correcto desarrollo del organismo y para la homeostasis. En una gran variedad de células tumorales, incluidas las células U-937, la activación de la apoptosis es desencadenada por hipertermia [66]. Para determinar si el etanol influye sobre la respuesta apoptótica en condiciones de hipertermia, las células U-937 se preincubaron con etanol al 0.5% y luego se expusieron a 43 °C durante 30 minutos. Como se muestra en la Figura 9, el tratamiento con hipertermia indujo importantes cambios morfológicos en los núcleos como la condensación y la fragmentación de la cromatina, características de las células apoptóticas, y que pueden observarse por microscopía de fluorescencia. Una inspección más detallada de las imágenes revela que el número de núcleos apoptóticos aumentó en las células tratadas conjuntamente con hipertermia y etanol.

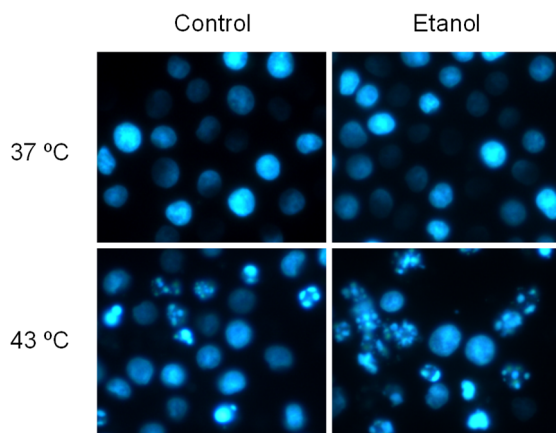


Figura 9. Efecto del etanol sobre la muerte celular por apoptosis en células U-937 expuestas a hipertermia. Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de etanol (0.5%) durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió un periodo de recuperación de 24 horas a 37 °C. Seguidamente las células se recogieron, se tiñeron con tri-hidrocloruro de bisbencimida y los núcleos se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se presentan campos representativos con el fin de evaluar la condensación y la fragmentación de la cromatina nuclear (i.e., apoptosis).

Resultados similares se observaron cuando las células se tiñeron con yoduro de propidio y, posteriormente, se analizó el ciclo celular mediante citometría de flujo. Los histogramas (Figura 10) revelan un aumento en la proporción de células con contenido de ADN sub- G_1 (i.e., células apoptóticas) en el grupo tratado con hipertermia más etanol en comparación con el grupo que únicamente se trató con hipertermia (39.5% vs 14.1%) tras un periodo de recuperación de 8 horas a 37 °C.

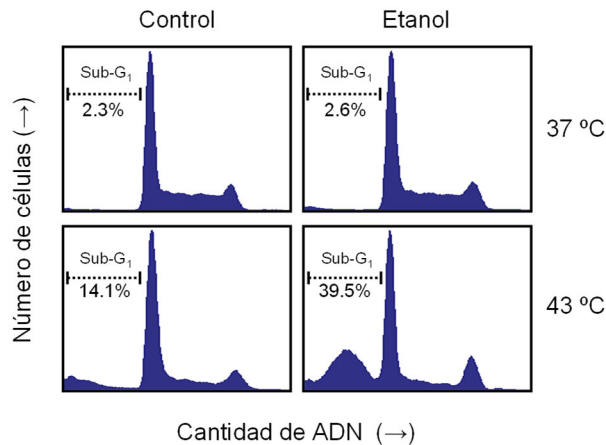


Figura 10. Efecto del etanol sobre la muerte celular por apoptosis en células U-937 expuestas a hipertermia. Las células fueron preincubadas en ausencia (control) o presencia de etanol (0.5%) durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió un periodo de recuperación de 8 horas a 37 °C. A continuación, se recogieron las células y se determinó la distribución celular en función del contenido de ADN mediante citometría de flujo, utilizando el método de tinción con yoduro de propidio; las células incluidas en la región sub- G_1 (i.e., células apoptóticas) están señaladas por una línea de puntos. Se presentan histogramas representativos.

El efecto de concentraciones crecientes de etanol sobre la apoptosis inducida por hipertermia fue evaluado y cuantificado utilizando diferentes periodos de recuperación (Figura 11). Un aumento evidente en el porcentaje de células apoptóticas se observó desde las 3 horas en los grupos tratados conjuntamente con hipertermia y etanol comparado con el grupo tratado exclusivamente con hipertermia. El aumento máximo (3 veces) se alcanzó con la concentración más alta de etanol (1%). El nivel de potenciación fue similar cuando se

analizaron periodos de recuperación más prolongados (8-24 horas). De acuerdo con los resultados mostrados en las Figuras 7A y 7B, el tratamiento con etanol (0.25-1 %) a 37 °C no tuvo influencia en el número de células apoptóticas en condiciones basales (Figura 11), independientemente del periodo de recuperación utilizado.

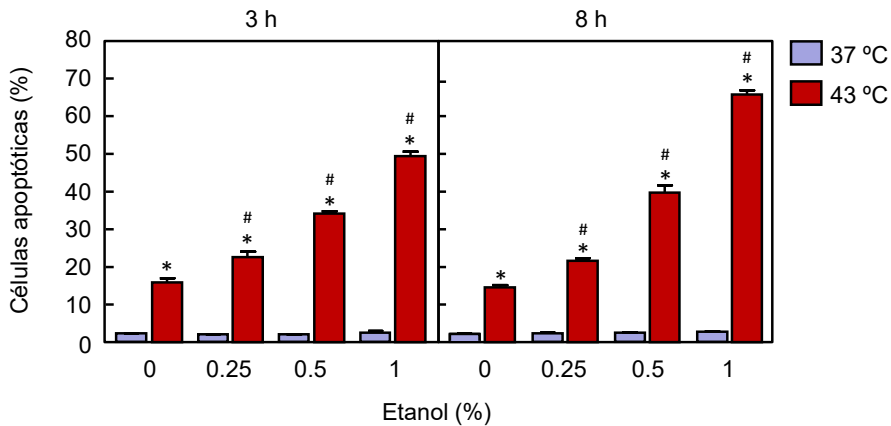


Figura 11. Efecto del etanol sobre la muerte celular por apoptosis en células U-937 expuestas a hipertermia. Las células fueron preincubadas en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante los periodos señalados. Seguidamente las células se recolectaron y el porcentaje de las mismas con un contenido sub-G₁ de ADN se determinó por citometría de flujo, utilizando el método de tinción con yoduro de propidio. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

La doble tinción de las células con yoduro de propidio y anexina V-FITC y el posterior análisis por citometría de flujo reveló un aumento en el porcentaje de células anexina V positivas (i.e., células apoptóticas) en respuesta a la hipertermia (11.7%) o a hipertermia combinada con etanol (34.6%) en comparación con los controles respectivos (1.6%) (Figura 12). El aumento del porcentaje de células en el cuadrante inferior derecho en el grupo de hipertermia más etanol comparado con el grupo tratado solo con hipertermia (3 veces, 34.6% vs. 11.7%) fue similar al aumento del porcentaje de células en la fracción Sub-G₁ del ciclo celular (Figuras 10 y 11). No se detectó aumento en el número de células necróticas primarias ni secundarias (procedentes de las células apoptóticas) en respuesta al tratamiento solo con hipertermia

(2.5% vs. 3.4%) o con hipertermia más etanol (2.6% vs. 4.0%), como se observa en los correspondientes cuadrantes superiores derechos (Figura 12), lo que sugiere que esa modalidad de muerte celular no es activada en estas condiciones.

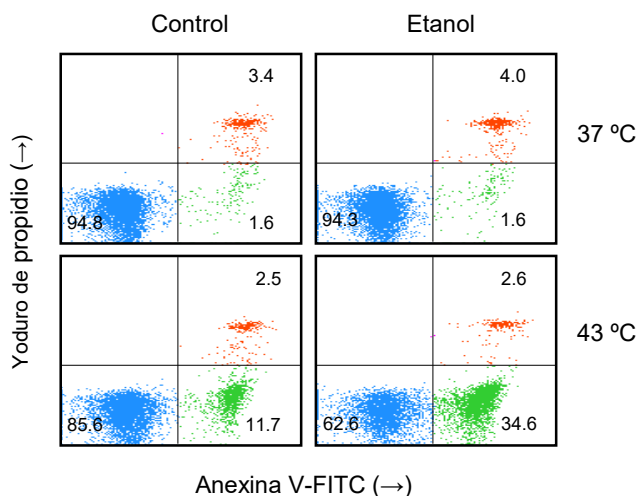


Figura 12. Efecto del etanol sobre la muerte celular por apoptosis en células U-937 expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia o presencia de 0.5% de etanol durante 30 min, se expusieron a hipertermia (30 min a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante 3 horas. Seguidamente las células se recogieron, se tiñeron con yoduro de propidio y con anexina V-FITC, y se analizaron mediante citometría de flujo.

Efecto diferencial del etanol sobre la muerte celular por apoptosis activada por la hipertermia en células leucémicas humanas

Para determinar si el efecto potenciador del etanol sobre la apoptosis observado en células U-937 expuestas a hipertermia es extensible a otras líneas de leucemia humanas, las líneas celulares HL-60 (células de leucemia mieloide aguda), K-562 (células de leucemia mieloide crónica) y MOLT-3 (células de leucemia linfoblástica aguda T) fueron incluidas en este estudio. Estas células se preincubaron a 37 °C en ausencia o presencia de etanol, se trataron con hipertermia y, después de un periodo de recuperación especificado para cada línea celular, se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el procedimiento de

tinción con yoduro de propidio. Como se muestra (Figura 13A), el porcentaje de células apoptóticas aumentó en HL-60 en respuesta a la hipertermia en comparación con el control (25% vs. 4%) y el etanol (0.25%-1%) incrementó la eficacia de este tratamiento sin afectar a la apoptosis basal, de manera similar a lo observado en células U-937. Con la concentración más elevada de etanol utilizada (1%), se logró duplicar el porcentaje de células apoptóticas en comparación con las células tratadas solamente con hipertermia (52% vs. 25%). Se muestran histogramas representativos del efecto del etanol sobre la apoptosis inducida por hipertermia en HL-60 (Figura 13B).

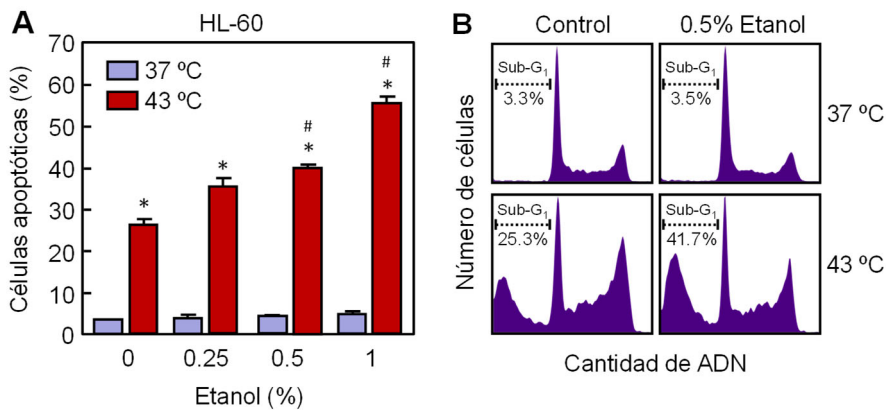


Figura 13. Efecto del etanol sobre la muerte celular por apoptosis en las células de leucemia humana HL-60 expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante 3 horas. (A) Las células se recogieron y la distribución celular según su contenido de ADN (fases del ciclo) se determinó mediante citometría de flujo, utilizando el procedimiento de tinción con yoduro de propidio. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas (i.e., células con un contenido sub-G₁ de ADN). (B) Las células se recogieron y la distribución celular según su contenido de ADN se determinó mediante citometría de flujo, de la misma forma que en el apartado anterior; la posición de las células apoptóticas se indica mediante una línea de puntos. Se muestran histogramas representativos y se indica el porcentaje de células apoptóticas, incluidas en la región sub-G₁. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

La maquinaria apoptótica también es activada por el calor en las células MOLT-3 (Figura 14A), detectándose un aumento importante en el número de células apoptóticas después del tratamiento con

hipertermia, en comparación con las células no expuestas a esas condiciones (22% vs. 5%). El etanol, sin embargo, no tuvo influencia sobre la apoptosis inducida por hipertermia en estas células ni sobre la apoptosis basal. Se muestran histogramas representativos del efecto del etanol sobre la apoptosis inducida por hipertermia en células MOLT-3 (Figura 14B).

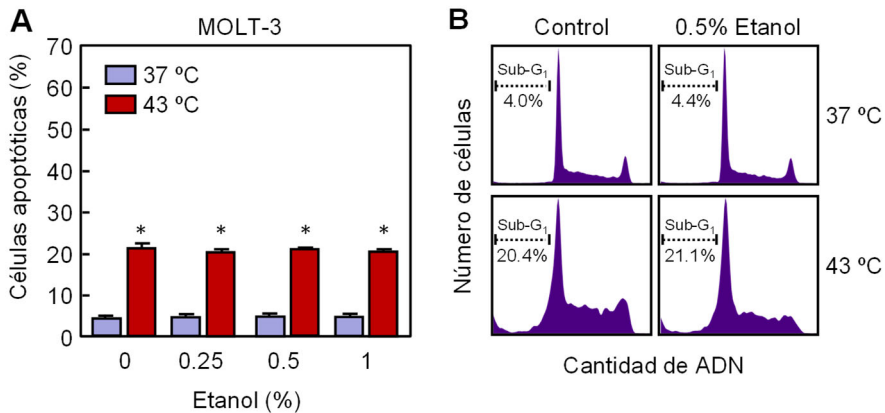


Figura 14. Efecto del etanol sobre la muerte celular por apoptosis en las células de leucemia humana MOLT-3 expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante 3 horas. (A) Las células se recogieron y la distribución celular según su contenido de ADN (fases del ciclo) se determinó mediante citometría de flujo, utilizando el procedimiento de tinción con yoduro de propidio. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas (i.e. células con un contenido sub-G₁ de ADN). (B) Las células se recogieron y la distribución celular según su contenido de ADN se determinó mediante citometría de flujo, de igual forma que en el apartado anterior; la posición de las células apoptóticas se indica mediante una línea de puntos. Se muestran histogramas representativos y se indica el porcentaje de células apoptóticas, incluidas en la región sub-G₁. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

También se incluyó en este estudio a las células K-562 porque es conocido que presentan resistencia a la apoptosis en condiciones de estrés térmico [62]. Estas células se trataron con hipertermia y se permitió su recuperación a 37 °C durante 24 horas. Como cabía esperar (Figura 15A), la proporción de células apoptóticas solo aumentó ligeramente en respuesta a la hipertermia en comparación con las células no tratadas (7% vs. 3%). Cuando se incluyó el etanol

(0.25%-1%), la eficacia de la hipertermia para inducir la apoptosis no mejoró sustancialmente. Se muestran histogramas representativos del efecto del etanol sobre la apoptosis inducida por hipertermia en la línea celular K-562 (Figura 15B).

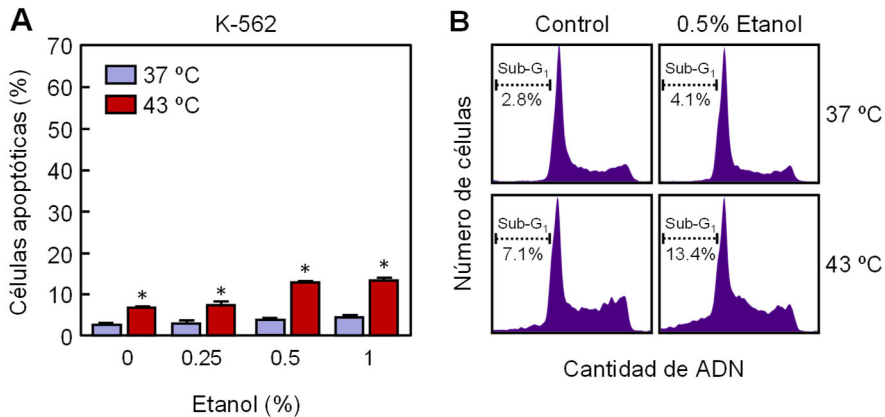


Figura 15. Efecto del etanol sobre la muerte celular por apoptosis en las células de leucemia humana K-562 expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia (control) o en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante 24 horas. (A) Las células se recogieron y la distribución celular según su contenido de ADN (fases del ciclo) se determinó mediante citometría de flujo, utilizando el procedimiento de tinción con yoduro de propidio. Se muestra el porcentaje de células apoptóticas (i.e. células con un contenido sub-G₁ de ADN). (B) Las células se recogieron y la distribución celular según su contenido de ADN se determinó mediante citometría de flujo, de la misma forma que en el apartado anterior; la posición de las células apoptóticas se indica mediante una línea de puntos. Se muestran histogramas representativos y se indica el porcentaje de células apoptóticas incluidas en la región sub-G₁. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

En consonancia con los resultados anteriores, el estudio sobre la viabilidad celular utilizando el procedimiento de reducción del MTT indica que el etanol, con una relación evidente de dependencia de la concentración utilizada, potencia la citotoxicidad de la hipertermia en las células HL-60 pero no en las células MOLT-3 o K-562 (Figura 16). Estos resultados en células leucémicas humanas demuestran también que, en las condiciones y periodos de tiempo analizados, el etanol por sí mismo no presenta efectos apreciables sobre la apoptosis ni sobre la viabilidad celular; sin embargo, este alcohol modula de forma

diferencial la respuesta apoptótica frente a la hipertermia en estas células.

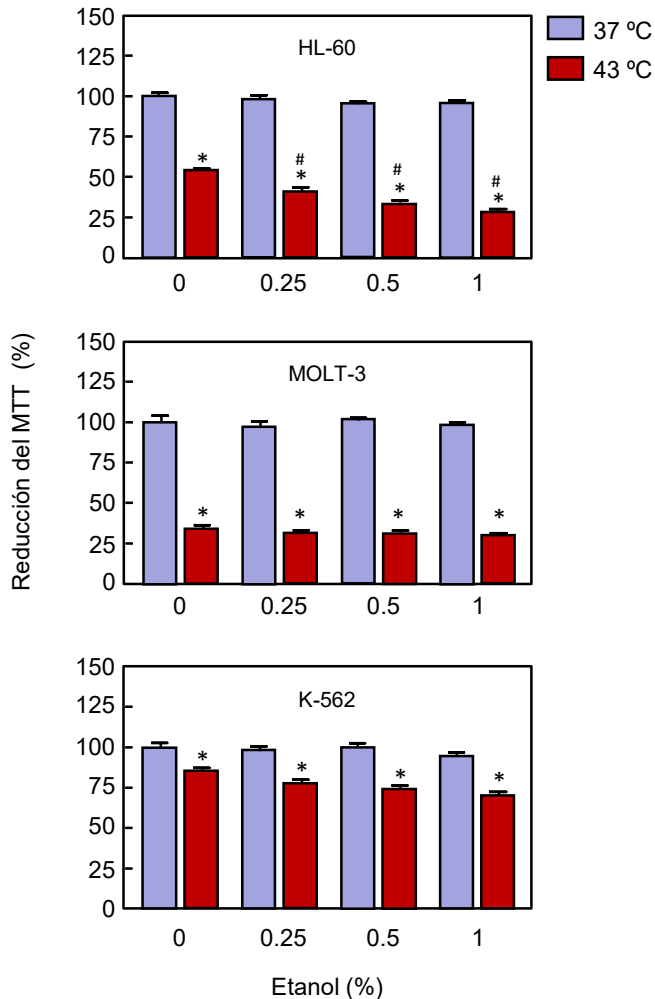


Figura 16. Efecto del etanol sobre la viabilidad en las células de leucemia humana expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación a 37 °C durante 24 horas. Las células se recogieron y la actividad mitocondrial (i.e. viabilidad celular) se determinó mediante el ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio (MTT). * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

El procesamiento y la actividad catalítica de las caspasas aumenta por el etanol en células U-937 expuestas a hipertermia

Uno de los marcadores moleculares más importantes en la inducción de la apoptosis, tanto en las células normales como en las tumorales, es la activación de las caspasas, una clase de enzimas con actividad endopeptidasa que desempeña una función clave en este tipo de muerte celular. Para determinar el papel que juegan estas enzimas proteolíticas en el efecto del etanol sobre la apoptosis provocada por la hipertermia se obtuvieron lisados de células U-937 y se analizaron posteriormente mediante western blot. Como puede observarse, la combinación de la hipertermia y el etanol fue más efectiva que el tratamiento solo con hipertermia respecto a la estimulación del procesamiento y activación de la procaspasa-3, la procaspasa-8 y la procaspasa-9 (Figura 17).

La mayoría de las proteínas que sufren proteólisis durante la apoptosis por acción de las caspasas, que pueden ser cientos o miles, no tienen establecido un papel definido en los eventos que caracterizan a esta forma de muerte celular [47]. Una proteína con una función destacable es *poli(ADP-ribosa) polimerasa-1* (PARP-1), una enzima que se encuentra en el núcleo en cantidades abundantes y desempeña un papel esencial en la integridad del ADN, al formar parte del sistema de reparación por escisión de bases (BER) y cooperar en otros procesos de reparación del genoma [68,69]. Dado que PARP-1 es un sustrato específico de la caspasa-3, el análisis del procesamiento de esta proteína nuclear mediante western blot es de gran utilidad ya que permite confirmar que ha habido activación intracelular de la caspasa. La Figura 17 muestra que, efectivamente, el tratamiento con hipertermia promueve la rotura de PARP-1 (116 kDa), detectándose un fragmento (inactivo) de 85 kDa.

El efecto potenciador del etanol sobre la apoptosis inducida por hipertermia fue dependiente de la concentración del alcohol, lográndose los niveles máximos de procesamiento proteolítico de la procaspasa-3, la procaspasa-8 y la procaspasa-9 con la concentración

más alta utilizada (1%). La incubación de las células a 37 °C en presencia de etanol no tuvo ningún efecto apreciable sobre el procesamiento de las procaspasas analizadas, en consonancia con los resultados mostrados anteriormente en las Figuras 10, 11 y 12.

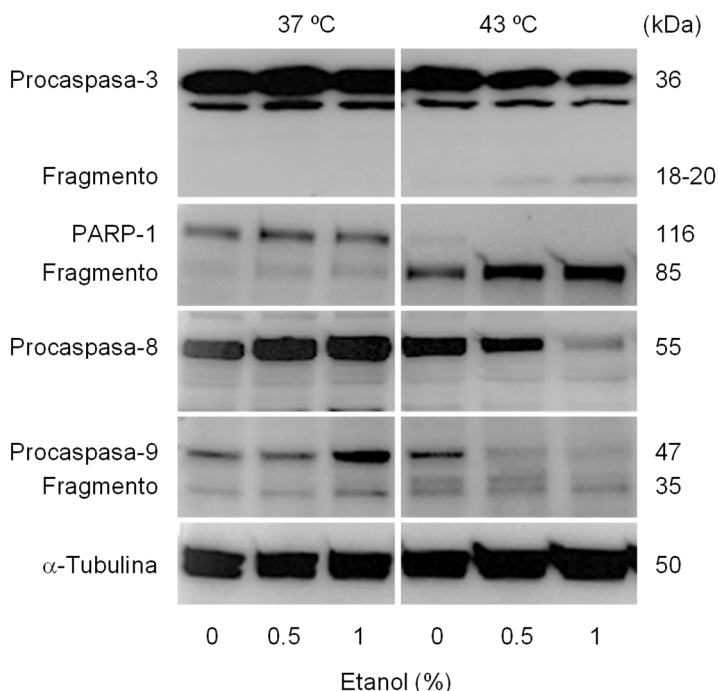


Figura 17. Efecto del etanol sobre el procesamiento proteolítico de las procaspasas en células U-937 tratadas con hipertermia. Las células se preincubaron en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación durante 3 horas. La escisión de las procaspasas indicadas se analizó mediante western blot; la α -tubulina se incluyó como control de carga homogénea de proteínas en los diferentes canales del gel.

Para confirmar que la hidrólisis de las procaspasas examinadas por western blot estaba asociada con un aumento de la actividad enzimática, se obtuvieron lisados celulares y se analizó la hidrólisis de los sustratos tetrapeptídicos Ac-DEVD-*p*NA (caspasa-3), Ac-IETD-*p*NA (caspasa-8) y Ac-LEHD-*p*NA (caspasa-9). Los resultados (Figura 18) muestran que la exposición a la hipertermia aumenta la actividad enzimática de la caspasa-3 (2 veces), la caspasa-8 (1.3 veces) y la

caspasa-9 (1.4 veces), y que el etanol incrementa notablemente la eficacia de la hipertermia en relación a la capacidad de inducción de la actividad catalítica de estas proteasas.

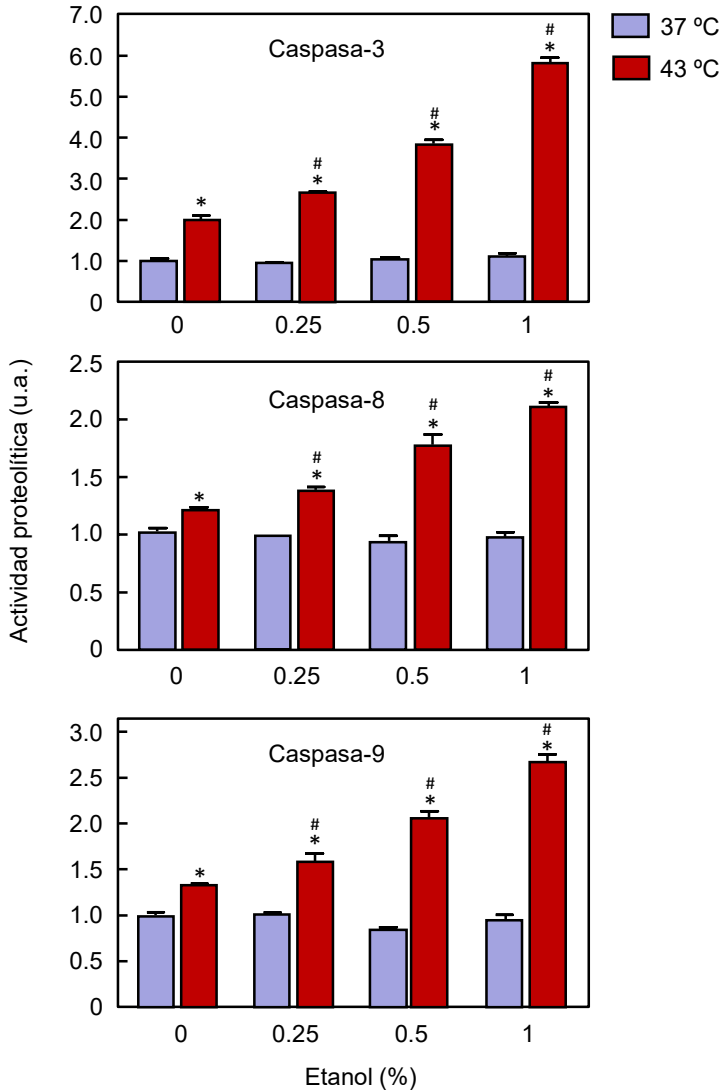


Figura 18. Efecto del etanol sobre la actividad enzimática de las caspasas en células U-937 tratadas con hipertermia. Las células se preincubaron en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se permitió su recuperación durante 3 horas. Se obtuvieron los lisados celulares y se determinó la actividad de las caspasas indicadas haciendo uso de sustratos colorimétricos específicos. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C); u.a. (unidades arbitrarias).

El efecto del etanol sobre las caspasas fue dependiente de su concentración, detectándose los niveles máximos de actividad catalítica (6 veces, 2.2 veces y 2.8 veces para la caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-9, respectivamente) con la concentración mayor del alcohol (1%). Como cabía esperar, en las células expuestas a hipertermia, el aumento en la actividad de las caspasas iniciadoras (i.e., caspasa-8 y caspasa-9) fue significativamente menor que la actividad obtenida para la caspasa-3, la principal caspasa ejecutora.

Además, consistente con los resultados de western blot anteriores (ver Figura 17), el tratamiento únicamente con etanol (0.25-1%) no tuvo efecto alguno sobre la actividad basal de las caspasas analizadas. En general, estos resultados sugieren que las dos modalidades de la apoptosis, la vía extrínseca (caspasa-8 dependiente) y la vía intrínseca (caspasa-9 dependiente), son activadas en las células U-937 expuestas a hipertermia y que el etanol desempeña un papel sensibilizador, promoviendo el incremento de la actividad de caspasa-3 y, por tanto, el desmantelamiento celular.

Las caspasas son esenciales en la inducción de la apoptosis por la hipertermia y en el aumento de la citotoxicidad por el etanol

La importancia de las caspasas en la inducción de la apoptosis por hipertermia y en la potenciación de este tipo de muerte celular por el etanol se determinó haciendo uso del inhibidor de caspasas de amplio espectro z-VAD-fmk. Como puede observarse (Figura 19), la preincubación de las células con este inhibidor bloqueó completamente la inducción de la muerte celular por hipertermia, tanto en ausencia como en presencia de etanol. Estos resultados sugieren que el efecto de este alcohol sobre la citotoxicidad inducida por la hipertermia es atribuible a un aumento en la actividad de las caspasas.

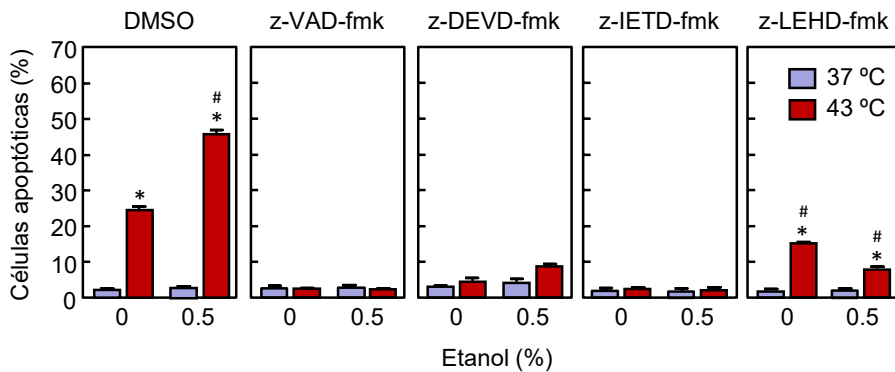


Figura 19. Efecto de los inhibidores permeables de las caspasas sobre la modulación de la apoptosis por etanol en células U-937 sometidas a hipertermia. Las células se trataron previamente durante 1 hora en ausencia (vehículo, DMSO al 0.1%) o en presencia de 100 μ M de z-VAD-fmk (inhibidor de caspasas de amplio espectro), 50 μ M de z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa-3), 50 μ M de z-IETD-fmk (inhibidor de caspasa-8) o 50 μ M de z-LEHD-fmk (inhibidor de caspasa-9). A continuación, las células se trataron con hipertermia (30 minutos a 43 °C) en ausencia o presencia de etanol (0.5%), se recogieron tras un periodo de recuperación de 3 horas y se analizaron por citometría de flujo utilizando el método de tinción con yoduro de propidio. * $p < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $p < 0.05$ vs. tratamiento con hipertermia solo (con DMSO) o hipertermia más etanol (con DMSO).

La vía extrínseca es imprescindible para la activación de la apoptosis inducida por la hipertermia y para la potenciación por el etanol

Para identificar con mayor precisión qué caspasas son importantes en la potenciación de la muerte celular por el etanol, las células U-937 se preincubaron con los inhibidores selectivos y permeables de las caspasas z-DEVD-fmk (inhibidor de caspasa-3), z-IETD-fmk (inhibidor de caspasa-8) o z-LEHD-fmk (inhibidor de caspasa-9) y, después de un periodo de tres horas de recuperación, se determinó el número de células apoptóticas mediante citometría de flujo.

Como se observa (Figura 19), los inhibidores de la caspasa-3 y de la caspasa-8 bloquearon completamente la inducción de la apoptosis en las células expuestas a hipertermia, así como en las células tratadas conjuntamente con hipertermia y etanol. Por el contrario, el inhibidor de caspasa-9 suprimió parcialmente la muerte celular apoptótica en células expuestas a hipertermia (24% en ausencia de inhibidor vs. 15%

en presencia de inhibidor), mientras que el bloqueo fue más efectivo en las células expuestas a hipertermia combinada con etanol (45% en ausencia de inhibidor vs. 8% en presencia de inhibidor). Estos resultados sugieren que la activación de la vía extrínseca de la apoptosis es esencial para la apoptosis inducida por hipertermia tanto en ausencia como en presencia de etanol. La vía intrínseca, sin embargo, contribuye parcialmente a la apoptosis inducida por el calor, pero desempeña un papel crucial en las células expuestas a la hipertermia en combinación con etanol.

El etanol potencia la liberación de factores apoptogénicos mitocondriales sin perturbar el potencial de la membrana mitocondrial en células U-937 expuestas a hipertermia

La liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol representa un acontecimiento clave en la activación de la caspasa-9 y, por tanto, de la vía intrínseca apoptótica. Como puede observarse (Figura 20), los ensayos de western blot revelaron que este factor apoptogénico solo se detecta levemente en la fracción citosólica de las células incubadas a 37 °C y que sus niveles basales no se ven afectados por el etanol. Por el contrario, los niveles de citocromo c aumentaron en respuesta al tratamiento con hipertermia. La presencia de etanol, de una manera dependiente de la concentración, potenció enormemente la liberación de esta importante proteína. Consistente con la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, la expresión de SMAC también aumentó considerablemente en el citosol de las células tratadas conjuntamente con hipertermia y etanol. Esta proteína proapoptótica solo se detectó muy ligeramente en las fracciones citosólicas de las células control o de las células tratadas únicamente con etanol. Es conocido que SMAC contribuye a la activación de la apoptosis al neutralizar la inhibición que ejercen sobre las caspasas diversos componentes de la familia de *proteínas con funciones inhibitoras de la apoptosis* (IAP) [70].

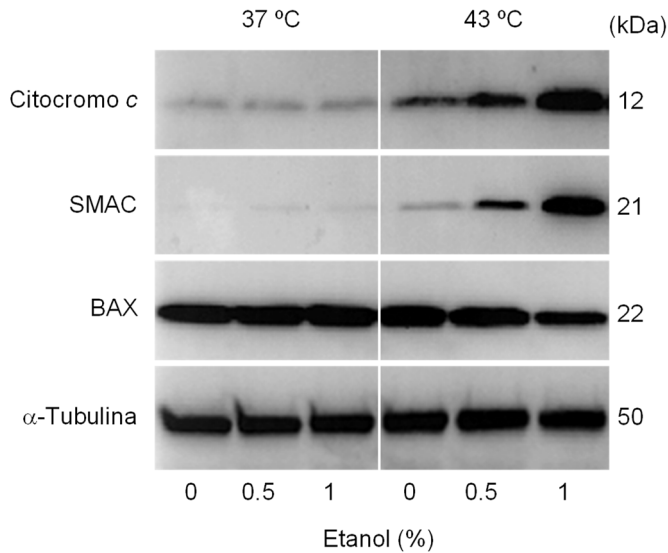


Figura 20. Efecto del etanol sobre factores proapoptóticos implicados en la vía mitocondrial de la apoptosis en células U-937 sometidas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y tras un periodo de recuperación de 3 horas se obtuvieron las fracciones citosólicas y se analizaron por western blot. La α -tubulina se utilizó como control de carga.

La liberación de factores proteicos mitocondriales del espacio intermembrana al citosol, como el citocromo c, puede estar causada por la permeabilidad mitocondrial transitoria, un aumento abrupto en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a moléculas de bajo peso molecular. Esto promueve la disipación del potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\psi_m$) y, por lo tanto, la inhibición de funciones mitocondriales esenciales como es la biosíntesis de ATP.

Para determinar si la liberación de citocromo c está asociada con la alteración del potencial mitocondrial transmembrana, las células se tiñeron con la sonda fluorescente JC-1 y se analizaron mediante citometría de flujo. Como se aprecia en la Figura 21A, un ligero aumento en la fracción de células con $\Delta\psi_m$ disminuido se detectó en las células tratadas con hipertermia en comparación con las células control (4% vs. 1%), análisis realizado después de 3 horas de recuperación. También se observó un modesto incremento en el porcentaje de células con $\Delta\psi_m$ disminuido en el grupo expuesto a

hipertermia en combinación con la concentración más alta de etanol, en comparación con el tratamiento únicamente con hipertermia (7% vs. 4%). El tratamiento solo con etanol (0.25-1%) no tuvo ninguna influencia sobre el potencial mitocondrial. De hecho, aunque la exposición a hipertermia provocó niveles máximos de células apoptóticas a las 3 horas de recuperación (ver Figura 10), solo un porcentaje reducido de células exhibió un $\Delta\psi_m$ disminuido a ese mismo tiempo (Figura 21A). Esto sugiere que la disipación marginal de $\Delta\psi_m$ observada es, probablemente, una consecuencia de la activación de las caspasas. Las células tratadas con el agente despolarizante cianuro de carbonilo 3-clorofenilhidrazona (CCCP) durante 30 minutos se incluyeron como control positivo; en estas condiciones más de un 95% de las células exhibieron un potencial de membrana mitocondrial reducido (Figura 21B).

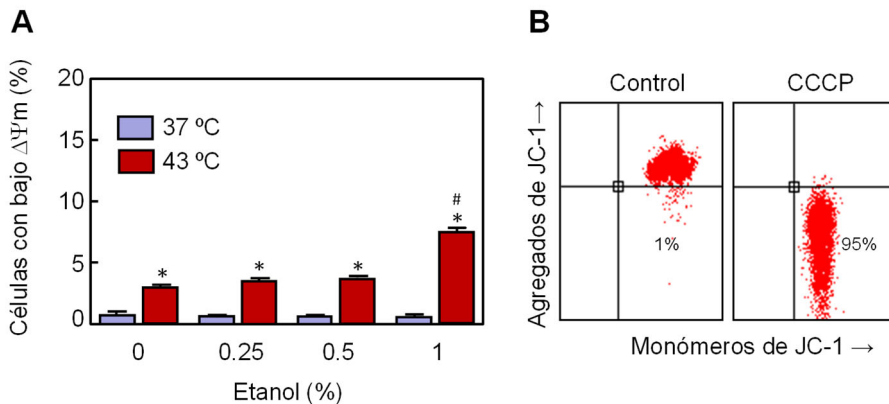


Figura 21. Efecto del etanol sobre el potencial mitocondrial transmembrana en células U-937 tratadas con hipertermia. (A) Las células se preincubaron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y tras un periodo de recuperación de 3 horas se evaluó el potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\psi_m$) mediante citometría de flujo, utilizando la sonda JC-1 (10 μ M). Se representa el porcentaje de células con un potencial mitocondrial transmembrana disminuido (bajo nivel de emisión de fluorescencia a 590 nm) (B) Las células tratadas con 50 μ M de CCCP durante 30 minutos se utilizaron como control positivo de despolarización. * $p < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $p < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

El etanol modula la expresión de los factores proapoptóticos y anti-apoptóticos de la familia BCL-2 en células U-937 expuestas a hipertermia

Dado que la vía intrínseca de la apoptosis está controlada por las proteínas de la familia BCL-2, la expresión de los miembros proapoptóticos BID y BAX se analizó mediante western blot a partir de lisados celulares. El primero de ellos es un reconocido sustrato de caspasa-8 que es transformado en su forma activa truncada (t-BID) y que desempeña un papel clave puesto que conecta las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Como puede apreciarse (Figura 22), la forma completa e inactiva de BID (i.e. forma no truncada, 25 kDa) disminuyó ligeramente en las células tratadas con hipertermia, lo que evidencia activación de este factor, mientras que en las células expuestas a hipertermia combinada con etanol la disminución fue mucho más intensa. Estos resultados están claramente en sintonía con un mayor aumento de la actividad caspasa-8 en las células expuestas a hipertermia con etanol, en comparación con las células tratadas solamente con hipertermia (ver Figura 17 y Figura 18).

Se sabe que, una vez activado, t-BID se asocia rápidamente con la membrana mitocondrial externa y promueve cambios conformacionales en los factores proapoptóticos BAX (citósólico) y BAK (mitocondrial) que, seguidamente, se insertan en la membrana mitocondrial para incrementar su permeabilidad [71]. De acuerdo con este modelo ampliamente aceptado, los niveles citosólicos de BAX (22 kDa) fueron notablemente más bajos en las células expuestas a hipertermia combinada con etanol en comparación con las células tratadas solo con hipertermia (Figura 20). Acorde con estos últimos resultados, el etanol no alteró el patrón de expresión de BAX a nivel celular, como refleja el análisis de los lisados celulares (Figura 22). Los miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2 desempeñan su papel uniéndose a proteínas con dominio BH3 para inhibir su interacción con BAX y con BAK, evitando la activación de estos, y su expresión puede verse influida por los estímulos apoptóticos [72]. Para determinar si el etanol promueve alteraciones en la expresión de estos factores

durante el tratamiento con hipertermia, se analizaron BCL-X_L, BCL-2 y MCL-1 mediante western blot (Figura 22). Los resultados revelaron que los niveles de BCL-X_L y BCL-2 no sufrieron modificación por los tratamientos, mientras que la expresión de MCL-1 disminuyó claramente por la hipertermia, y que el etanol, de manera dosis dependiente, aumentó el efecto de la hipertermia sobre los niveles de este factor antiapoptótico. La disminución de MCL-1 es un evento importante en la potenciación del etanol sobre la muerte celular inducida por hipertermia debido a que esta proteína puede inhibir la activación de la apoptosis al unirse con BAX y con BAK para alterar la formación de oligómeros [73].

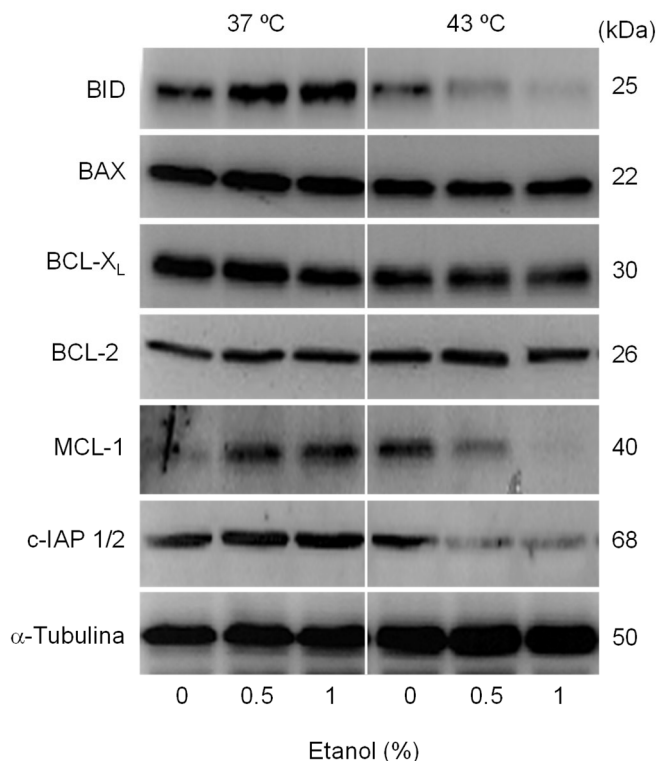


Figura 22. Efecto del etanol sobre la expresión de factores proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia BCL-2 en células U-937 tratadas con hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos, se expusieron a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y tras un periodo de recuperación de 3 horas se obtuvieron los lisados, que se analizaron posteriormente mediante western blot. La α-tubulina se utilizó como control de carga.

En conjunto, estos resultados sugieren que la potenciación de la liberación de citocromo *c* por el etanol en células tratadas con hipertermia parece ser independiente de la permeabilidad mitocondrial transitoria e implica la activación de los factores proapoptóticos BID y BAX y la disminución de la expresión del factor antiapoptótico MCL-1. También se sabe que la apoptosis está regulada negativamente por los miembros de la familia de proteínas IAP que inhiben la actividad de las caspasas al unirse directamente a las enzimas activas [70,74]. Es interesante añadir que el etanol en combinación con la hipertermia redujo en gran medida los niveles de c-IAP1/2, lo que puede contribuir al aumento del porcentaje de células apoptóticas observado en presencia del alcohol.

El etanol debe estar presente durante el periodo de tratamiento con hipertermia para lograr el efecto potenciador sobre la muerte celular

En todos los experimentos descritos anteriormente, el etanol siempre estuvo presente en el medio de cultivo durante los periodos de hipertermia y de recuperación a los que se sometieron las células. Con la finalidad de conocer si es necesario que el etanol esté presente durante el periodo de hipertermia para lograr la potenciación sobre la muerte celular, el alcohol (0.5% o 1%) se añadió a las células justo antes o inmediatamente después del tratamiento con hipertermia. Como era previsible y de acuerdo con los resultados expuestos anteriormente, la presencia del etanol durante el periodo de hipertermia potencia la muerte celular apoptótica y la citotoxicidad en comparación con el tratamiento solo con hipertermia (Figura 23A y Figura 23B, panel izquierdo). Por el contrario, si el alcohol se agrega inmediatamente después del régimen de hipertermia, una vez las células están a 37 °C, no se detecta efecto alguno sobre la apoptosis estimulada por el calor (Figura 23A, panel derecho). En consecuencia, tampoco se observaron diferencias respecto a la viabilidad celular en las células a las que se les añadió el etanol después del tratamiento con hipertermia, en comparación con las células expuestas solo a hipertermia (Figura 23B, panel derecho). En conjunto, estos resultados sugieren que la presencia del etanol durante el tratamiento con

hipertermia (30 minutos) es crítica para la potenciación de la citotoxicidad inducida por el calor.

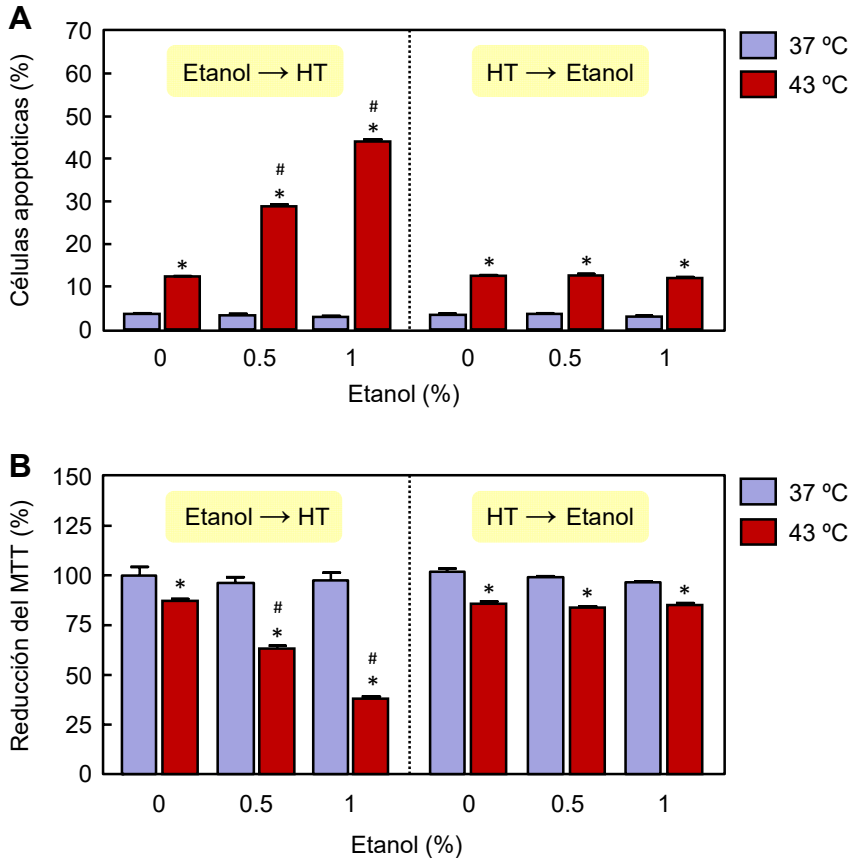


Figura 23. Impacto del momento de la adición de etanol en la modulación de la muerte celular provocada por hipertermia. Las células U-937 se trataron con las concentraciones indicadas de etanol antes (Etanol → HT, panel izquierdo) o después (HT → Etanol, panel derecho) de sumergirlas durante 30 minutos en un baño de agua a 37 °C o 43 °C, como se indica. (A) Las células se incubaron a 37 °C durante 3 horas de recuperación y el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo utilizando el procedimiento de tinción con yoduro de propidio. (B) Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas de recuperación y se determinó la actividad *succinato deshidrogenasa* mitocondrial a 570 nm mediante el ensayo de reducción del MTT, utilizando un lector de microplacas. * $p < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $p < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

El etanol no influye sobre la autofagia en células U-937 expuestas a hipertermia

La autofagia, también conocida como macroautofagia, es un mecanismo de autodigestión consistente en que parte del contenido celular (porción de citoplasma, orgánulos dañados, componentes celulares no deseados) es engullido por vesículas de doble membrana, los autofagosomas, y transferido posteriormente a los lisosomas para la degradación, reciclaje de los productos resultantes y obtención de energía en forma de ATP [75]. Aunque se sabe que la autofagia es un importante mecanismo de protección celular en condiciones de estrés como la falta de nutrientes, la eliminación de agregados proteicos (evitando la ubiquitinización excesiva y saturación del proteosoma) y mitocondrias dañadas, hay una compleja relación molecular entre la autofagia y la muerte celular mediante apoptosis y necrosis.

Las mitocondrias desempeñan un importante papel en la autofagia, ya que proveen membranas para la biogénesis de los autofagosomas durante la falta de nutrientes [76]. Aunque la autofagia a menudo precede a la apoptosis o necrosis, raramente constituye un mecanismo suicida y probablemente sea el reflejo del intento fallido de la célula para adaptarse al estrés. Es, por tanto, un mecanismo citoprotector más que citotóxico, aunque hay algunas excepciones [76]. En este sentido, se ha descrito que el etanol puede inhibir a la autofagia en diferentes tipos de células tumorales (U-937, MCF-7, Jurkat), e incrementar la susceptibilidad de las células a la apoptosis en condiciones de estrés por falta de nutrientes [56]. Con el fin de conocer si en condiciones de hipertermia existe alguna relación entre el etanol y la autofagia que justifique el aumento de la apoptosis, los niveles del activador alostérico de la autofagia Beclin-1 se analizaron por western blot en células U-937. Beclin-1 es una proteína que forma parte del complejo molecular de clase III con actividad fosfatidilinositol 3-quinasa, necesario para la formación de los autofagosomas. En su estado inactivo, Beclin-1 se localiza en la membrana mitocondrial, interaccionando a través de su dominio BH3 con los factores antiapoptóticos BCL-2, BCL-X_L o MCL-1 [77]. Los estímulos que

desencadenan la separación de Beclin-1 promueven la autofagia ya que está disponible para incorporarse a la vía [78]. Uno de los desencadenantes de la liberación de Beclin-1 es la activación de la *proteína quinasa activada por AMP* (AMPK) por déficit de glucosa, al fosforilar los residuos S93 y S96 de la región *N*-terminal del activador y provocar que este pierda afinidad por los factores antiapoptóticos [78]. Nuestros resultados indican un ligero aumento de los niveles Beclin-1 en las células expuestas a hipertermia y que el etanol no altera su expresión (Figura 24A).

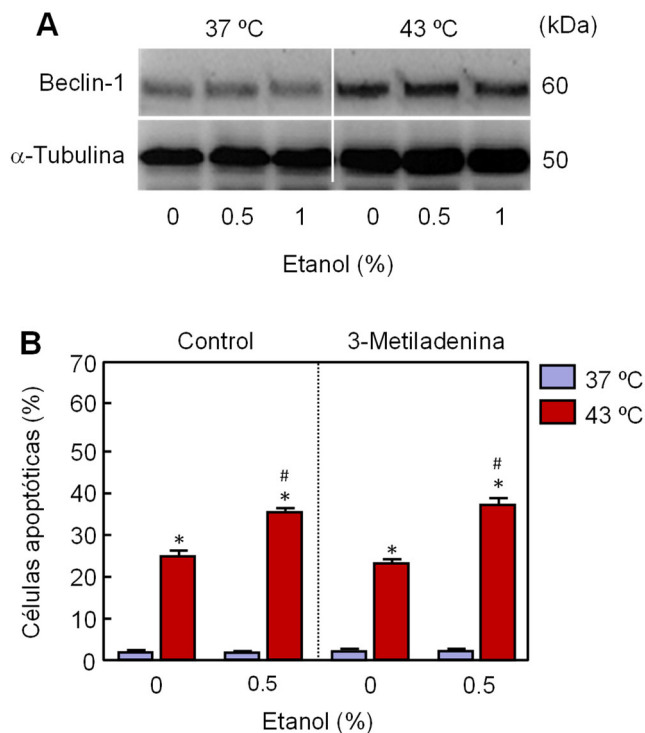


Figura 24. Efecto del etanol sobre la autofagia en las células U-937 expuestas a hipertermia. (A) Las células se preincubaron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a continuación a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y seguidamente al periodo de recuperación (3 horas a 37 °C). Se obtuvieron los lisados celulares y los niveles del marcador de autofagia Beclin-1 se determinó mediante western blot. Como control de carga también se determinó la α -tubulina. (B) Las células se preincubaron en ausencia o presencia del inhibidor de la autofagia 3-metiladenina (5 mM) durante 2 horas a 37 °C. A continuación, los grupos experimentales anteriores se desdoblaron e incubaron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de etanol

durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente las células se trataron con hipertermia (30 minutos a 43 °C) y tras el periodo de recuperación (3 horas a 37 °C) se tiñeron con yoduro de propidio; el porcentaje de células apoptóticas se determinó por citometría de flujo. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

El papel de la autofagia se investigó, además, haciendo uso del inhibidor 3-metiladenina. Esta purina bloquea específicamente la actividad enzimática del complejo molecular de la clase III de fosfatidilinositol 3-quinasa, impidiendo la iniciación del proceso. En consonancia con los resultados anteriores, cuando las células fueron preincubadas con 3-metiladenina no se observaron cambios en la tasa de apoptosis en las células tratadas con hipertermia, ni en las células expuestas a hipertermia en combinación con etanol. Estos resultados sugieren que la potenciación de la apoptosis favorecida por el etanol en condiciones de hipertermia no parece implicar a la autofagia (Figura 24B).

Las especies reactivas de oxígeno no están involucradas en la potenciación de la muerte celular por el etanol en células U-937 expuestas a hipertermia

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son productos del metabolismo celular debidos a una reducción parcial del oxígeno molecular. Aunque se producen constantemente, las células disponen de diferentes mecanismos para mantener las concentraciones de estas especies químicas tóxicas dentro de unos márgenes tolerables.

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) constituye la fuente primaria de los radicales de oxígeno endógenos. El principal lugar de producción del anión superóxido es la mitocondria, debido a la actividad de la cadena transportadora de electrones durante la formación de ATP. Se estima que aproximadamente el 1% del oxígeno consumido por la mitocondria durante este proceso acaba transformándose en anión superóxido, considerado en este caso un subproducto. Este orgánulo es, por tanto, el principal contribuidor del contenido de ROS intracelular [79].

Una segunda fuente endógena de ROS es la actividad enzimática de la familia *NADPH oxidasa* (NOX), constituida por siete miembros (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 y DUOX2). Estas enzimas se expresan en diferentes tejidos y se localizan en la membrana celular o en compartimentos intracelulares como mitocondria, retículo endoplasmático o en la envuelta nuclear. Los productos que se generan a partir del sustrato de la reacción, NADPH, son el anión superóxido (NOX1-5) o el anión superóxido más peróxido de hidrógeno (DUOX1-2). Estas especies reactivas de oxígeno no son subproductos de la reacción y, por lo tanto, desempeñan funciones celulares específicas [80,81]. Además de las dos anteriores, una tercera fuente de generación de ROS es la enzima *xantina oxidasa*, responsable de la formación de ácido úrico durante última etapa del catabolismo de los nucleótidos purínicos. Como subproductos se obtienen el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno [82].

Las células tumorales presentan niveles más elevados de ROS que las células sanas y sus efectos se contrarrestan con una mayor actividad de las enzimas antioxidantes. Se ha demostrado que la sobreproducción de ROS en el cáncer induce una variedad de efectos biológicos entre los que se incluyen mayor proliferación celular, daño en el ADN e inestabilidad genética, autofagia y muerte celular [83].

Puesto que se ha descrito que la hipertermia y el etanol pueden desencadenar estrés oxidativo [83-85] y afectar a la viabilidad celular, se decidió investigar si las especies reactivas de oxígeno desempeñan algún papel en el efecto potenciador del etanol sobre la hipertermia en células U-937. Para llevar a cabo el análisis, las células se incubaron con las sondas DHE o H₂-DCF-DA, sensibles a la oxidación por el anión superóxido y por el peróxido de hidrógeno, respectivamente, y la fluorescencia emitida se determinó por citometría de flujo. Los resultados indican que no hay alteraciones en los niveles basales de las especies reactivas de oxígeno cuando las células son tratadas con hipertermia o con hipertermia combinada con etanol, y que el alcohol, por sí mismo, carece de efecto sobre formación basal de esas especies químicas (Figura 25A y Figura 25B).

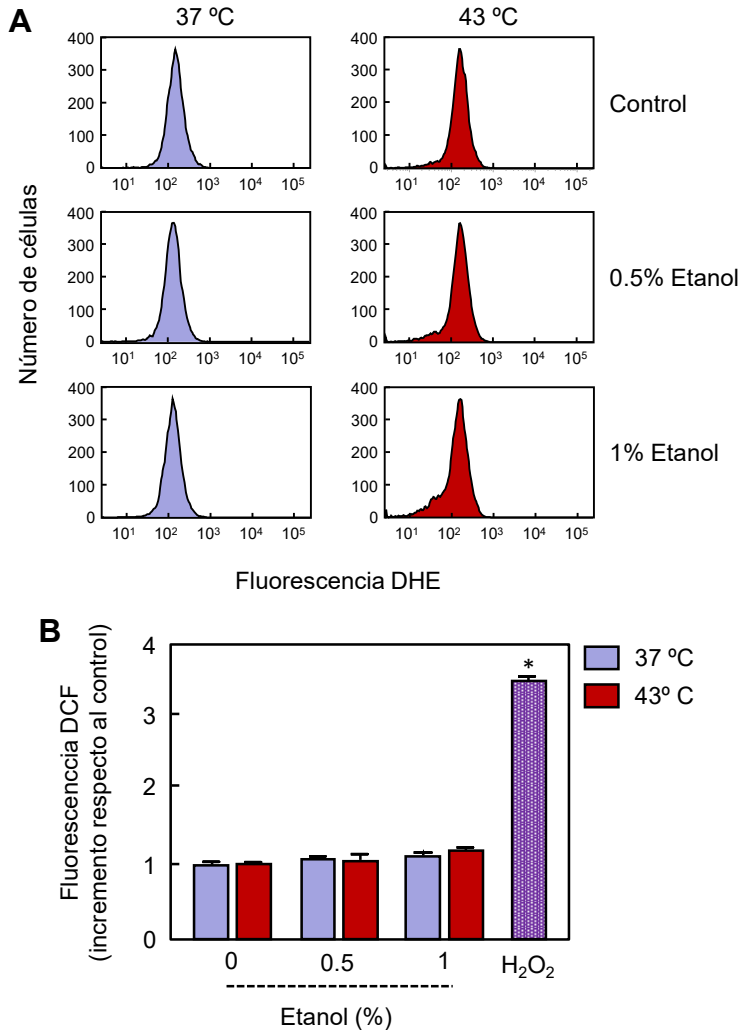


Figura 25. Efecto del etanol sobre la formación de especies reactivas de oxígeno en las células U-937 expuestas a hipertermia. Las células se preincubaron en ausencia o presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 30 minutos a 37 °C, se expusieron a continuación a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y seguidamente se incubaron durante 1 hora a 37 °C (periodo de recuperación). (A) Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con la sonda DHE (10 μ M), sensible al anión superóxido, y la fluorescencia emitida por la sonda oxidada se determinó por citometría de flujo. Se presentan histogramas representativos. (B) Las células se incubaron durante 30 minutos a 37 °C con la sonda H₂-DCF-DA (10 μ M), sensible al peróxido de hidrógeno, y la fluorescencia emitida por la sonda oxidada se determinó por citometría de flujo. Se representa la intensidad de la fluorescencia media, determinada a partir de los correspondientes histogramas. Como control positivo se utilizaron células tratadas con 300 μ M de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 1 hora a 37 °C. *P<0.05 vs. control (ausencia de etanol, a 37 °C).

Con el fin de confirmar que las especies reactivas de oxígeno no desempeñan un papel relevante en el efecto del etanol sobre la hipertermia, las células se cultivaron en presencia de una variedad de antioxidantes como *N*-acetil-L-cisteína (NAC), glutatión (GSH), inhibidores de actividades enzimáticas productoras de ROS endógeno como el alopurinol (inhibidor de *xantina oxidasa*) o el cloruro de difenilenoyodonio (DPI, inhibidor de *NADPH oxidasa*), y Tiron, un antioxidante exógeno, no tóxico, que se concentra en la mitocondria y donde desempeña una función dual: neutraliza al anión superóxido generado en este orgánulo y previene que ocurra la reacción de Fenton al actuar como quelante de metales [86]. En línea con los resultados anteriores (ver Figura 25), los antioxidantes fueron incapaces de bloquear el efecto del etanol sobre la apoptosis en células expuestas a hipertermia (Figura 26), lo que sugiere que los sistemas de señalización que conducen a la potenciación por el alcohol son independientes de la generación de ROS.

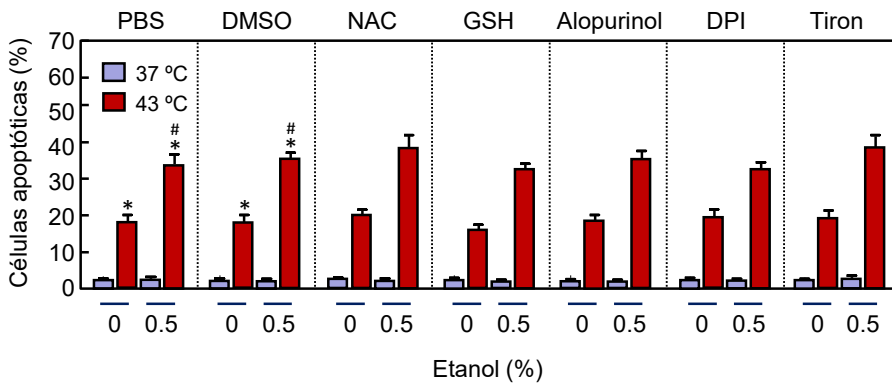


Figura 26. Efecto de los antioxidantes sobre la potenciación de la apoptosis por el etanol en las células U-937 expuestas a hipertermia. Las células se pretrataron con los antioxidantes *N*-acetil-L-cisteína (NAC, 5 mM), glutatión (GSH, 1 mM), alopurinol (10 μ M), cloruro de difenilenoyodonio (DPI, 20 μ M) o Tiron (20 μ M) durante 2 horas a 37 °C. Seguidamente, los grupos experimentales anteriores se desdoblaron e incubaron en ausencia o presencia de etanol (0.5%) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se trataron a continuación con hipertermia (30 minutos a 43 °C) a lo que le siguió el periodo de recuperación (3 horas a 37 °C). Finalmente, las células se tiñeron con yoduro de propidio y el porcentaje de células apoptóticas se determinó por citometría de flujo. * $P < 0.05$ vs. control respectivo a 37 °C; # $P < 0.05$ vs. tratamiento solo con hipertermia (43 °C).

La expresión de HSP70 inducida por la hipertermia es bloqueada en las células donde el etanol potencia la apoptosis

Está ampliamente acreditado que la hipertermia es un potente inductor de la respuesta al estrés caracterizado por la estimulación de la expresión de las proteínas del choque térmico, entre las que se encuentra HSP70. Esta proteína es una chaperona molecular ubicua, presente en todos los organismos, que también puede aumentar en las células en respuesta a otros estímulos como la isquemia, los metales pesados, los agentes oxidantes y el déficit de nutrientes. La función de la proteína HSP70 es, por tanto, promover la supervivencia de las células frente a los desafíos, internos y externos, que tienen el potencial de producir el daño y la muerte celular. En las células eucariotas la proteína HSP70 se encuentra principalmente en el citosol y en el núcleo, aunque también puede localizarse en otros compartimentos u orgánulos como el retículo endoplasmático y las mitocondrias, respectivamente, pudiendo también ser liberada al espacio extracelular.

Puesto que HSP70 ha demostrado ser una poderosa proteína antiapoptótica que puede bloquear la apoptosis en distintos niveles del proceso, como la translocación y activación mitocondrial de BAX, la formación del complejo de señalización inductor de muerte y la formación del apoptosoma, entre otros [87], se decidió analizar el efecto de etanol sobre su expresión mediante western blot. Para realizar este estudio se utilizaron células previamente identificadas como sensibles (U-937 y HL-60) o resistentes (MOLT-3) a la potenciación de la muerte celular por el etanol en condiciones de hipertermia. Como puede observarse (Figura 27), la hipertermia aumentó los niveles basales de HSP70 en las tres líneas celulares analizadas y el etanol bloqueó en diferente extensión la expresión de esta proteína, tanto en las células U-937 como en las células HL-60. El alcohol, sin embargo, fue incapaz de suprimir el aumento de la expresión de HSP70 en las células MOLT-3 tratadas con hipertermia.

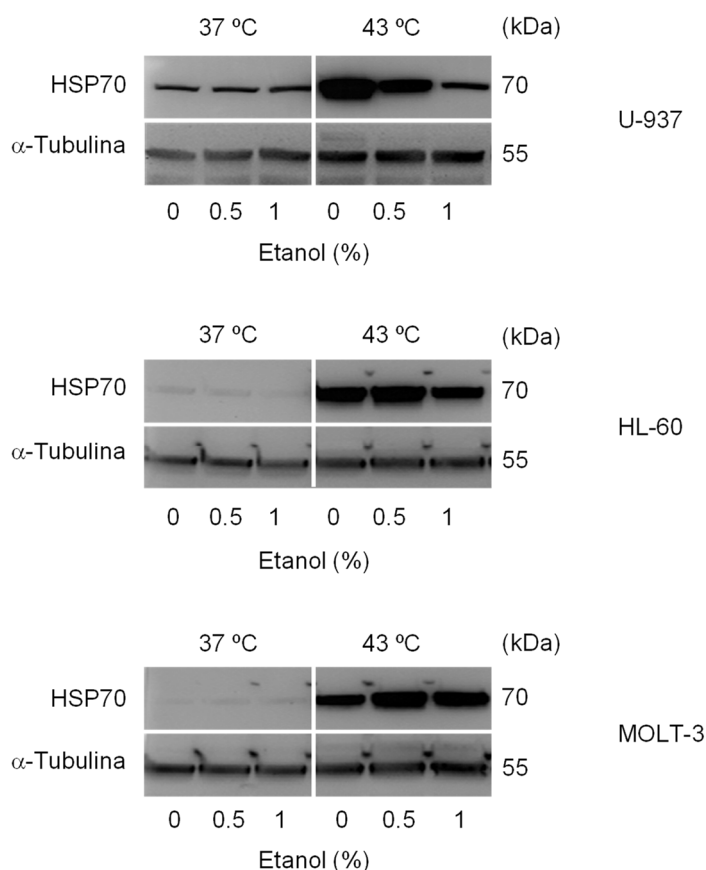


Figura 27. Impacto del etanol sobre la expresión de HSP70. Las células se expusieron a hipertermia (30 min a 43 °C) en presencia de las concentraciones indicadas de etanol y a continuación se permitió la recuperación de las mismas a 37 °C durante 3 horas (U-937) o durante 8 horas (HL-60 y MOLT-3). Se prepararon lisados celulares y se analizaron los niveles de HSP70 mediante western blot; como control de carga también se determinó la α-tubulina.

El etanol no modifica la capacidad citotóxica del etopósido

Para profundizar en la importancia de HSP70, las células U-937 se trataron con etopósido (1–10 μM), un agente antitumoral ampliamente conocido que induce citotoxicidad a través de un mecanismo que es independiente de la regulación positiva de HSP70 [88]. Los resultados revelaron que si las células se pretratan con etanol

(0.5%-1%), la citotoxicidad del etopósido (Figura 28A) así como la expresión de HSP70 (Figura 28B) no se ven afectadas. Como control positivo, en un experimento paralelo, las células también se expusieron solo a hipertermia (30 minutos a 43 °C) y se analizó la expresión de HSP70 mediante western blot (Figura 28B).

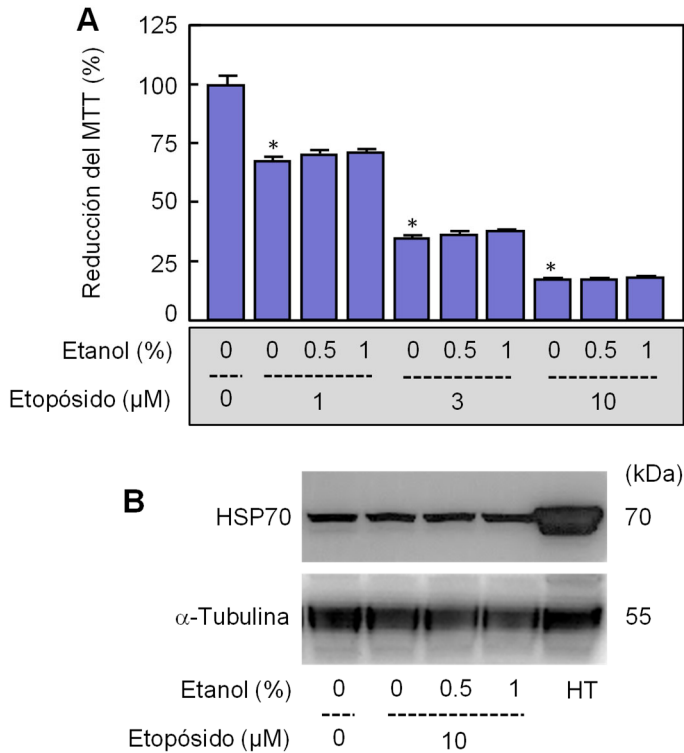


Figura 28. Impacto del etanol sobre la viabilidad y la expresión de HSP70 en células tratadas con el agente antitumoral etopósido. (A) Las células U-937 se incubaron con etopósido (1–10 μM) en presencia de las concentraciones especificadas de etanol a 37 °C durante 24 horas y la actividad citotóxica se determinó mediante el ensayo de reducción del MTT. (B) Las células U-937 se incubaron con etopósido (10 μM) en presencia de las concentraciones indicadas de etanol durante 6 horas y la expresión de HSP70 se determinó mediante western blot a partir de los lisados celulares. Como control positivo se utilizó el lisado de células U-937 tratadas con hipertermia (HT, 30 minutos a 43 °C) e incubadas a continuación a 37 °C durante el mismo tiempo anterior (6 horas). Como control de carga durante la electroforesis se utilizó α-tubulina. *p<0.05 vs. control respectivo a 37 °C; #p<0.05 frente al tratamiento solamente con hipertermia (43 °C).

La hipertermia es una opción realista de tratamiento contra el cáncer, ya que la elevación de la temperatura del tejido afectado, en el intervalo de 40 °C a 43 °C, puede reducir la capacidad proliferativa de las células cancerosas y estimular los mecanismos que conducen a su muerte celular. La hipertermia como modalidad terapéutica antitumoral se ha venido utilizando en combinación con la quimioterapia o la radioterapia [89,90].

Existen distintas estrategias en el área de la física para inducir hipertermia, entre las que se encuentran el uso de la radiación electromagnética, los ultrasonidos, la perfusión hipertérmica y el calentamiento conductivo [91]. Para el tratamiento local se están utilizando nanopartículas con fuentes de energía externas apropiadas [92-94]. También se están investigando otros mecanismos para tratar de mejorar la eficacia terapéutica del calor; en este contexto, las propiedades citotóxicas de la hipertermia sobre las células de leucemia, de melanoma, de carcinoma de pulmón y de cáncer de colon, entre otras, han mejorado notablemente mediante el uso de compuestos químicos que sensibilizan a las células [95-103].

En el presente estudio se investigó el efecto del etanol sobre la citotoxicidad exhibida por la hipertermia en las células leucémicas, ya que se sabe que este alcohol mejora las propiedades antitumorales de la radiación e incrementa la eficacia de los agentes quimioterapéuticos como TRAIL [56-59,61]. Numerosos estudios han descrito que la hipertermia disminuye la viabilidad celular principalmente mediante la inducción de la muerte celular por apoptosis [104-107]. Los resultados que se presentan en este trabajo demuestran que el etanol mejora la muerte celular apoptótica en las células leucémicas U-937 y HL-60 expuestas a hipertermia. El efecto de sensibilización del alcohol sobre las células U-937 se detectó tras 3 horas de recuperación y se prolongó al menos durante 24 horas. Investigaciones de otros autores han puesto de manifiesto que el propio etanol puede reducir la proliferación de las células cancerosas mediante mecanismos que implican la apoptosis y que generalmente requieren tiempos de incubación prolongados [108,109]. En nuestras condiciones

experimentales y con las células leucémicas estudiadas (U-937, HL-60, MOLT-3 y K-562), el etanol, a las concentraciones utilizadas, por sí solo no induce apoptosis ni reduce la proliferación celular incluso durante periodos prolongados de tiempo de tratamiento (24 h).

Se ha descrito que el etanol en condiciones de inanición sérica puede estimular la apoptosis mediante la inhibición de la autofagia [56]. En células U-937 hemos observado un aumento marginal en los niveles del marcador de autofagia Beclin-1 debido a la hipertermia, pero la cantidad de esta proteína no se vio afectada por el tratamiento con el etanol. Esto sugiere que este alcohol potencia la citotoxicidad de la hipertermia a través de un mecanismo que es independiente de la activación de la autofagia. En consonancia con estos resultados, el inhibidor de la autofagia 3-metiladenina no tuvo influencia sobre la apoptosis en las células U-937 tratadas solo con hipertermia o simultáneamente con hipertermia y etanol.

Los estudios mediante western blot y el análisis enzimático de los lisados celulares revelaron un aumento significativo en el procesamiento y en la actividad de la caspasa-3, la caspasa-8 y la caspasa-9 en las células expuestas a hipertermia más etanol, en comparación con las células tratadas solo con hipertermia, después de tres horas de recuperación. Para delimitar el papel de las caspasas en el efecto del etanol sobre la hipertermia, las células se trataron previamente con inhibidores de esas proteasas, tanto específicos como de amplio espectro. Los resultados revelaron que la potenciación de la muerte celular apoptótica inducida por el etanol depende de la activación de las caspasas puesto que el inhibidor de amplio espectro (z-VAD-fmk) abolió completamente la apoptosis. Los inhibidores específicos para la caspasa-3 (z-DEVD-fmk) y para la caspasa-8 (z-IETD-fmk) también bloquearon completamente la apoptosis provocada por la hipertermia y suprimieron el efecto de la combinación con etanol. Estos resultados sugieren que, en nuestras condiciones experimentales, la muerte celular apoptótica estimulada por la hipertermia es dependiente de la activación de la vía extrínseca.

La activación de la caspasa-8 se inicia tras la unión de los receptores de muerte (Fas, TNFR, DR4 o DR5) a sus ligandos (FasL, TNF o TRAIL) en la superficie celular. Se ha descrito que la hipertermia estimula la externalización de Fas y que la potenciación de la muerte celular apoptótica mediante la combinación con agentes químicos se asocia con el aumento de los niveles de este receptor de muerte en la superficie celular de las células leucémicas [102,105]. Puesto que las células U-937 y HL-60 expresan la mayoría de los receptores de muerte y sus ligandos [111], estudios futuros podrán dilucidar el papel que desempeñan estas proteínas en la potenciación de la muerte celular por el etanol en condiciones de hipertermia.

La caspasa-8 activa directamente a la caspasa-3 para iniciar la apoptosis y también escinde a BID en su forma activa (tBID), lo que permite una comunicación cruzada con la vía mitocondrial para amplificar la respuesta apoptótica. Muchos estudios sugieren que BID activo se asocia rápidamente con la membrana mitocondrial, donde se une transitoriamente y activa a BAX y BAK. A continuación, estas proteínas se insertan en la membrana mitocondrial externa donde oligomerizan formando un poro toroidal [112,113], lo que permite la liberación de factores apoptogénicos como el citocromo *c* desde el espacio intermembrana. Nuestros resultados indican que la hidrólisis de BID fue notablemente superior en las células tratadas con hipertermia y etanol, lo que es consistente con una mayor actividad de la caspasa-8 observada en este grupo experimental. Además, se detectó liberación de citocromo *c* mitocondrial en las células tratadas con hipertermia y los niveles citosólicos de este factor apoptogénico también fueron significativamente mayores en las células expuestas simultáneamente a hipertermia y etanol.

La estimulación de la liberación de citocromo *c* por el etanol en condiciones de hipertermia no estuvo asociada con una disminución del potencial mitocondrial transmembrana ($\Delta\psi_m$), porque en el momento en el que se detectaron máximos niveles de células apoptóticas (tres horas de recuperación) solamente una fracción muy pequeña de las células presentaban disipación del potencial

mitocondrial transmembrana. Este efecto observado, ciertamente discreto, representa un evento que es dependiente de la activación de las caspasas durante la apoptosis inducida por hipertermia, pudiendo ser neutralizado completamente por un inhibidor general de caspasas [100]. En este sentido se sabe que la caspasa-3, principal proteasa ejecutora en la apoptosis, puede hidrolizar a la subunidad p75 del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial provocando la interrupción del transporte de electrones a ese nivel. Esto conduce irremediablemente a la disipación del potencial mitocondrial transmembrana y, finalmente, a una reducida capacidad para llevar a cabo la biosíntesis del ATP, absolutamente necesario para el funcionamiento celular [114]. Nuestros resultados son consistentes con otros estudios que han demostrado de forma inequívoca que la disipación del potencial mitocondrial no es estrictamente necesaria para que ocurra la liberación completa del citocromo *c* mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa [115].

Una vez que el citocromo *c* alcanza el compartimento citosólico interactúa con el factor activador de proteasa apoptótica 1 (APAF-1) promoviendo su oligomerización, a lo que sigue la formación del apoptosoma y, finalmente, la activación de la caspasa-9 [69]. La relevancia de la vía mitocondrial en la amplificación de la muerte celular apoptótica por el etanol en condiciones de hipertermia se analizó haciendo uso de un inhibidor específico (z-LEHD-fmk) frente a la caspasa-9. En estas condiciones se observó que el número de células apoptóticas debido al tratamiento con hipertermia solo disminuyó levemente en presencia del inhibidor de la caspasa-9, mientras que el efecto inhibitorio fue mucho más intenso si el etanol estaba presente durante la hipertermia.

Además del citocromo *c*, otros factores proteicos apoptogénicos residentes en la mitocondria pueden liberarse al citosol y participar en la modulación de la respuesta apoptótica. Es el caso de SMAC que neutraliza el efecto inhibitorio de XIAP y otras IAP citosólicas sobre las caspasas efectoras [70,116], favoreciendo, por lo tanto, la apoptosis. En este contexto, se observó que los niveles citosólicos de SMAC

aumentaron enormemente en células expuestas a hipertermia en combinación con etanol, en comparación con el tratamiento únicamente con hipertermia. Además, la expresión de c-IAP1/2 disminuyó notablemente con el tratamiento combinado, en consonancia con otros estudios que indican que SMAC puede selectivamente reducir los niveles de las proteínas c-IAP1/2, a través de un mecanismo que implica la ubiquitinización y degradación por el proteosoma [117].

Globalmente, estos resultados sugieren que, aunque la activación de la caspasa-8 es una etapa obligatoria en la apoptosis inducida por hipertermia, la presencia del etanol favorece la entrada en escena de la vía mitocondrial potenciando la muerte celular por el estrés térmico. Esta conexión entre las vías extrínseca e intrínseca que permite amplificar la respuesta apoptótica y, por tanto, el número de células apoptóticas, es característica de las denominadas células de tipo II [116,118].

La activación de la vía mitocondrial de la apoptosis está determinada por el equilibrio entre los miembros proapoptóticos (BID, BAX, BAK y otros) y antiapoptóticos (BCL-2, BCL-X_L, MCL-1 y otros) de la familia de proteínas BCL-2. La alteración de este equilibrio por diferentes estímulos proapoptóticos favorece la activación de BAX y de BAK. El estudio sobre el perfil de expresión de los factores antiapoptóticos reveló que en las células expuestas a hipertermia los niveles de MCL-1 disminuyen drásticamente en presencia de etanol. Se ha descrito que MCL-1 puede inhibir la activación de la apoptosis al unirse a BAX y a BAK e impedir la formación de los correspondientes oligómeros [73,119]. Además, se ha observado que MCL-1 se sobreexpresa en un gran número de tumores, tanto sólidos como hematológicos, por lo que actualmente se investiga su posible utilidad como diana terapéutica [73,119-21]. En el presente estudio, además, se observó que los niveles de los factores antiapoptóticos BCL-2 y BCL-X_L, así como los niveles del factor proapoptótico BAX, no se vieron alterados por la hipertermia, lo que concuerda con los resultados descritos por otros investigadores [101,122,123], y la inclusión del etanol durante el

tratamiento térmico no modificó el patrón de expresión de estas proteínas. Aunque a nivel global la cantidad de BAX no sufrió alteración por el etanol sí se detectó, sin embargo, una evidente disminución de sus niveles citosólicos, probablemente consecuencia de su translocación a las mitocondrias para promover el aumento de la permeabilidad de este orgánulo.

Los resultados expuestos anteriormente sugieren que otros factores puedan estar involucrados en el aumento del estímulo apoptótico por el etanol en células sometidas a hipertermia y la mayor eficacia exhibida por el inhibidor de caspasa-9 (z-LEHD-fmk) para bloquear la muerte celular en el grupo combinado. Está muy bien establecido que la proteína HSP70, además de su papel como asistente molecular en el plegamiento funcional de los polipéptidos nacientes y de las proteínas mal plegadas, puede bloquear la inducción de la apoptosis en distintas etapas de la vía [87]. Así, por ejemplo, HSP70: i) estabiliza el factor antiapoptótico MCL-1 y previene la translocación del factor proapoptótico BAX, bloqueando, por tanto, la liberación de citocromo c mitocondrial [107,124,125]; ii) interfiere en la activación de la proteína quinasa activada por estrés JNK/SAPK, que está directamente implicada en la inducción de la apoptosis en numerosos tejidos [126]; iii) inhibe la formación del apoptosoma, interfiriendo de este modo con la activación de la caspasa-9 y de la caspasa-3 [127,128]; iv) neutraliza al factor inductor de apoptosis (AIF) y su acceso al núcleo [129]; v) puede inhibir la actividad caspasa-3 y caspasa-7 mediante la formación de complejos con estas enzimas [130,131]. También se ha descrito que HSP70 inhibe el ensamblaje del complejo DISC inducido por TRAIL en células de leucemia aguda humana, bloqueando por lo tanto la activación de la vía extrínseca [67]. Nuestros resultados están en consonancia con el reconocido papel antiapoptótico de HSP70. El etanol bloqueó la expresión de HSP70 y favoreció el aumento de la liberación de citocromo c y de SMAC mitocondrial en respuesta al tratamiento con hipertermia. Por lo tanto, parece que la inhibición de la expresión de HSP70 contribuye significativamente a que la vía mitocondrial de la apoptosis desempeñe un papel central en las células expuestas al tratamiento combinado, en comparación con aquellas

tratadas únicamente con hipertermia. De hecho, la inhibición de la actividad caspasa-9 solo redujo modestamente el número de células apoptóticas en respuesta a la hipertermia, mientras que la apoptosis se bloqueó en mayor extensión cuando el etanol estaba presente durante el tratamiento con calor.

El efecto inhibitorio del etanol sobre la expresión de HSP70 estimulada por hipertermia observado en células U-937 también fue evidente en HL-60, una línea celular de leucemia aguda en la que el etanol igualmente potencia la apoptosis inducida por el estrés térmico. El efecto del etanol sobre la muerte celular inducida por la hipertermia se exploró, además, en otras dos líneas celulares de leucemia humana, MOLT-3 y K-562, con resultados diferentes a los anteriores. Las células MOLT-3 son de naturaleza linfoide y las dos rutas de muerte celular apoptótica, la vía extrínseca y la vía intrínseca, son completamente funcionales [132]. En estas células el etanol fue incapaz de bloquear el aumento de HSP70 inducido por la exposición a hipertermia y no logró mejorar la toxicidad conseguida con el calor. Estos resultados, por tanto, descartan un efecto inespecífico del etanol sobre la modulación de la apoptosis inducida por la hipertermia. Por otro lado, las células K-562 son de naturaleza mielóide, contienen el gen de fusión *Bcr-Abl* y se caracterizan, además, porque expresan altos niveles basales de la proteína HSP70 [67,133]. Se pudo observar que estas células eran altamente resistentes a la muerte celular por hipertermia e insensibles al efecto modulador del etanol. Estos resultados son consistentes con un papel citoprotector de HSP70 puesto que favorece la supervivencia celular, tal y como ya se ha descrito en varios tipos de tumores [134].

La transcripción del gen HSP70 está regulada por el factor de transcripción del choque térmico 1 (HSF1), que se activa en respuesta a la hipertermia, entre otros estímulos de estrés [135]. El desencadenante más importante es el plegamiento incorrecto de las proteínas, de modo que HSF1 induce la expresión de genes que codifican para: i) las proteínas que facilitan el plegamiento correcto (también conocidas como chaperonas) y entre las que se encuentra HSP70, ii) la ubiquitina, iii) subunidades del proteosoma y iv) otros

componentes de la maquinaria de control de calidad de las proteínas, con el fin de mantener la función celular y la viabilidad. En muchos tumores se han observado niveles elevados de HSF1 y esto, a nivel clínico, se ha correlacionado con un peor pronóstico [136]. La activación transcripcional de HSF1 es un proceso complejo que implica secuencialmente la translocación desde el citoplasma al núcleo, la trimerización, la unión al elemento de respuesta del choque térmico (HSE) en el ADN y la fosforilación [137].

Se ha descrito que el etanol es capaz de mediar en la activación de HSF1 y la inducción de HSP70 en monocitos humanos [138] y en neuronas corticales [139,140]. Por el contrario, la catalasa, una enzima que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y que ha sido ampliamente utilizada como antioxidante en estudios experimentales, aumentó el número de células apoptóticas en las células U-937 sometidas a calor y disminuyó la expresión de HSP70 a través de un mecanismo que involucra la modulación de HSF1 [88]. En este contexto, es importante indicar que el etanol, bajo ciertas condiciones, puede actuar como un antioxidante indirecto [141]. Sin embargo, en nuestras condiciones experimentales no se detectaron evidencias de que se desencadenara estrés oxidativo por el choque térmico. En consonancia con resultados anteriores, diferentes antioxidantes utilizados en investigación como son *N*-acetil-L-cisteína, glutatión y Tiron, e inhibidores de actividades enzimáticas potencialmente productoras de ROS como el alopurinol (inhibidor de la *xantina oxidasa*) y el cloruro de difenilenoyodonio (inhibidor de la *NADPH oxidasa*), fueron incapaces de bloquear el efecto del etanol sobre la apoptosis en células expuestas a hipertermia.

Es importante señalar que la presencia del etanol durante los treinta minutos de tratamiento con hipertermia fue un requisito imprescindible para lograr la potenciación. No se observó ningún efecto cuando el alcohol se añadió a las células una vez finalizado el tiempo de hipertermia, concretamente al inicio del periodo de recuperación y una vez las células alcanzaban nuevamente los 37 °C. Estos hallazgos descartan efectos inespecíficos del etanol y sugieren

que, probablemente, interfiera en la activación de alguna etapa, durante el reducido intervalo de tiempo (30 minutos) de tratamiento con hipertermia. Estas observaciones apuntan hacia la activación de HSF1 porque se sabe que este factor de transcripción contiene una secuencia peptídica que tiene por función actuar como un sensor rápido de temperatura [142]. Está documentado que el periodo de duración del choque térmico corresponde con el momento de activación de HSF1 y su posterior unión al ADN, mientras que la expresión de la proteína HSP70 ocurre fundamentalmente en el periodo de recuperación [88]. Se necesitarán más estudios para profundizar en la relación del etanol con la hipertermia y poder determinar si verdaderamente este alcohol modula la activación de HSF1 y a qué nivel.

En resumen, la hipertermia, como opción terapéutica, supone la elevación de la temperatura de una parte concreta del cuerpo o del organismo completo para conseguir los efectos deseados. La hipertermia como tratamiento de cuerpo entero está siendo utilizada en combinación con otras alternativas antitumorales, particularmente cuando se presenta metástasis, e implica la elevación sistémica de la temperatura en el rango de la fiebre. Los datos presentados permiten concluir que el etanol mejora la efectividad de la hipertermia para inducir la muerte en células de leucemia humana a través de un mecanismo dependiente de la activación de las caspasas y asociado con la disminución de la proteína HSP70 (Figura 29). Debido a que el efecto del etanol se logró con concentraciones que no eran tóxicas para las células, los resultados, en gran medida, sugieren su potencial como agente sensibilizador para la activación de la apoptosis en las células cancerígenas durante el uso terapéutico de la hipertermia frente al cáncer.

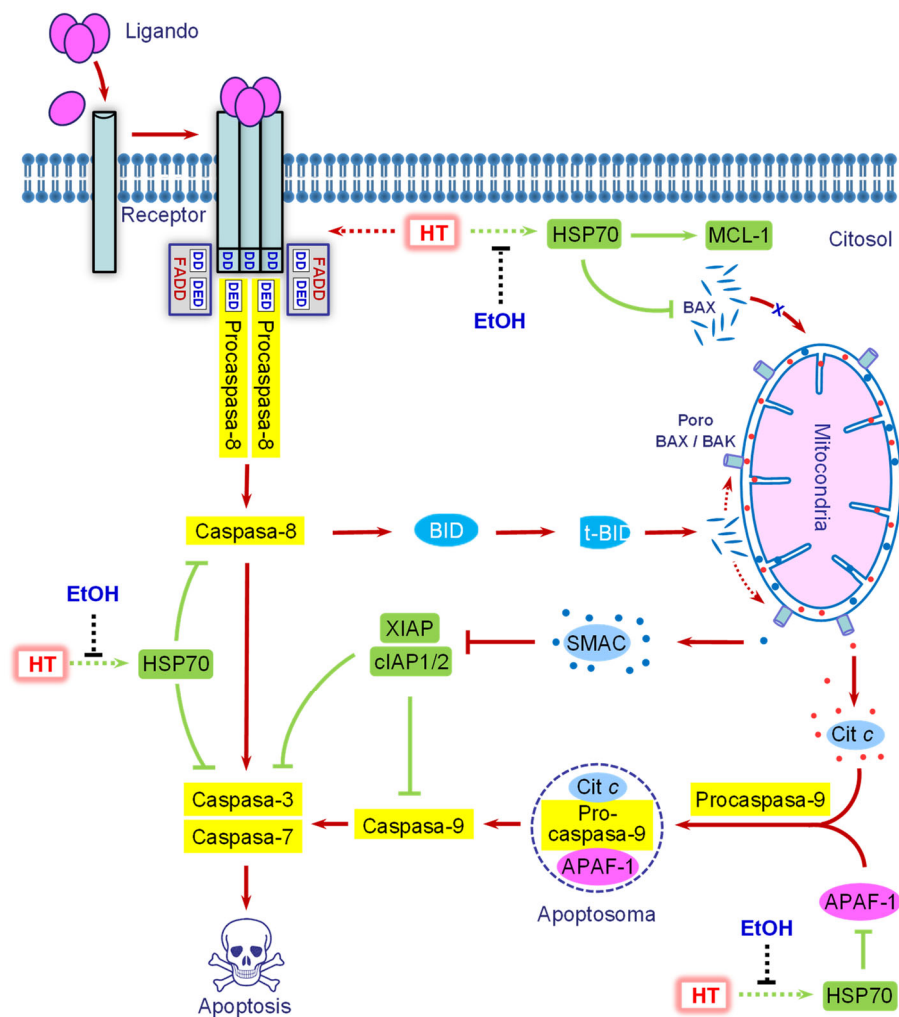


Figura 29. El etanol potencia la muerte celular por apoptosis inducida por hipertermia en células de leucemia humana. El tratamiento únicamente con hipertermia (HT) estimula la apoptosis a través de un mecanismo que involucra a la caspasa-8 y a la caspasa-3, y desencadena además la elevación de los niveles de la proteína HSP70. Existe un gran número de evidencias que señalan que este factor proteico de supervivencia es capaz de: i) estabilizar el factor antiapoptótico MCL-1 y aumentar, por tanto, su vida media; ii) bloquear la translocación de BAX a la mitocondria e impedir así la formación de poros en este orgánulo; iii) interferir en la formación del apoptosoma a través de su unión con APAF-1 y evitar de este modo que se active la caspasa-9; iv) inhibir directamente la caspasa-8 y la caspasa-3, y bloquear, por tanto, la ejecución de la apoptosis. El pretratamiento con etanol previene el aumento de HSP70 por hipertermia a través de un mecanismo desconocido, lo que se traduce en: i) aumento de la actividad catalítica de la caspasa-8, ii) estimulación de la proteólisis de BID (i.e. activación), iii) aumento de la

translocación de BAX desde el citosol a la mitocondria, iv) mayor liberación de factores proapoptóticos mitocondriales al citosol (citocromo *c* y SMAC), v) incremento de la actividad enzimática de la caspasa-9 y de la caspasa-3. Se sabe que la afinidad que presenta el inhibidor XIAP por la caspasa-3 y por la caspasa-7 es muy elevada en comparación con la afinidad que exhibe por la caspasa-9 (baja afinidad) o por la caspasa-8 (sin afinidad). HT, hipertermia; EtOH, etanol; Cit *c*, citocromo *c*.

1. La hipertermia es una alternativa terapéutica en la lucha contra el cáncer, especialmente en combinación con las opciones más habituales como son la radioterapia y la quimioterapia. En este trabajo se valoraron las consecuencias de la utilización del etanol sobre las células de leucemia humanas tratadas con hipertermia y se observó que este alcohol presenta propiedades sensibilizadoras.
2. Muchos estudios avalan que la hipertermia compromete la viabilidad celular impulsando la apoptosis. Los resultados que se presentan en este trabajo demuestran que el etanol potencia la respuesta proapoptótica de la hipertermia en las células U-937 y HL-60, pero no en las líneas de leucemia humanas K-562 o MOLT-3.
3. Aunque el etanol puede ser tóxico para las células y causar su muerte activando la apoptosis, en las células U-937 y HL-60, sin embargo, no se detectó aumento de la apoptosis basal.
4. El etanol aumentó el procesamiento y la actividad enzimática de las caspasas-3, -8 y -9 en las células U-937 tratadas con hipertermia. Estas proteasas parecen desempeñar un papel esencial en la potenciación de la muerte celular por el alcohol.
5. El etanol incrementó la sensibilidad de las células leucémicas U-937 promoviendo la vía mitocondrial mediante la activación de BID y la supresión de la expresión de HSP-70, proteína citoprotectora que aumenta en respuesta a la hipertermia y que interfiere en la formación del apoptosoma.
6. El efecto potenciador del etanol sobre la apoptosis inducida por hipertermia fue posible si el alcohol estaba presente en el medio de crecimiento durante el corto periodo de tiempo en el que las células estuvieron a 43 °C.
7. Está documentado que el etanol es tóxico para los seres humanos, especialmente a altas concentraciones circulantes y durante periodos de tiempo prolongados. Las bajas concentraciones de etanol utilizadas en el presente estudio y el corto periodo de tiempo necesario para conseguir el efecto potenciador justifican futuras investigaciones *in vivo*, con el fin de elucidar sus beneficios como molécula sensibilizadora en la termoterapia frente a tumores no hematológicos.

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
2. Senga SS, Grose RP. Hallmarks of cancer-the new testament. *Open Biol*. 2021;11(1):200358. doi:10.1098/rsob.200358
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, 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):229-263. doi:10.3322/caac.21834
4. Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*. 2015;20(11):1411-1419. doi:10.1007/s10495-015-1168-3
5. Lauber K, Brix N, Ernst A, et al. Targeting the heat shock response in combination with radiotherapy: Sensitizing cancer cells to irradiation-induced cell death and heating up their immunogenicity. *Cancer Lett*. 2015;368(2):209-229. doi:10.1016/j.canlet.2015.02.047
6. Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, Brace CL, Ivkov R, Grüll H, Ter Haar G, Wust P, Crezee J. Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperthermia*. 2020;37(1):711-741. doi: 10.1080/02656736.2020.1779357
7. Hervault A, Thanh NT. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale*. 2014;6(20):11553-11573. doi:10.1039/c4nr03482a
8. Kobayashi T, Kakimi K, Nakayama E, Jimbow K. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(11):1715-1726. doi:10.2217/nnm.14.106
9. Bakker A, van der Zee J, van Tienhoven G, Kok HP, Rasch CRN, Crezee H. Temperature and thermal dose during radiotherapy and hyperthermia for recurrent breast cancer are related to clinical outcome and thermal toxicity: a systematic review. *Int J Hyperthermia*. 2019;36(1):1024-1039. doi:10.1080/02656736.2019.1665718

10. Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, et al. Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. *European Society for Hyperthermic Oncology. Lancet*. 1995;345(8949): 540-543.
doi:10.1016/s0140-6736(95)90463-8
11. Harima Y, Nagata K, Harima K, Ostapenko VV, Tanaka Y, Sawada S. A randomized clinical trial of radiation therapy versus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma. *Int J Hyperthermia*. 2009;25(5):338-343.
doi:10.1080/02656730903092018
12. Toraya-Brown S, Fiering S. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *Int J Hyperthermia*. 2014;30(8):531-539.
doi:10.3109/02656736.2014.968640
13. Datta NR, Grobholz R, Puric E, et al. Enhanced tumour regression in a patient of liposarcoma treated with radiotherapy and hyperthermia: Hint for dynamic immunomodulation by hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 2015;31(5):574-577.
doi:10.3109/02656736.2015.1033482
14. Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, Brace CL, Ivkov R, Grüll H, Ter Haar G, Wust P, Crezee J. Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperthermia*. 2020;37(1):711-741.
doi: 10.1080/02656736.2020.1779357
15. Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M. Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene*. 2014;33(14): 1743-1754.
doi:10.1038/onc.2013.121
16. Song CW. Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: a review. *Cancer Res*. 1984;44 (10 Suppl):4721s-4730s.
17. Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia*. 2005;21(8):761-767.
doi:10.1080/02656730500204487

18. Kirui DK, Koay EJ, Guo X, Cristini V, Shen H, Ferrari M. Tumor vascular permeabilization using localized mild hyperthermia to improve macromolecule transport. *Nanomedicine*. 2014;10(7):1487-1496.
doi:10.1016/j.nano.2013.11.001
19. Oei AL, Vriend LE, Crezee J, Franken NA, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol*. 2015;10:165.
doi:10.1186/s13014-015-0462-0
20. Tal A, Arbel-Goren R, Stavans J. Cancer-associated mutations in BRC domains of BRCA2 affect homologous recombination induced by Rad51. *J Mol Biol*. 2009;393(5):1007-1012.
doi:10.1016/j.jmb.2009.09.011
21. Wang J, Chen Y, Li S, et al. PP2A inhibition causes synthetic lethality in BRCA2-mutated prostate cancer models via spindle assembly checkpoint reactivation. *J Clin Invest*. 2024;134(1):e172137.
doi:10.1172/JCI172137
22. Krawczyk PM, Eppink B, Essers J, et al. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(24):9851-9856.
doi:10.1073/pnas.1101053108
23. Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2008;44(17):2546-2554.
doi:10.1016/j.ejca.2008.07.038
24. Dewhirst MW. A translational review of hyperthermia biology. *Int J Hyperthermia*. 2025;42(1):2447952.
doi:10.1080/02656736.2024.2447952
25. Engin K, Leeper DB, Thistlethwaite AJ, Tupchong L, McFarlane JD. Tumor extracellular pH as a prognostic factor in thermoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994;29(1):125-132.
doi:10.1016/0360-3016(94)90234-8
26. Ahmed K, Zaidi SF, Mati-Ur-Rehman, Rehman R, Kondo T. Hyperthermia and protein homeostasis: cytoprotection and cell death. *J Therm Biol*. 2020;91:102615.
doi:10.1016/j.jtherbio.2020.102615

27. Gu C, Fan X, Yu W. Functional diversity of mammalian small heat shock proteins: a review. *Cells*. 2023;12(15):1947. doi:10.3390/cells12151947
28. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009;14(1):105-111. doi:10.1007/s12192-008-0068-7
29. Singh IS, Hasday JD. Fever, hyperthermia and the heat shock response. *Int J Hyperthermia*. 2013;29(5):423-435. doi:10.3109/02656736.2013.808766
30. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
31. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):49-63. doi:10.1038/nrm3722
32. Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ*. 2016;23(6):915-926. doi:10.1038/cdd.2015.172
33. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):621-632. doi:10.1038/nrm2952
34. Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci*. 2014;39(3):101-111. doi:10.1016/j.tibs.2013. 12.006
35. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):65-80. doi:10.1038/cdd.2017.186
36. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a008714. doi:10.1101/cshperspect.a008714
37. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee

- on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
38. Shalaby R, Diwan A, Flores-Romero H, Hertlein V, Garcia-Saez AJ. Visualization of BOK pores independent of BAX and BAK reveals a similar mechanism with differing regulation. *Cell Death Differ.* 2023;30(3):731-741. doi:10.1038/s41418-022-01078-w
 39. Beigl TB, Paul A, Fellmeth TP, et al. BCL-2 and BOK regulate apoptosis by interaction of their C-terminal transmembrane domains. *EMBO Rep.* 2024;25(9):3896-3924. doi:10.1038/s44319-024-00206-6
 40. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49-63. doi:10.1038/nrm3722
 41. Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ.* 2016;23(6):915-926. doi:10.1038/cdd.2015.172
 42. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-632. doi:10.1038/nrm2952
 43. Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(3):101-111. doi:10.1016/j.tibs.2013.12.006
 44. Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):65-80. doi:10.1038/cdd.2017.186
 45. Tait SW, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(9):a008706. doi:10.1101/cshperspect.a00870
 46. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, et al. Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications. *Cells.* 2024;13(22):1838. doi:10.3390/cells13221838

47. Green DR. Caspases and their substrates. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(3):a041012.
doi:10.1101/cshperspect.a041012
48. Green DR. The death receptor pathway of apoptosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(2):a041053.
doi:10.1101/cshperspect.a041053
49. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):42-50.
doi:10.1038/cdd.2011.121
50. Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. Getting TRAIL back on track for cancer therapy. *Cell Death Differ.* 2014;21(9):1350-1364.
doi:10.1038/cdd.2014.81
51. Ababneh O, Nishizaki D, Kato S, Kurzrock R. Tumor necrosis factor superfamily signaling: life and death in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2024;43(4):1137-1163.
doi:10.1007/s10555-024-10206-6
52. Dostert C, Grusdat M, Letellier E, Brenner D. The TNF Family of Ligands and receptors: communication modules in the immune system and beyond. *Physiol Rev.* 2019;99(1):115-160.
doi:10.1152/physrev.00045.2017
53. Green DR. Caspase activation and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2022;14(8):a041020.
doi:10.1101/cshperspect.a041020
54. Silke J, Meier P. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins-modulators of cell death and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(2):a008730.
doi:10.1101/cshperspect.a008730
55. Comporti M, Signorini C, Leoncini S, et al. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr.* 2010;5(2):101-109.
doi:10.1007/s12263-009-0159-9
56. von Haefen C, Sifringer M, Menk M, Spies CD. Ethanol enhances susceptibility to apoptotic cell death via down-regulation of autophagy-related proteins. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35(8):1381-1391.
doi:10.1111/j.1530-0277.2011.01473.x

57. Vaculová A, Hofmanová J, Soucek K, Andera L, Kozubík A. Ethanol acts as a potent agent sensitizing colon cancer cells to the TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 2004;577(1-2):309-313. doi:10.1016/j.febslet.2004.10.013
58. Moulin M, Carpentier S, Levade T, Arrigo AP. Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. *Apoptosis.* 2007;12(9):1703-1720. doi:10.1007/s10495-007-0096-2
59. Plante MK, Arscott WT, Folsom JB, Tighe SW, Dempsey RJ, Wesley UV. Ethanol promotes cytotoxic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through induction of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013;16(1):16-22. doi:10.1038/pcan.2012.37
60. Xie X, Wang SS, Wong TCS, Fung MC. Genistein promotes cell death of ethanol-stressed HeLa cells through the continuation of apoptosis or secondary necrosis. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):63. doi:10.1186/1475-2867-13-63
61. Ogony J, Matthews R, Anni H, Shannon K, Ercal N. The mechanism of elevated toxicity in HepG2 cells due to combined exposure to ethanol and ionizing radiation. *J Appl Toxicol.* 2008;28(3):345-355. doi:10.1002/jat.1285
62. Rivero A, Quintana J, Eiroa JL, López M, Triana J, Bermejo J, Estévez F. Potent induction of apoptosis by germacranolide sesquiterpene lactones on human myeloid leukemia cells. *Eur J Pharmacol.* 2003;482(1-3):77-84. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.09.058
63. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
64. Cossarizza A, Franceschi C, Monti D, et al. Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria [published correction appears in *Exp Cell Res* 1996;222(1):251-3]. *Exp Cell Res.* 1995;220(1):232-240. doi:10.1006/excr.1995.1311

65. Petit PX, Lecoœur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol.* 1995;130(1):157-167.
doi:10.1083/jcb.130.1.157
66. Furusawa Y, Tabuchi Y, Takasaki I, Wada S, Ohtsuka K, Kondo T. Gene networks involved in apoptosis induced by hyperthermia in human lymphoma U937 cells. *Cell Biol Int.* 2009;33(12):1253-1262.
doi:10.1016/j.cellbi.2009.08.009
67. Guo F, Sigua C, Bali P, et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood.* 2005;105(3):1246-1255.
doi:10.1182/blood-2004-05-2041
68. Herrmann GK, Yin YW. The role of Poly(ADP-ribose) polymerase 1 in nuclear and mitochondrial base excision repair. *Biomolecules.* 2023;13(8):1195.
doi:10.3390/biom13081195
69. Li WH, Wang F, Song GY, Yu QH, Du RP, Xu P. PARP-1: a critical regulator in radioprotection and radiotherapy-mechanisms, challenges, and therapeutic opportunities. *Front Pharmacol.* 2023;14:1198948.
doi:10.3389/fphar.2023.1198948
70. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102(1):33-42.
doi:10.1016/s0092-8674(00)00008-8
71. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):46-55.
doi:10.1038/cdd.2017.179
72. Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(1):12-20.
doi:10.1016/j.gde.2010.12.001
73. Zhu PJ, Yu ZZ, You QD, Jiang ZY. Myeloid cell leukemin-1 inhibitors: a growing arsenal for cancer therapy. *Drug Discov Today.* 2020;25(10):1873-1882.
doi:10.1016/j.drudis.2020.07.021

74. Jiang X, Wang X. Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:87-106.
doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073706
75. Shen HM, Codogno P. Autophagy is a survival force via suppression of necrotic cell death. *Exp Cell Res.* 2012;318(11):1304-1308.
doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.006
76. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science.* 2011;333(6046):1109-1112.
doi:10.1126/science.1201940
77. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682-695.
doi:10.1016/j.cell.2011.07.030
78. Tran S, Fairlie WD, Lee EF. BECLIN1: Protein structure, function and regulation. *Cells.* 2021;10(6):1522.
doi:10.3390/cells10061522
79. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?. *Free Radic Biol Med.* 2017;104:144-164.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004
80. Halliwell B. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide?. *Trends Biochem Sci.* 2006;31(9):509-515.
doi:10.1016/j.tibs.2006.07.005
81. Eid SA, Savelieff MG, Eid AA, Feldman EL. Nox, Nox, are you there? the role of NADPH oxidases in the peripheral nervous system. *Antioxid Redox Signal.* 2022;37(7-9):613-630.
doi:10.1089/ars.2021.0135
82. Bortolotti M, Polito L, Battelli MG, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase: one enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biol.* 2021;41:101882.
doi:10.1016/j.redox.2021.101882
83. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;80:50-64.
doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023
84. Hraoui G, Grondin M, Breton S, Averill-Bates DA. Nrf2 mediates mitochondrial and NADPH oxidase-derived ROS during mild heat

- stress at 40 °C. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2025;1872(3): 119897.
doi:10.1016/j.bbamcr.2025.119897
85. Contreras-Zentella ML, Villalobos-García D, Hernández-Muñoz R. Ethanol metabolism in the liver, the induction of oxidant stress, and the antioxidant defense system. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(7):1258.
doi:10.3390/antiox11071258
86. Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants. *FASEB J.* 2015;29(12):4766-4771.
doi:10.1096/fj.15-275404
87. Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, Kovalenko EI, Sapozhnikov AM. HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells*. 2020;9(3):587.
doi:10.3390/cells9030587
88. Sancho P, Troyano A, Fernández C, De Blas E, Aller P. Differential effects of catalase on apoptosis induction in human promonocytic cells. Relationships with heat-shock protein expression. *Mol Pharmacol.* 2003;63(3):581-589.
doi:10.1124/mol.63.3.581
89. Linthorst M, Baaijens M, Wiggenraad R, et al. Local control rate after the combination of re-irradiation and hyperthermia for irresectable recurrent breast cancer: Results in 248 patients. *Radiother Oncol.* 2015;117(2):217-222.
doi:10.1016/j.radonc.2015.04.019
90. Mei X, Ten Cate R, van Leeuwen CM, et al. Radiosensitization by hyperthermia: the effects of temperature, sequence, and time interval in cervical cell lines. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3):582.
doi:10.3390/cancers12030582
91. Kok HP, Cressman ENK, Ceelen W, et al. Heating technology for malignant tumors: a review. *Int J Hyperthermia.* 2020;37(1):711-741.
doi:10.1080/02656736.2020.1779357
92. Hervault A, Thanh NT. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale.* 2014;6(20):11553-11573.
doi:10.1039/c4nr03482a

93. Kobayashi T, Kakimi K, Nakayama E, Jimbow K. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. *Nanomedicine (Lond)*. 2014;9(11):1715-1726. doi:10.2217/nnm.14.106
94. Sahin O, Meiyazhagan A, Ajayan PM, Krishnan S. Immunogenicity of externally activated nanoparticles for cancer therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12):3559. doi:10.3390/cancers12123559.
95. To KK, Poon DC, Wei Y, Wang F, Lin G, Fu L. Pelitinib (EKB-569) targets the up-regulation of ABCB1 and ABCG2 induced by hyperthermia to eradicate lung cancer. *Br J Pharmacol*. 2015;172(16):4089-4106. doi:10.1111/bph.13189
96. Park J, Baek SH. Combination therapy with cinnamaldehyde and hyperthermia induces apoptosis of A549 non-small cell lung carcinoma cells via regulation of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase family. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6229. doi:10.3390/ijms21176229
97. Alcala MA Jr, Park K, Yoo J, et al. Effect of hyperthermia in combination with TRAIL on the JNK-Bim signal transduction pathway and growth of xenograft tumors. *J Cell Biochem*. 2010;110(5):1073-1081. doi:10.1002/jcb.22619
98. Song X, Kim SY, Lee YJ. Evidence for two modes of synergistic induction of apoptosis by mapatumumab and oxaliplatin in combination with hyperthermia in human colon cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(8):e73654. doi:10.1371/journal.pone.0073654
99. Mantso T, Vasileiadis S, Anastopoulos I, et al. Hyperthermia induces therapeutic effectiveness and potentiates adjuvant therapy with non-targeted and targeted drugs in an in vitro model of human malignant melanoma. *Sci Rep*. 2018;8(1):10724. doi:10.1038/s41598-018-29018-0
100. Quintana C, Cabrera J, Perdomo J, et al. Melatonin enhances hyperthermia-induced apoptotic cell death in human leukemia cells. *J Pineal Res*. 2016;61(3):381-395. doi:10.1111/jpi.12356

101. Sun L, Cui ZG, Zakki SA, Feng QW, Li ML, Inadera H. Mechanistic study of nonivamide enhancement of hyperthermia-induced apoptosis in U937 cells. *Free Radic Biol Med*. 2018;120:147-159. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.017
102. Li P, Zhao QL, Jawaid P, et al. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5Z-7-oxozeaenol, a TAK1 inhibitor, in Molt-4 cells. *Int J Hyperthermia*. 2017;33(4):411-418. doi:10.1080/02656736.2017.1278629
103. Milani V, Lorenz M, Weinkauff M, et al. Combination of hyperthermia and bortezomib results in additive killing in mantle cell lymphoma cells. *Int J Hyperthermia*. 2009;25(4):262-272. doi:10.1080/02656730902835664
104. Ahmed K, Tabuchi Y, Kondo T. Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis*. 2015;20(11):1411-1419. doi:10.1007/s10495-015-1168-3
105. Hou CH, Lin FL, Hou SM, Liu JF. Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(10):17380-17395. doi:10.3390/ijms151017380
106. Katschinski DM, Boos K, Schindler SG, Fandrey J. Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21094-21098. doi:10.1074/jbc.M001629200
107. Stankiewicz AR, Livingstone AM, Mohseni N, Mosser DD. Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by HSP70. *Cell Death Differ*. 2009;16(4):638-647. doi:10.1038/cdd.2008.189
108. Jin M, Ande A, Kumar A, Kumar S. Regulation of cytochrome P450 2e1 expression by ethanol: role of oxidative stress-mediated PKC/JNK/SP1 pathway. *Cell Death Dis*. 2013;4(3):e554. doi:10.1038/cddis.2013.78
109. Rao PS, Kumar S. Chronic effects of ethanol and/or darunavir/ritonavir on U937 monocytic cells: regulation of cytochrome p450 and antioxidant enzymes, oxidative stress, and cytotoxicity. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(1):73-82. doi:10.1111/acer.12938

- 110.** Yu DY, Matsuya Y, Zhao QL, et al. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a new synthesized class of furan-fused tetracyclic compounds. *Apoptosis*. 2007;12(8):1523-1532. doi:10.1007/s10495-007-0080-x
- 111.** De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Anel A, Martinez-Lostao L. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced DISC recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk Res*. 2015;39(6):657-666. doi:10.1016/j.leukres.2015.03.019
- 112.** Salvador-Gallego R, Mund M, Cosentino K, et al. Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J*. 2016;35(4):389-401. doi:10.15252/embj.201593384
- 113.** Bleicken S, Jeschke G, Stegmüller C, Salvador-Gallego R, García-Sáez AJ, Bordignon E. Structural model of active Bax at the membrane. *Mol Cell*. 2014;56(4):496-505. doi:10.1016/j.molcel.2014.09.022
- 114.** Ricci JE, Muñoz-Pinedo C, Fitzgerald P, et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*. 2004;117(6):773-786. doi:10.1016/j.cell.2004.05.008
- 115.** Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J*. 1998;17(1):37-49. doi:10.1093/emboj/17.1.37
- 116.** Jost PJ, Grabow S, Gray D, et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*. 2009;460(7258):1035-1039. doi:10.1038/nature08229
- 117.** Yang QH, Du C. Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells. *J Biol Chem*. 2004;279(17):16963-16970. doi:10.1074/jbc.M401253200
- 118.** Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(8):539-548. doi:10.1038/nrc.2016.58

119. Fan F, Tonon G, Bashari MH, et al. Targeting Mcl-1 for multiple myeloma (MM) therapy: drug-induced generation of Mcl-1 fragment Mcl-1(128-350) triggers MM cell death via c-Jun upregulation. *Cancer Lett.* 2014;343(2):286-294.
doi:10.1016/j.canlet.2013.09.042
120. Zhang H, Guttikonda S, Roberts L, et al. Mcl-1 is critical for survival in a subgroup of non-small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene.* 2011;30(16):1963-1968.
doi:10.1038/onc.2010.559
121. Yang Y, Li F, Saha MN, Abdi J, Qiu L, Chang H. miR-137 and miR-197 induce apoptosis and suppress tumorigenicity by targeting MCL-1 in multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(10):2399-2411.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1437
122. Cui ZG, Piao JL, Kondo T, et al. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: implication for cancer therapy. *Chem Biol Interact.* 2014;215:46-53.
doi:10.1016/j.cbi.2014.03.005
123. Zakki SA, Cui ZG, Sun L, Feng QW, Li ML, Inadera H. Baicalin augments hyperthermia-induced apoptosis in U937 cells and modulates the MAPK pathway via ROS generation. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45(6):2444-2460.
doi:10.1159/000488263
124. Gotoh T, Terada K, Oyadomari S, Mori M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* 2004;11(4):390-402.
doi:10.1038/sj.cdd.4401369
125. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. HSP70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38729-38739.
doi:10.1074/jbc.M509497200
126. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, et al. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem.* 1997;272(29):18033-18037.
doi:10.1074/jbc.272.29.18033

- 127.** Beere HM, Wolf BB, Cain K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol.* 2000;2(8):469-475. doi:10.1038/35019501
- 128.** Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by HSP70. *Nat Cell Biol.* 2000;2(8):476-483. doi:10.1038/35019510
- 129.** Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene.* 2003;22(43):6669-6678. doi:10.1038/sj.onc.1206794
- 130.** Komarova EY, Afanasyeva EA, Bulatova MM, Cheetham ME, Margulis BA, Guzhova IV. Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone HSP70. *Cell Stress Chaperones.* 2004;9(3):265-275. doi:10.1379/csc-27r1.1
- 131.** Sverchinsky DV, Nikotina AD, Komarova EY, et al. Etoposide-induced apoptosis in cancer cells can be reinforced by an uncoupled link between HSP70 and caspase-3. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2519. doi:10.3390/ijms19092519
- 132.** Perdomo J, Cabrera J, Estévez F, Loro J, Reiter RJ, Quintana J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia MOLT-3 cells. *J Pineal Res.* 2013;55(2):195-206. doi:10.1111/jpi.12062
- 133.** Demidenko ZN, Vivo C, Halicka HD, et al. Pharmacological induction of HSP70 protects apoptosis-prone cells from doxorubicin: comparison with caspase-inhibitor- and cycle-arrest-mediated cytoprotection. *Cell Death Differ.* 2006;13(9):1434-1441. doi:10.1038/sj.cdd.4401812
- 134.** Sherman MY, Gabai VL. Hsp70 in cancer: back to the future. *Oncogene.* 2015;34(32):4153-4161. doi:10.1038/onc.2014.349
- 135.** Kumar S, Stokes J 3rd, Singh UP, et al. Targeting HSP70: a possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* 2016;374(1):156-166. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.056

- 136.** Dong B, Jaeger AM, Thiele DJ. Inhibiting heat shock factor 1 in cancer: a unique therapeutic opportunity. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(12):986-1005.
doi:10.1016/j.tips.2019.10.008
- 137.** Kmiecik SW, Le Breton L, Mayer MP. Feedback regulation of heat shock factor 1 (HSF1) activity by HSP70-mediated trimer unzipping and dissociation from DNA. *EMBO J.* 2020;39(14):e104096.
doi:10.15252/embj.2019104096
- 138.** Muralidharan S, Ambade A, Fulham MA, Deshpande J, Catalano D, Mandrekar P. Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and HSP70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance. *J Immunol.* 2014;193(4):1975-1987.
doi:10.4049/jimmunol.1303468
- 139.** Pignataro L, Miller AN, Ma L, et al. Alcohol regulates gene expression in neurons via activation of heat shock factor 1. *J Neurosci.* 2007;27(47):12957-12966.
doi:10.1523/JNEUROSCI.4142-07.2007
- 140.** Pignataro L. Alcohol protects the CNS by activating HSF1 and inducing the heat shock proteins. *Neurosci Lett.* 2019;713:134507.
doi:10.1016/j.neulet.2019.134507
- 141.** Casañas-Sánchez V, Pérez JA, Quinto-Aleman D, Díaz M. Sub-toxic ethanol exposure modulates gene expression and enzyme activity of antioxidant systems to provide neuroprotection in hippocampal HT22 cells. *Front Physiol.* 2016;7:312.
doi:10.3389/fphys.2016.00312
- 142.** Hentze N, Le Breton L, Wiesner J, Kempf G, Mayer MP. Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor HSF1. *Elife.* 2016;5:e11576.
doi:10.7554/eLife.11576

PUBLICACIÓN A LA QUE HA DADO ORIGEN ESTA TESIS

Quintana M, Saavedra E, Del Rosario H, González I, Hernández I, Estévez F, Quintana J. Ethanol Enhances Hyperthermia-Induced Cell Death in Human Leukemia Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9):4948. Published 2021 May 6. doi:10.3390/ijms22094948

INDICIOS DE CALIDAD DE LA PUBLICACIÓN

Revista: International Journal of Molecular Sciences

ISSN: 1661-6596

EISSN: 1422-0067

Base de datos de indexación: Journal Citation Reports™

Año: 2021

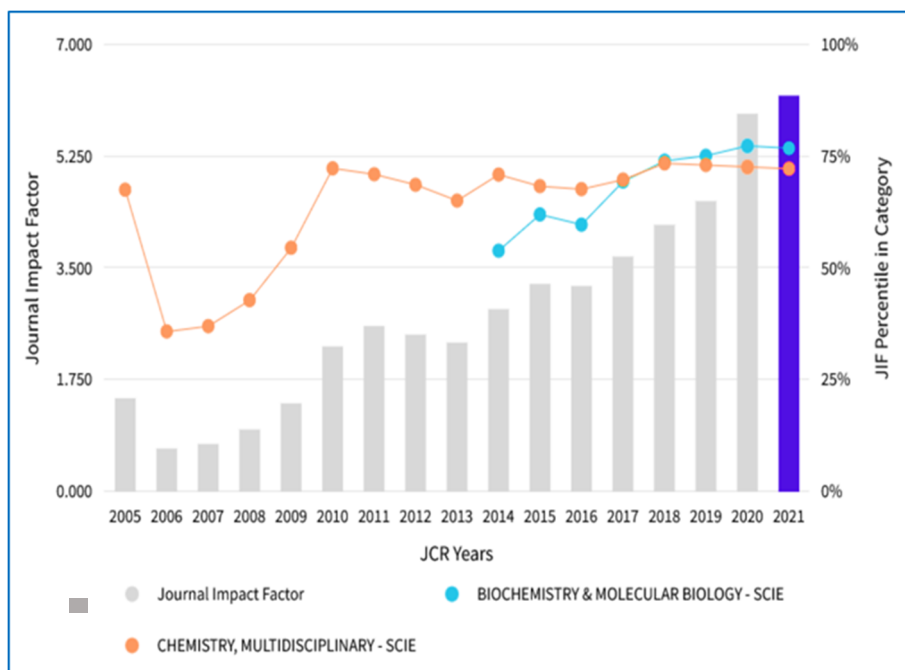
Índice de impacto: 6.208

Categoría: Biochemistry & Molecular Biology

Posición que ocupa en la categoría: Q1 (69 de 297)

Categoría: Chemistry, Multidisciplinary

Posición que ocupa en la categoría: Q2 (50 de 179)





Article

Ethanol Enhances Hyperthermia-Induced Cell Death in Human Leukemia Cells

Mercedes Quintana, Ester Saavedra [†], Henoc del Rosario, Ignacio González, Inmaculada Hernández, Francisco Estévez [†] and José Quintana * [†]

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología, Genética e Inmunología, Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; mercedes.quintana101@alu.ulpgc.es (M.Q.); ester.saavedra102@alu.ulpgc.es (E.S.); henoc.del101@alu.ulpgc.es (H.d.R.); ignacio.gonzalez@ulpgc.es (I.G.); servanda.hernandez@ulpgc.es (I.H.); francisco.estevez@ulpgc.es (F.E.)

* Correspondence: jose.quintana@ulpgc.es; Tel.: +34-928458792

Abstract: Ethanol has been shown to exhibit therapeutic properties as an ablative agent alone and in combination with thermal ablation. Ethanol may also increase sensitivity of cancer cells to certain physical and chemical antitumoral agents. The aim of our study was to assess the potential influence of nontoxic concentrations of ethanol on hyperthermia therapy, an antitumoral modality that is continuously growing and that can be combined with classical chemotherapy and radiotherapy to improve their efficiency. Human leukemia cells were included as a model in the study. The results indicated that ethanol augments the cytotoxicity of hyperthermia against U937 and HL60 cells. The therapeutic benefit of the hyperthermia/ethanol combination was associated with an increase in the percentage of apoptotic cells and activation of caspases-3, -8 and -9. Apoptosis triggered either by hyperthermia or hyperthermia/ethanol was almost completely abolished by a caspase-8 specific inhibitor, indicating that this caspase plays a main role in both conditions. The role of caspase-9 in hyperthermia treated cells acquired significance whether ethanol was present during hyperthermia since the alcohol enhanced Bid cleavage, translocation of Bax from cytosol to mitochondria, release of mitochondrial apoptogenic factors, and decreased of the levels of the anti-apoptotic factor myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1). The enhancement effect of ethanol on hyperthermia-activated cell death was associated with a reduction in the expression of HSP70, a protein known to interfere in the activation of apoptosis at different stages. Collectively, our findings suggest that ethanol could be useful as an adjuvant in hyperthermia therapy for cancer.

Keywords: ethanol; hyperthermia; leukemia cells; apoptosis; HSP70



Citation: Quintana, M.; Saavedra, E.; del Rosario, H.; González, I.; Hernández, I.; Estévez, F.; Quintana, J. Ethanol Enhances

Hyperthermia-Induced Cell Death in Human Leukemia Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4948. <https://doi.org/10.3390/ijms22094948>

Sci. **2021**, *22*, 4948. <https://doi.org/10.3390/ijms22094948>

<https://doi.org/10.3390/ijms22094948>

Academic Editor: Alessandro Poggi

Received: 12 April 2021

Accepted: 4 May 2021

Published: 6 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer has one of the highest worldwide mortality indices of any disease. Treatment includes chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy but despite the efforts and efficacy of these strategies mortality rates are still very high [1,2]. Most anticancer drugs and radiotherapy cause the death of sensitive cells by inducing apoptosis [3]. This kind of cell death can occur with or without the activation of caspases, a family of aspartate specific cysteine proteases which are generally synthesized as zymogens and activated by proteolytic cleavage [4]. There are two major caspase activation pathways [5]. The extrinsic pathway involves activation of cell surface death receptors Fas, death receptors 4 and 5 (DR4/DR5) or tumor necrosis factor receptor (TNFR) and is dependent on the initiator caspase-8 which cleaves and activates the downstream effector caspases (caspase-3, -6 and -7), inducing a cascade of caspases. The intrinsic pathway involves cytochrome c release and the subsequent activations of caspase-9 and caspase-3 [6].

Resistance is one of the major limitations in chemotherapy. Therefore, the search for new strategies and/or compounds with antitumoral properties that may increase

the efficacy of the current chemotherapeutic agents is of great interest [7–9]. Hyperthermia is a promising alternative for cancer treatment that is based on increasing the temperature (40–43 °C) specifically in tumor tissue and the therapeutic effect depends on the strength and treatment duration [10]. A large number of experimental studies have also reported that hyperthermia increases the effectiveness of conventional antineoplastic therapies [11–13]. It is known that the architecture of the vasculature in solid tumor tissues is complex, with a hypoxic and acidic microenvironment [14]. In this scenario, cancer cells are highly sensitive to hyperthermia treatment and most of the healthy cells around tumor tissues are not damaged [15]. Hyperthermia induces the unfolding and aggregation of proteins, damage of the cell membrane, and disruption of cell cytoskeleton [16]. Although this treatment has shown low toxicity, mild side effects, effectiveness in killing cancer cells and apoptosis inducing properties, the acquisition of thermotolerance is a main clinical problem [17]. This has been generally associated with the synthesis and accumulation of pro-survival heat shock proteins, especially HSP70, among other factors [18]. Consequently, the possibility to reduce thermotolerance by using low toxicity compounds is of great clinical importance. In this regard, several studies *in vivo* and *in vitro* have explored non-toxic enhancers for hyperthermia-induced cell death in a variety of human cancer cells including lung cancer [19,20], colon cancer [21,22], melanoma [23], and leukemia cells [24–27].

Ethanol is a natural compound known to be primarily metabolized by liver enzymes including alcohol dehydrogenase, cytochrome P450 2E1, and microsomal ethanol-oxidizing system. All pathways that metabolize ethanol lead to the formation of acetaldehyde which may favor stress oxidative via reactive oxygen species generation [28] and is responsible, at least in part, of the widely known hepatotoxic effects. It has been reported that ethanol enhances susceptibility of human leukemia cells to apoptotic cell death [29], potentiates TRAIL-induced apoptosis in colon, leukemic T-lymphocytes, and prostate cancer cells [30–32], enhances genistein-induced apoptosis on human cervix cancer cells [33], and increases the toxicity of ionizing radiation in hepatocarcinoma cells [34]. However, little is known about its properties as a chemosensitizer agent in combination with hyperthermia. The aim of this study was to investigate the influence of ethanol on hyperthermia-induced cell death in human leukemia cells, to determine its impact on the intrinsic- and extrinsic-apoptotic pathways and on Bcl-2 family members' expression. We found evidence that non-toxic concentrations of this alcohol enhance hyperthermia-induced apoptotic cell death which was related with a decrease in HSP70 levels.

2. Results

2.1. Ethanol Increases Hyperthermia-Induced Cell Death in Human Myeloid Leukemia Cells

U937 cells are a widely used model to study the heat-induced response against chemical and physical stimuli since they exhibit a quick and robust response. To study the effect of ethanol on U937 cells exposed to hyperthermia a range of nontoxic concentrations was used. To this end, the cells were cultured in absence or presence of ethanol (0.25%, 0.5%, and 1%) for 1 h and then the cells were subjected to mild hyperthermia (30 min at 43 °C). The cells were harvested and analyzed following a 24-h recovery period at 37 °C. As shown (Figure 1A), a clear decrease in the MTT reduction was observed in the cells exposed to hyperthermia alone and the decrease in mitochondrial activity was more evident in the cells exposed to hyperthermia in combination with increasing concentrations of ethanol. Therefore, the lower mitochondrial activity, approximately 25% of control values, was observed in the group treated with hyperthermia in combination with 1% ethanol. Because a decrease in the percentage of MTT reduction may indicate inhibition of cell proliferation, increase in cell death, or both, the effect of ethanol on the cell number was also evaluated by the trypan blue exclusion method. As shown (Figure 1B), the number of viable cells decreased in response to hyperthermia (~57% of viable cells as compared to control), and the increasing concentrations of ethanol greatly augmented the efficacy of hyperthermia (~10% of viable cells as compared to control in the cells treated with 1% ethanol). The results also demonstrated that ethanol by itself did not have any effect on the number of

cells. Consistent with the above results, when U937 cells were cultured with ethanol at 37 °C, they appeared to be healthy as visualized under phase contrast microscopy after a 24-h period of recovery (Figure 1C). In contrast, combination of hyperthermia and ethanol significantly augmented the number of unhealthy cells in comparison with hyperthermia alone. Taken together, these results suggest that ethanol potentiates the cytotoxicity of hyperthermia in U937 cells.

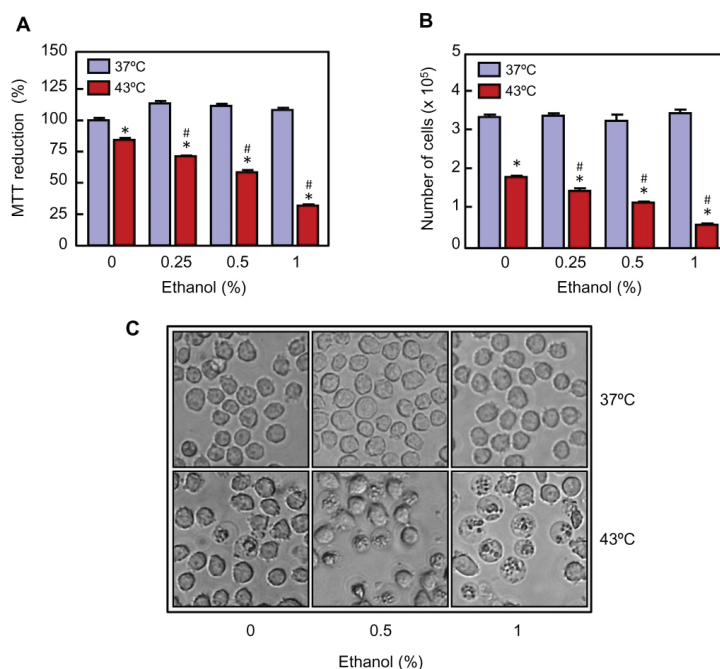


Figure 1. Effect of ethanol on cell viability in U937 cells exposed to hyperthermia. The cells were pre-incubated in absence or presence of the indicated concentrations of ethanol for 30 min, exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C) and allowed to recover for 24 h. **(A)** Mitochondrial activity was evaluated by the MTT reduction assay. **(B)** The number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion method using an automatic cell counter. **(C)** The cells were visualized under phase contrast microscopy; a representative field of each experimental group is shown. Magnification 20×. * $p < 0.05$ vs. respective control at 37 °C; # $p < 0.05$ vs. hyperthermia (43 °C) treatment alone.

Hyperthermia is a recognized apoptosis inducer in a wide variety of human tumor cells. To know the influence of ethanol on hyperthermia-induced apoptosis, U937 cells were pre-incubated with 0.5% ethanol and then exposed to heat treatment. As shown in Figure 2A, hyperthermia alone induced morphological changes in the nuclei like condensed and fragmented chromatin, characteristic of apoptotic cells, and the number of apoptotic nuclei augmented in cells treated with hyperthermia plus ethanol. Similar results were observed when the cells were analyzed by flow cytometry after staining with propidium iodide. The histograms (Figure 2B) reveal an increase in the proportion of cells with sub-G₁ DNA content (i.e., apoptotic cells) in the hyperthermia plus ethanol group in comparison with hyperthermia alone (39.5% vs. 14.1%) following an 8-h recovery period. The effect of increasing concentrations of ethanol on hyperthermia-induced apoptosis was evaluated and quantified at different time periods of recovery (Figure 2C). A clear increase in the percentage of apoptotic cells was observed early (3 h) in the hyperthermia plus ethanol combination groups in comparison with hyperthermia alone. The maximal level of apoptotic cells (3-fold increase) was achieved with the highest concentration of

ethanol used (1%). Similar levels of potentiation were also observed when cells were allowed to recover for longer periods of time (8–24 h). In accordance with the results showed in Figure 1, treatment with ethanol (0.25–1%) at 37 °C did not have any impact on the number of apoptotic cells (Figure 2C). Double staining of the cells with propidium iodide and annexin V-FITC and analysis by flow cytometry revealed an increase in the percentage of annexin V-positive and propidium iodide-negative cells (i.e., apoptotic cells) in response to hyperthermia (11.7%) or hyperthermia plus ethanol (34.6%) as compared with the respective controls (1.6%) (Figure 2D). The increase in the percentage of cells in the right/lower quadrant in the group hyperthermia plus ethanol in comparison to hyperthermia treated alone (3-fold, 34.6% vs. 11.7%) was similar to the increase in the percentage of cells in the sub-G1 fraction of the cell cycle (Figure 2B,C). It was not detected an increase in the number of primary necrotic cells or late apoptotic/secondary necrotic cells in response to hyperthermia alone (2.5% vs. 3.4%) or hyperthermia plus ethanol (2.6% vs. 4.0%), as observed in the right/upper quadrants (Figure 2D), suggesting that necrotic cell death modality is not activated.

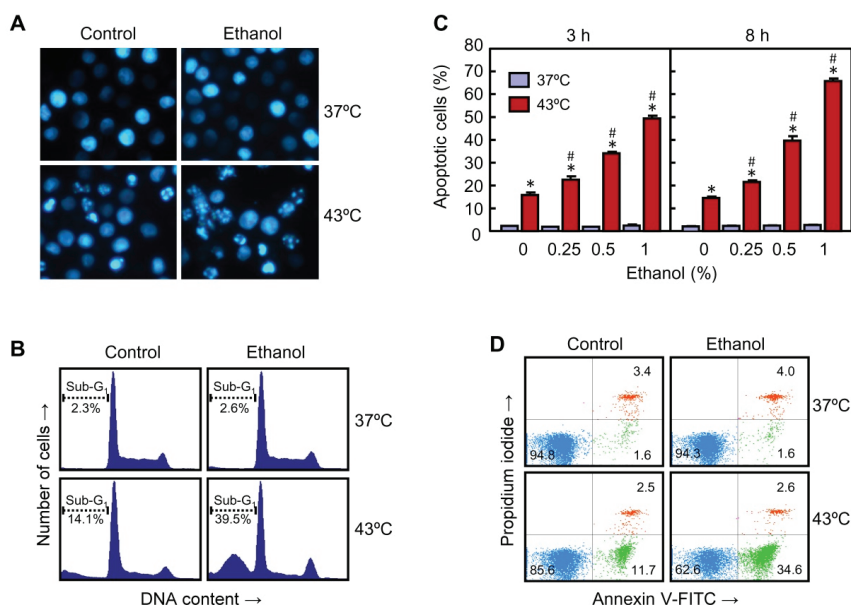


Figure 2. Effect of ethanol on apoptotic cell death in U937 cells subjected to hyperthermia. (A) The cells were pre-incubated in absence or presence of 0.5% ethanol for 30 min, exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C) and allowed to recover for 24 h. The cells were collected, stained with bisbenzimidide trihydrochloride and nuclei visualized by fluorescent microscopy; photomicrographs of representative fields of cells to evaluate nuclear chromatin condensation (i.e., apoptosis) are shown. Magnification 40×. (B) The cells were pre-incubated in absence or presence of 0.5% ethanol for 30 min, exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C) and allowed to recover for 8 h. The cells were harvested and cell distribution, according to their DNA content, was determined by flow cytometry using the propidium iodide staining procedure; the position of cells with sub-G1 DNA content (i.e., apoptotic cells) is indicated by a dotted line. Representative histograms are shown. (C) The cells were pre-incubated in absence or presence of the indicated concentrations of ethanol and allowed to recover for the indicated period of time. The cells were collected, and the percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry as above. (D) The cells were pre-incubated in absence or presence of 0.5% ethanol for 30 min, exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C) and allowed to recover for 3 h. The cells were collected, stained with propidium iodide and annexin V-FITC and analyzed by flow cytometry. * $p < 0.05$ vs. respective control at 37 °C; # $p < 0.05$ vs. hyperthermia (43 °C) treatment alone.

To determine whether the potentiation of cell death by ethanol in U937 cells subjected to hyperthermia is also observed in other human leukemia cells, the cell lines HL60 (acute myeloid cells), K562 (chronic myeloid cells), and MOLT3 (acute T lymphoblastic cells) were included in this study. These cells were pre-incubated in the absence or presence of ethanol, treated with mild hyperthermia and, following a recovery period specified for each cell line, analyzed by flow cytometry using the propidium iodide staining procedure. As shown (Figure 3A), the percentage of apoptotic cells increased in HL60 in response to hyperthermia as compared to control (25% vs. 4%) and ethanol (0.25–1%) enhanced the efficacy of this treatment in a similar way as observed in U937 cells. With the higher concentration of ethanol tested (1%) a 2-fold increase in the percentage of apoptotic cells was achieved in comparison with hyperthermia-treated cells alone (52% vs. 25%).

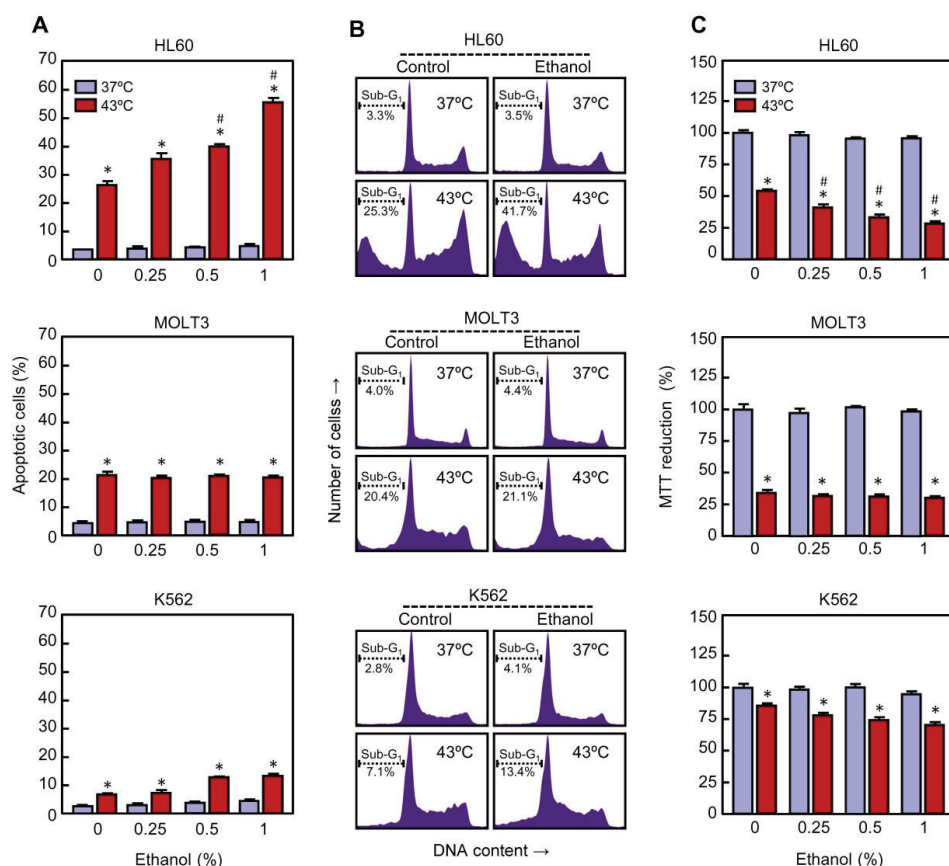


Figure 3. Effect of ethanol on apoptotic cell death in human leukemia cell lines subjected to hyperthermia. The cells were pre-incubated in absence or presence of ethanol for 30 min, exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C), and allowed to recover for the indicated period of time. (A) The cells were collected after a 3 h period of recovery and cell distribution according to their DNA content was determined by flow cytometry, using the propidium iodide staining procedure; percentage of apoptotic cells (i.e., fraction of cells with sub-G₁ DNA content) is shown. (B) The cells were allowed to recover for 3 h and cell distribution according to their DNA content was determined by flow cytometry, as above; the position of apoptotic cells is indicated by a dotted line. Representative histograms are shown. (C) The cells were collected following a 24 h period of recovery and cytotoxicity evaluated by the MTT reduction method. * $p < 0.05$ vs. the respective control at 37 °C; # $p < 0.05$ vs. hyperthermia (43 °C) treatment alone.

The apoptotic machinery is also activated by heat in MOLT3 cells; an increase in the number of apoptotic cells was observed after treatment with hyperthermia alone as compared to unheated cells (22% vs. 5%). In contrast, ethanol (0.25–1%) had no influence on hyperthermia-induced apoptosis in these cells. We also include in this study K562 cells because they are highly resistant to hyperthermia-induced apoptosis [35]. These cells were treated as above and they were allowed to recover for 24 h. As expected, the fraction of apoptotic cells increased slightly in response to hyperthermia as compared to untreated cells (7% vs. 3%). When ethanol was included (0.25–1%) the efficacy of hyperthermia in inducing apoptosis was not improved. Representative histograms on the effect of ethanol on hyperthermia-induced apoptosis in HL60, MOLT3, and K562 are shown (Figure 3B). Consistent with the above results, the study on cell viability using the MTT reduction procedure indicates that ethanol, in a concentration dependent manner, enhanced the cytotoxicity of mild hyperthermia in HL60 but not in MOLT3 or K562 cells (Figure 3C). Together, the results on leukemia cells indicate that in the conditions and time frame evaluated, ethanol by itself did not show significant effect on apoptosis and cell viability; however, it differentially modulated the apoptotic response to hyperthermia.

2.2. Ethanol Increases Processing and Activity of Caspases in Hyperthermia Treated Cells

One of the most significant molecular markers of apoptosis induction both in normal and tumor cells is the activation of caspases. To determine the role of these proteolytic enzymes in the effect of ethanol on apoptosis triggered by hyperthermia, lysates from U937 cells were assayed by immunoblotting. As shown (Figure 4A), the combination of hyperthermia plus ethanol was more effective to promote the processing of pro-caspase-3, pro-caspase-8 and pro-caspase-9 (indicative of activation) than hyperthermia alone. Activation of caspase-3 was also confirmed by cleavage of its known substrate poly(ADP)ribose-polymerase (PARP), to give a 85-kDa fragment. The enhancing effect of ethanol on hyperthermia-induced apoptosis was concentration-dependent and maximal levels of proteolytic processing of these zymogens were achieved in presence of the highest concentration of ethanol used. Incubation of the cells in presence of ethanol at 37 °C did not have any effect on the processing of pro-caspases, in accordance with the results shown in Figure 2.

To confirm that the processing of pro-caspases is associated with an increase in activity, cell lysates were assayed for the cleavage of the tetrapeptide substrates Ac-DEVD-pNA (caspase-3), Ac-IETD-pNA (caspase-8), and Ac-LEHD-pNA (caspase-9). Exposure to hyperthermia stimulated caspase-3 (2.0-fold), caspase-8 (1.3-fold) and caspase-9 (1.4-fold) activities, and ethanol improved the efficacy of hyperthermia to induce these enzymatic activities (Figure 4B). The effect of ethanol was concentration-dependent and the maximal levels of caspase activity (6-fold, 2.2-fold and 2.8-fold, for caspases-3, -8, and -9, respectively) were obtained with 1% ethanol. As expected, the increase in the activities of initiator caspases (i.e., caspase-8 and caspase-9) was significantly lower than the activity of caspase-3, the main executioner caspase. Thus, consistent with the above immunoblotting studies, incubation with ethanol (0.25–1%) alone did not exert any effect on caspase activity. Overall, these results suggest that the extrinsic (caspase-8 dependent) and the intrinsic (caspase-9 dependent) pathways of apoptosis are activated in U937 cells subjected to hyperthermia and that ethanol plays a sensitizing role by enhancing the activity of caspase-3, the main executioner caspase involved in dismantling the cells.

The role of caspases in the induction of apoptosis by hyperthermia and in the potentiation of this kind of cell death by ethanol was determined using the broad-spectrum caspase inhibitor z-VAD-fmk (100 µM). As seen (Figure 4C), pre-incubation of the cells with this inhibitor completely blocked apoptotic cell death triggered by hyperthermia, in the absence as well as in the presence of ethanol. These results suggest that the effect of ethanol on hyperthermia-induced cytotoxicity is attributable to a rise in caspase activity. To further identify which caspases were important in the potentiation of cell death by ethanol, U937 cells were pre-incubated with the cell-permeable specific caspase inhibitors z-DEVD-

fmk, (caspase-3 inhibitor), z-IETD-fmk (caspase-8 inhibitor), or z-LEHD-fmk (caspase-9 inhibitor) and the number of apoptotic cells were determined by flow cytometry at 3 h of recovery. As shown (Figure 4C), caspase-3 and caspase-8 inhibitors completely abrogated apoptosis in cells subjected to hyperthermia as well as in cells exposed to hyperthermia plus ethanol. In contrast, the caspase-9 inhibitor partially blocked apoptotic cell death in cells exposed to hyperthermia (24% in absence vs. 15% in the presence of inhibitor) while the blockage was more effective in cells exposed to hyperthermia plus ethanol (45% in absence vs. 8% in presence of inhibitor). These results suggest that the activation of the extrinsic pathway of apoptosis is essential for hyperthermia induced apoptosis both in the absence and presence of ethanol. The intrinsic pathway, however, contributes partially to the heat-induced apoptosis, but it plays a crucial role in the cells exposed to hyperthermia in combination with ethanol.

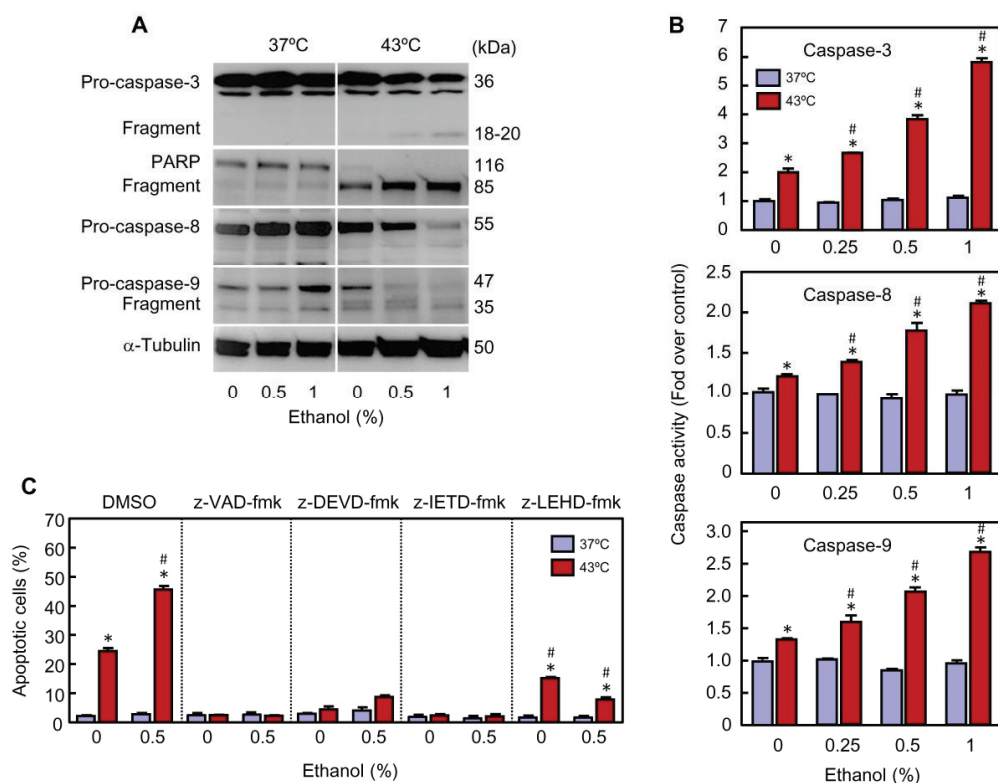


Figure 4. Effect of ethanol on processing and activity of caspases in U937 cells subjected to hyperthermia. (A–C) The cells were pre-incubated in absence or presence of the indicated concentrations of ethanol for 30 min, exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C) and allowed to recover for 3 h. (A) Cleavage of indicated pro-caspases was analyzed by immunoblotting; as a loading control α -tubulin was also determined. (B) The activity of specified caspases was determined from lysates using colorimetric substrates and results are expressed as fold increase in caspase activity compared with the respective control. (C) Effect of cell-permeable caspase inhibitors on modulation of apoptosis by ethanol in cells subjected to hyperthermia. The cells were pre-treated for 1 h in absence (vehicle, 0.1% DMSO) or presence of 100 μ M of z-VAD-fmk (broad-spectrum caspase inhibitor), 50 μ M z-DEVD-fmk (caspase-3 inhibitor), 50 μ M z-IETD-fmk (caspase-8 inhibitor), or 50 μ M z-LEHD-fmk (caspase-9 inhibitor), exposed to hyperthermia with or without ethanol, collected after the time period of recovery, and analyzed by flow cytometry using the propidium iodide staining method. * $p < 0.05$ vs. the respective control at 37 °C; # $p < 0.05$ vs. hyperthermia treatment alone (containing DMSO) or hyperthermia plus ethanol (containing DMSO).

2.3. Ethanol Increases the Release of Apoptogenic Factors from Mitochondria in Cells Subjected to Hyperthermia

The release of cytochrome c from mitochondria to the cytosol is a key event to activate caspase-9. As revealed by the immunoblot assays (Figure 5A) this apoptogenic factor was slightly detected in the cytosolic fraction from cells incubated at 37 °C and basal levels were not affected by ethanol. In contrast, the levels of cytochrome c increased in response to hyperthermia alone and ethanol, in a dose-dependent manner, greatly improved the release. In agreement with the mitochondrial outer membrane permeabilization, Smac/Diablo also augmented in the cytosol of cells subjected to hyperthermia plus ethanol. This protein was hardly detected in the cytosolic fractions from control cells or from cells only treated with ethanol. It is known that Smac/Diablo contributes to activation of apoptosis, through relieves the inhibitory effect of the inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) on caspases in the cytosolic compartment [36].

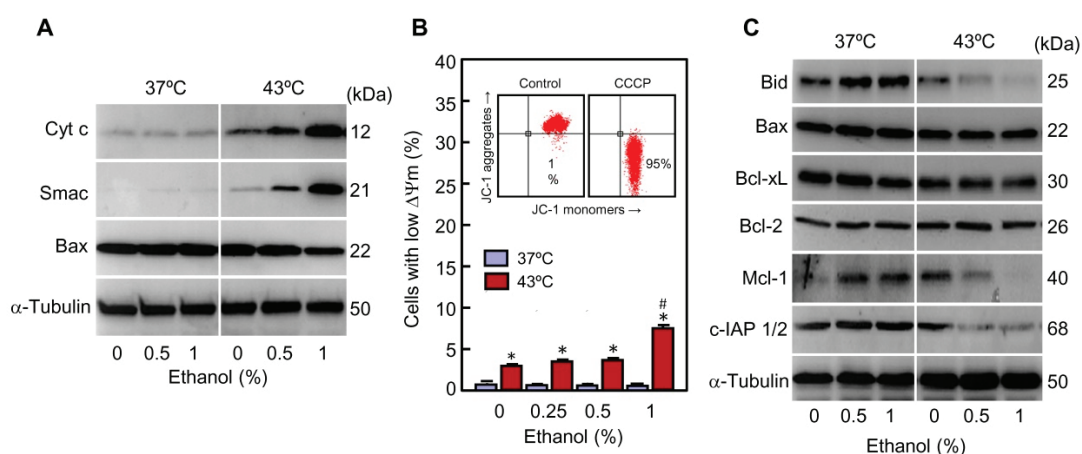


Figure 5. Effect of ethanol on pro-apoptotic and anti-apoptotic factors involved in the mitochondrial pathway of apoptosis in U937 cells subjected to hyperthermia. (A–C) The cells were pre-incubated in absence or presence of the indicated concentrations of ethanol for 30 min, exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C) and allowed to recover for 3 h. (A) Cytosolic fractions were isolated and analyzed by immunoblotting; α -tubulin was used as a loading control. (B) Mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) was evaluated by flow cytometry using the JC-1 probe (10 μ M) and expressed as percentage of cells with low mitochondrial transmembrane potential (low green fluorescence); cells treated with 50 μ M of CCCP for 30 min were used as a positive control (inserted dot plot). (C) Whole cell lysates were prepared and assayed by immunoblotting; as a loading control, α -tubulin was also determined. * $p < 0.05$ vs. the respective control at 37 °C; # $p < 0.05$ vs. hyperthermia (43 °C) treatment alone.

The release of intermembrane factors may be provoked by mitochondrial permeability transition, an abrupt increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane to low molecular weight solutes. It causes dissipation of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) and therefore suppression of essential activities such as ATP synthesis. To determine whether the release of cytochrome c is associated with a disruption of the mitochondrial transmembrane potential, cells were stained with the fluorescent probe JC-1 and analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 5B, a slight increase in the fraction of cells with low $\Delta\psi_m$ was observed in hyperthermia-treated cells as compared to control cells (4% vs. 1%) at 3 h of recovery. A modest increase in the percentage of cells with low $\Delta\psi_m$ was also appreciated in the group exposed to hyperthermia in combination with the highest concentration of ethanol used as compared to hyperthermia alone (7% vs. 4%). Treatment with ethanol alone (0.25–1%) had not any influence on the mitochondrial potential. In fact, although hyperthermia alone provoked maximum levels of apoptotic

cells at 3 h of recovery (Figure 2B) only a reduced percentage of cells showed low $\Delta\psi_m$ at that time (Figure 5B). This suggests that the marginal $\Delta\psi_m$ dissipation observed is probably a caspase activation consequence. Cells treated with the depolarizing agent carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) for 30 min were included as a positive control; in these conditions >95% of cells exhibited low mitochondrial membrane potential (Figure 5B, bottom/right quadrants in the inserted dot plot).

2.4. Ethanol Modulates the Expression of Pro-Apoptotic and Anti-Apoptotic Members of Bcl-2-Family in Cells Exposed to Hyperthermia

Since the intrinsic pathway of apoptosis is controlled by the Bcl-2 family proteins, the expression of pro-apoptotic members Bid and Bax was also analyzed by immunoblotting (Figure 5C). Bid is a well-recognized caspase-8 substrate which is transformed into an active cleaved-form (t-Bid) that plays a key role as a link between the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. The levels of full-length Bid (25 kDa) decreased slightly (which is indicative of activation) in hyperthermia-treated cells while a greater reduction was detected in the cells exposed to hyperthermia combined with ethanol. These results are in accordance with a higher increase in caspase-8 activity in the cells subjected to hyperthermia plus ethanol in comparison with the cells treated only with hyperthermia (Figure 4A,B). It is recognized that once activated, Bid quickly associates with the outer mitochondrial membrane promoting conformational changes of cytosolic Bax and Bak which then insert into the membrane to promote permeabilization [37]. Accordingly with this model, the cytosolic levels of Bax were lower in the cells exposed to hyperthermia in combination with ethanol compared to the cells treated only with hyperthermia (Figure 5A). In accordance with these results, ethanol did not change the expression of Bax (Figure 5B).

Anti-apoptotic members of the Bcl-2 family play its role by binding to BH3-only proteins to inhibit their interaction with and activation of Bax or Bak, and their expression may be influenced by apoptotic stimuli [38]. To determine whether ethanol promotes changes in the expression of these factors during hyperthermia treatment, Bcl-xL, Bcl-2 and Mcl-1 were also analyzed by immunoblotting (Figure 5C). The results revealed that levels of Bcl-xL and Bcl-2 were not modified by the treatments while the expression of Mcl-1 was clearly reduced by hyperthermia, and ethanol, in a dose dependent manner, augmented the effect of hyperthermia on the levels of this anti-apoptotic factor. The decrease of Mcl-1 is an important event in the enhancement effect of ethanol on hyperthermia-induced cell death since this protein can inhibit apoptosis activation by binding with Bax/Bak to disturb the formation of oligomers [39]. Together, these results suggest that the enhancement of cytochrome c release by ethanol in cells exposed to hyperthermia seems to be independent of mitochondrial permeability transition and involves activation of the pro-apoptotic factors Bid and Bax and downregulation of the anti-apoptotic factor Mcl-1. It is also known that apoptosis is negatively regulated by members of the IAP family of proteins which inhibit caspase activity by directly binding to the active enzymes [36,40]. It is interesting to note that ethanol in combination with hyperthermia greatly reduced the levels of c-IAP1/2, which may contribute to the increase of the percentage of apoptotic cells observed in presence of the alcohol.

2.5. Ethanol Must Be Present during Hyperthermia Treatment to Achieve Potentiation and to Reduce the Expression of the Cytoprotector HSP70

In all of the above described experiments, ethanol was always present during hyperthermia and recovery periods. In order to determine whether the presence of ethanol is required during the period of hyperthermia to achieve potentiation of cell death, the alcohol (0.5% or 1%) was added to the cells just before or immediately after hyperthermia treatment. As expected and in accordance with the above results, the presence of ethanol during hyperthermia period potentiates apoptotic cell death and cytotoxicity as compared to hyperthermia alone (Figure 6A,B, left panel). In contrast, whether the alcohol is added immediately after hyperthermia regime, i.e., once the cells returned to 37 °C, no effect on apoptosis stimulated by heat was detected (Figure 6A, right panel). Accordingly,

differences in the reduction of MTT were not observed in the cells treated with ethanol after hyperthermia treatment compared with the cells exposed to hyperthermia alone (Figure 6B, right panel). Together, these results suggest that the presence of ethanol during hyperthermia treatment (30 min) is critical for the potentiation of heat-induced cytotoxicity.

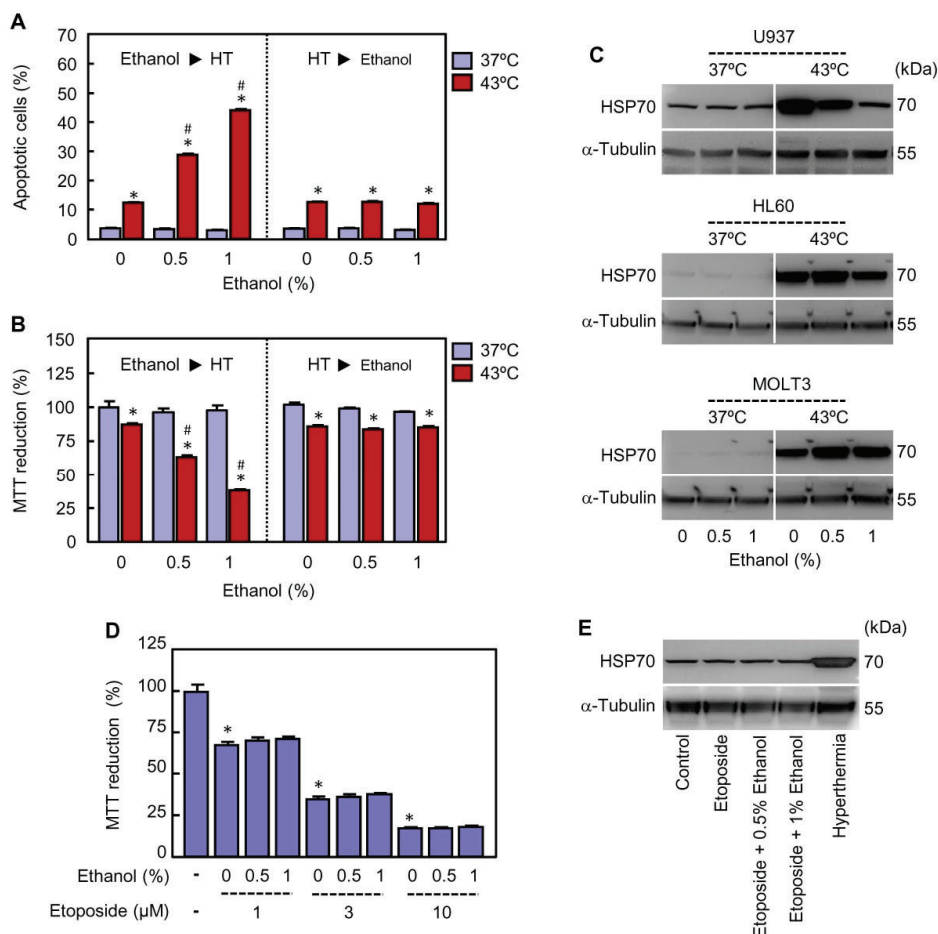


Figure 6. Impact of the moment of ethanol addition on modulation of cell death triggered by hyperthermia (HT) and role of HSP70. (A,B) U937 cells were treated with the indicated concentrations of ethanol before (Ethanol ► HT, left panel) or after (HT ► Ethanol, right panel) they were immersed for 30 min in a water bath at 37 °C or 43 °C, as indicated. (A) The cells were incubated at 37 °C for 3 h of recovery and the percentage of apoptotic cells determined by flow cytometry using the propidium iodide staining procedure. (B) The cells were incubated at 37 °C for 24 h of recovery and the mitochondrial activity determined at 570 nm by the MTT reduction assay using a microplate reader. (C) The cells were exposed to hyperthermia (30 min at 43 °C) in presence of the indicated concentrations of ethanol and allowed to recover at 37 °C for 3 h (U937) or 8 h (HL60 and MOLT3). Whole cell lysates were prepared and levels of HSP70 analyzed by immunoblotting; as a loading control, α-tubulin was also determined. (D) U937 cells were incubated with etoposide (1–10 μM) in presence of the specified concentration of ethanol at 37 °C for 24 h and metabolic activity determined by the MTT reduction assay. (E) U937 cells were incubated with etoposide (10 μM) in absence or presence of the specified concentration of ethanol for 6 h and the expression of HSP70 determined by immunoblotting; as a loading control, α-tubulin was also included. * $p < 0.05$ vs. respective control; # $p < 0.05$ vs. hyperthermia (43 °C) treatment alone.

It is widely known that hyperthermia is a potent inducer of stress response characterized by the stimulation of heat shock proteins expression, including HSP70. Since this protein plays an important role as cell death modulator via interaction to several components of the apoptotic pathways [41], the impact of ethanol on the expression of HSP70 was determined by immunoblotting in ethanol-sensitive (U937 and HL60) and ethanol-resistant (MOLT3) cells. As shown (Figure 6C), hyperthermia increased the basal levels of HSP70 in the three cell lines analyzed and ethanol blocked in different extension the expression of this protein in both U937 and HL60 cells. In contrast, HSP70 induction by hyperthermia treatment was not abrogated by ethanol in MOLT3 cells. To further confirm the importance of HSP70, U937 cells were treated with etoposide (1–10 μ M), an antitumoral agent which is known to induce cytotoxicity through a mechanism independent of HSP70 upregulation [42]. The results revealed that ethanol (0.5–1%) neither enhances cytotoxicity (Figure 6D) nor modifies the levels of HSP70 (Figure 6E) in cells treated with etoposide; as a positive control, in a parallel experiment the cells were also exposed to hyperthermia alone (30 min at 43 °C) and HSP70 was analyzed by immunoblotting (Figure 6E).

3. Discussion

Hyperthermia is a realistic treatment option against cancer since temperatures in the range of 40–43 °C can reduce proliferation and induce cell death. It has been used for cancer treatment in combination with chemotherapy or radiotherapy [43,44]. There are several physical approaches for inducing hyperthermia, including electromagnetic radiation, ultrasound, hyperthermic perfusion, and conductive heating [10]. Nanoparticles with appropriate external energy sources are being used for local treatment [45–47]. Strategies to enhance the therapeutic efficacy of hyperthermia are also under investigation; in this context cytotoxic properties of hyperthermia on leukemia, melanoma, lung carcinoma, and colon cancer cells, among others, have been improved by the use of compounds that sensitize to the cells [19–27]. In the present study the effect of ethanol on cytotoxicity exhibited by hyperthermia on leukemia cells was investigated since this alcohol has been reported to enhance the antitumor properties of radiation and the effectiveness of chemotherapeutic agents like TRAIL [29–32,34]. A large number of studies have described that hyperthermia decreases cell viability mainly through induction of apoptosis [14,48–50]. The results presented herein demonstrate that ethanol enhances apoptotic cell death in U937 and HL60 leukemia cells exposed to hyperthermia. The sensitization effect of the alcohol on U937 cells was detected at 3 h of recovery and it lasted at least 24 h. Previous studies have reported that ethanol itself may reduce proliferation of cancer cells by mechanisms that involve apoptosis and that usually require long incubation times [51,52]. In our setting, ethanol alone neither induces apoptosis nor promotes cell growth arrest even at the longer period of recovery analyzed (24 h).

It has been reported that ethanol under serum starvation conditions may stimulate apoptosis via autophagy inhibition [29]. Although we have observed a marginal increase in the levels of the autophagy marker beclin-1 by hyperthermia, the amount of this protein was not affected by ethanol. It suggests that this alcohol promotes cytotoxicity of hyperthermia via an autophagy independent mechanism. In accordance with these results, the autophagy inhibitor 3-methyladenine (5 mM) had not any influence on apoptosis in hyperthermia- or in hyperthermia plus ethanol-treated cells (Supplementary Materials, Figure S1).

The immunoblotting and the enzymatic studies on cell lysates revealed a significant increase in the processing and activity of caspase-3, caspase-8, and caspase-9 in cells exposed to hyperthermia plus ethanol as compared to hyperthermia alone at 3 h of recovery period. To delineate the role of caspases in the effect of ethanol on hyperthermia, cells were pre-treated with specific and broad-spectrum caspase inhibitors. The results revealed that the potentiation of apoptotic cell death induced by ethanol was dependent on caspase activation since apoptosis was completely abolished by the pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk. Specific inhibitors against caspase-3 (z-DEVD-fmk) and caspase-8 (z-IETD-fmk) also blocked completely apoptosis triggered by hyperthermia and suppressed the

effect of combination with ethanol. These results suggest that under our experimental conditions, apoptotic cell death stimulated by hyperthermia involves activation of the extrinsic pathway.

The activation of caspase-8 is initiated following binding of death receptors (Fas, TNFR, DR4 or DR5) to their ligands (FasL, TNF or TRAIL) at the cell surface. It has been reported that hyperthermia stimulates Fas externalization and that the enhancement of apoptotic cell death by the combination with certain chemicals is associated with the increase of this death receptor on the cell surface on leukemia cells [26,53]. Since U937 and HL60 cells express most of death receptors and their ligands [54] further studies will be necessary to clarify their role in the potentiation of the hyperthermia-induced cell death by ethanol. Caspase-8 directly activates caspase-3 to initiate apoptosis and also cleaves Bid to an active form (tBid), enabling a crosstalk to mitochondrial pathway to amplify the apoptotic response. Many studies suggest that active Bid rapidly associates with the mitochondrial membrane, where it transiently binds and activates cytosolic Bax or Bak. Activated Bax/Bak inserts into the mitochondrial outer membrane where it oligomerizes forming a toroidal pore [55,56], allowing release of apoptogenic factors such as cytochrome c from the intermembrane space. Our results indicate that Bid hydrolysis was higher in cells treated with hyperthermia plus ethanol which is consistent with a higher activity of caspase-8 observed in this experimental group. Thus, cytochrome c release was detected in cells treated with hyperthermia and the levels of this apoptogenic factor were also higher in presence of ethanol.

The stimulation of cytochrome c release by ethanol was not associated with a decrease of the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$). Only a small fraction of cells exhibited low $\Delta\psi_m$, measured at a time at which maximal levels of apoptotic cells are detected (3 h). Thus, the marginal effect observed may represent a caspase-dependent event since under apoptotic conditions caspase-3 may cleave the p75 subunit of the mitochondrial respiratory chain complex I, leading to disruption of electron transport, dissipation of $\Delta\psi_m$ and finally reduction of ATP biosynthesis [57]. Previous studies have also shown that mitochondrial potential dissipation is not required for the complete release of cytochrome c upon mitochondrial outer membrane permeabilization [58].

It is well established that cytosolic cytochrome c engages apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf1) and induces its oligomerization, leading to apoptosome formation and caspase-9 activation [40]. The relevance of the mitochondrial pathway in the hyperthermia-induced apoptotic cell death amplification by ethanol was analyzed by using a specific inhibitor against caspase-9 (z-LEHD-fmk). In this condition, the percentage of apoptotic cells due to hyperthermia alone decreased slightly in presence of the inhibitor while a greater inhibitory effect was appreciated when ethanol was present during hyperthermia treatment. Apoptogenic factors others than cytochrome c may be released from mitochondria to modulate the apoptotic response. In this context, cytosolic Smac/Diablo, which is known to neutralize XIAP and other IAPs [36,59] to derepress effector caspase-3, augmented greatly in cells exposed to hyperthermia plus ethanol as compared to hyperthermia treatment alone. In addition, the expression of c-IAP 1/2 decreased markedly by the combined treatment which is in accordance with previous studies indicating that Smac/Diablo may selectively reduce the protein levels of c-IAP1/2 through the ubiquitin/proteasome pathway [60]. Together, these results suggest that although caspase-8 activation is an obligatory step in hyperthermia-induced apoptosis, ethanol switches to the mitochondrial pathway to induce cell death by hyperthermia. This crosstalk between the extrinsic and intrinsic pathways to amplify the number of apoptotic cells is found in so named type II cells [59,61].

The activation of the mitochondrial pathway of apoptosis is determined by the balance of pro-apoptotic (Bid, Bax, Bak, and others) and anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, and others) members of the Bcl-2 family. Alteration of this equilibrium by different pro-apoptotic stimuli shifts the balance favouring Bax/Bak activation. The expression profile of anti-apoptotic factors revealed that hyperthermia treatment reduces the levels of Mcl-1

which were drastically downregulated in the presence of ethanol. It has been reported that Mcl-1 can inhibit apoptosis activation by binding with Bax/Bak to disturb the formation of oligomers [62]. Thus, targeting Mcl-1 has been considered as a promising approach for cancer treatment since its overexpression has been widely reported in both hematological and solid tumors [39,62–64]. In contrast, levels of other anti-apoptotic factors like Bcl-2 and Bcl-xL and the pro-apoptotic factor Bax were not altered by hyperthermia—which is in agreement with previous studies [25,65,66]—and combination of hyperthermia plus ethanol did not change the expression pattern of these proteins. The total amount of Bax was not affected by ethanol; however, there was a clear reduction in its cytosolic levels, which suggests translocation to the mitochondria to promote the permeability of this organelle.

It seems clear from the above exposed results that other factors are probably involved to explain the increases in the apoptotic stimuli by ethanol in cells subjected to hyperthermia and the greater efficacy of caspase-9 inhibitor to block cell death in the combined group. It has been well established that HSP70, in addition to its recognized role as a molecular chaperone by assisting accurate folding of nascent polypeptides and misfolded proteins, can block apoptosis induction at several stages of the apoptotic machinery [41]. For example, HSP70 stabilizes the anti-apoptotic factor Mcl-1 [50] and prevents Bax translocation [67,68], interferes in the activation of stress-activated protein kinase SAPK/JNK [69], inhibits the formation of the apoptosome [70,71], neutralizes the apoptosis-inducing factor (AIF) and blocks its nuclear import [72] and may inhibit caspase-3 activity [73,74]. It also has been reported that HSP70 inhibits TRAIL-induced DISC assembly in human acute leukemia cells, blocking therefore the activation of the extrinsic pathway [35]. Our results are in consonance with the recognized anti-apoptotic role of HSP70. Ethanol blocked HSP70 expression and increased the mitochondrial release of cytochrome c and Smac/Diablo triggered by hyperthermia. Therefore, it seems that the inhibition of HSP70 expression contributes to the main role of the mitochondrial pathway of apoptosis in cells exposed to hyperthermia in combination with ethanol, as compared with those only treated with hyperthermia. In fact, pharmacological inhibition of caspase-9 reduced modestly the percentage of apoptotic cells in response to hyperthermia while apoptosis was blocked in a greater extension when ethanol was present during the hyperthermia treatment.

The inhibitory effect of ethanol on HSP70 upregulation stimulated by hyperthermia was also observed in HL60 cells, an acute leukemia cell line in which ethanol also enhances hyperthermia-induced apoptosis. In addition, the effect of ethanol on hyperthermia-induced cell death was explored in other two human leukemia cell lines, MOLT3 and K562. The MOLT3 cells exhibit functional extrinsic and intrinsic apoptotic cell death pathways [75] and K562 cells contain the *Bcr-Abl* fusion gene and express high basal levels of HSP70 [35,76]. Ethanol failed to block HSP70 stimulation and did not increase the toxicity of hyperthermia in MOLT3 cells. These results rule out a non-specific effect of ethanol on the modulation of hyperthermia-induced apoptosis. We also found that K562 cells were highly resistant to hyperthermia and ethanol was unable to modulate this response. This is in accordance with the pro-survival role of HSP70 described in a number of tumors [77]. HSP70 gene transcription is regulated by the heat shock transcription factor 1 (HSF1), which becomes activated in response to hyperthermia among other stress stimuli [78]. Transcriptional activation of HSF1 is a complex process that sequentially involves translocation from the cytoplasm to the nucleus, trimerization, binding to the heat shock element (HSE) on DNA and phosphorylation [79]. It has been reported that ethanol is able to mediate activation of HSF1 and induction of HSP70 on human monocytes [80] and on cortical neurons [81,82]. On the contrary, catalase—which has been widely used as antioxidant—augmented the percentage of apoptotic cells in U937 cells subjected to heat, and decreased HSP70 expression through a mechanism involving HSF1 modulation [42]. In this context, it is interesting to note that ethanol under certain conditions may act as an indirect antioxidant [83] and that, in our conditions, there was not any evidence of oxidative stress by heat shock (Supplementary Materials, Figure S2). In consonance with

these results, the antioxidants *N*-acetyl-L-cysteine (5 mM), glutathione (1 mM), allopurinol (10 μ M), diphenyleneiodonium chloride (20 μ M), and tiron (20 μ M) were unable to block the effect of ethanol on apoptosis in cells exposed to hyperthermia (Supplementary Materials, Figure S3). Interestingly, the presence of ethanol during hyperthermia treatment was a requisite to achieve potentiation since there was not any effect when the alcohol was added at the beginning of the recovery period. These findings rule out non-specific effects and highly suggest that ethanol interferes in a step which is activated in the short time period (30 min) interval of hyperthermia treatment. These observations focus on HSF1 activation which is recognized to contain a sequence functioning as a quick temperature sensor [84]. It is accepted that the heat shock period corresponds to the moment in which HSF1 undergoes activation and binding to DNA, while the expression of HSP70 is achieved in the recovery period [42]. Further studies will be required to know whether ethanol modulates HSF1 activation and which step/s (if any) is modified.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents

Protease inhibitors, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2-DCF-DA), specific caspase inhibitors (z-DEVD-fmk, z-IETD-fmk, z-LEHD-fmk) and the colorimetric caspase substrates (Ac-DEVD-pNA, Ac-IETD-pNA and Ac-LEHD-pNA) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). The pancaspase inhibitor z-VAD-fmk was obtained from Tocris (Bristol, UK). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were purchased from Millipore (Billerica, MA, USA). Acrylamide, bisacrylamide and the Bradford reagent were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Antibodies against caspase-3 (Cat# ADI-AAP-113-F, RRID:AB_11180615), caspase-8 (Cat# ADI-AAM-118-E, RRID:AB_2038943) and caspase-9 (Cat# ADI-AAM-139-E, RRID:AB_2038946) were from Enzo Life Sciences. Antibodies against Bcl-2 (Cat# 2872, RRID:AB_10693462), Bcl-xL (Cat# 2764, RRID:AB_2228008), Mcl-1 (Cat# 4572, RRID:AB_2281980), Bax (Cat# 2772, RRID:AB_10695870), Bid (Cat# 2002, RRID:AB_10692485) and α -tubulin (Cat# 2125, RRID:AB_2619646) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies against PARP (Cat# 551024, RRID:AB_394008), cytochrome c (Cat# 556433, RRID:AB_396417), Smac/DIABLO (Cat# 612246, RRID:AB_399569) and Beclin-1 (Cat# 612112, RRID:AB_399483) were from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Antibody against HSP70 (Cat# sc-24, RRID:AB_627760) and c-IAP1/2 (Cat# sc-12410, RRID:AB_2227909) were from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Secondary antibodies (Cat# NA9310, RRID:AB_772193; Cat# NA9340, RRID:AB_772191) were obtained from GE Healthcare (Little Chalfont, UK). Ethanol absolute was from Applichem GmbH (Darmstadt, Germany).

4.2. Cell Culture

Human leukemia cells U937 (DSMZ Cat# ACC-5, RRID:CVCL_0007), HL60 (DSMZ Cat# ACC-3, RRID:CVCL_0002), MOLT3 (DSMZ Cat# ACC-84, RRID:CVCL_0624), and K562 (DSMZ Cat# ACC-10, RRID:CVCL_0004) were grown in RPMI 1640 supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cell numbers were counted using a hemacytometer and the viability was >95% at the start of the experiments.

4.3. Exposure to Hyperthermia

At the beginning of each experiment the cells were resuspended with fresh growth medium and adjusted to 0.5×10^6 cells/mL. The cells were treated with the specified percentage of ethanol, placed into sterile cell culture tubes and incubated for 30 min at 37 °C. Next, tubes were immersed for 30 min in a water bath previously adjusted at 37 °C (control) or 43 °C (hyperthermia treatment). Finally, the cells were transferred to cell culture plates, allowed to recover at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for the specified time periods, and harvested for biological analysis.

4.4. Cell Growth and Viability Assays

The cells were collected by centrifugation for 10 min at $500\times g$ and washed with phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature. After staining with a trypan-blue solution (0.4% *w/v* in PBS), the number of cells and the cell viability were determined with a TC10 automated cell counter (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Three samples per group were counted in each experiment and the experiments were performed at least three times.

4.5. Cell Cycle Analysis by Flow Cytometry

The cells were centrifuged at $500\times g$ for 10 min at 4°C , washed with 1 mL of ice-cold PBS, and fixed with 1 mL of ice-cold 75% ethanol at -20°C overnight. The samples were then centrifuged and washed with ice-cold PBS. The cell pellets were resuspended in 200 μL of PBS containing 50 $\mu\text{g/mL}$ propidium iodide and 100 $\mu\text{g/mL}$ RNase A and incubated for 1 h at room temperature. The cell cycle phase distribution was analyzed by flow cytometry using a BD FACSVerserTM flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A minimum of 10,000 cells per experimental condition were evaluated. Cell debris were excluded from analysis. The cells with decreased DNA staining (sub-G₁ cells), resulting from either fragmentation or decreased chromatin, were considered apoptotic cells.

4.6. Annexin V–Propidium Iodide Double-Staining Assay

Apoptosis was also determined by analysing the translocation of phosphatidylserine to the cell surface using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (BD PharMingen, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were collected by centrifugation at $500\times g$ for 10 min at 4°C , washed twice with ice-cold PBS and then resuspended with annexin-binding buffer. A fraction of cell suspension ($\sim 50\ \mu\text{L}$) was incubated at room temperature for 15 min with 2.5 μL annexin V-FITC and 2.5 μL propidium iodide (50 $\mu\text{g/mL}$) and the samples were then diluted with 100 μL annexin-binding buffer and analyzed by flow cytometry.

4.7. Assay of Caspase Activity

The cells were collected by centrifugation at $500\times g$ for 10 min at 4°C , washed twice with ice-cold PBS, and lysed in caspase extraction buffer (50 mM HEPES [pH 7.4], 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% Chaps) by pushing them through a 22-gauge needle. After centrifugation at $16,000\times g$ for 10 min at 4°C the supernatants were analyzed for protein concentration. Aliquots containing $\sim 20\ \mu\text{g}$ of protein were evaluated for caspase activity. Specific labeled substrates for caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activities were N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroaniline (Ac-DEVD-pNA), N-acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline (Ac-IETD-pNA) and N-acetyl-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroaniline (Ac-LEHD-pNA), respectively. Caspase-catalyzed release of the chromophore para-nitroaniline (pNA) from the substrate was measured at 405 nm in a microplate reader. Blanks containing the substrate alone were also included.

4.8. Immunoblotting

Treated cells were collected by centrifugation at $500\times g$ for 10 min at 4°C and washed twice with ice-cold PBS. To obtain cell lysates the cells were maintained on ice and resuspended with buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 2 mM EDTA, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100) containing inhibitors of proteases (1 mM PMSE, 5 $\mu\text{g/mL}$ of leupeptin, aprotinin and pepstatin A) and phosphatases (2 mM tetrasodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 20 mM sodium β -glycerophosphate). The lysates were sonicated on ice and centrifuged at $22,000\times g$ for 15 min at 4°C . The soluble fractions were used to determine the expression of caspase-3, caspase-8, caspase-9, PARP, Bid, BAX, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, cIAP1/2, HSP70 and α -tubulin. To prepare subcellular fractions, cells were kept on ice, resuspended in buffer B (20 mM HEPES [pH 7.4]), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 250 mM sucrose) supplemented with protease inhibitors as above and lysed with a 22-gauge needle. Lysates were centrifuged

at $1000\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to remove the nuclei. The resulting supernatants were centrifuged at $22,000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ to obtain the cytosolic (soluble) fractions, used to determine cytochrome c, Smac/Diablo and α -tubulin. Whole cell lysates and cytosolic extracts were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until used. Protein content was quantified by the Bradford method. Samples containing equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and then incubated with specific antibodies at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. Blots were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and proteins detected by chemiluminescence (Millipore, Billerica, MA, USA).

4.9. Analysis of Mitochondrial Membrane Potential

The cells (5×10^5) were incubated with $10\text{ }\mu\text{M}$ of fluorescent probe JC-1 for the last 30 min of recovery, collected by centrifugation at $500\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, washed with ice-cold PBS, and resuspended in $200\text{ }\mu\text{L}$ of PBS. This cationic and lipophilic probe accumulates and aggregates into active mitochondria of healthy cells, and aggregates emit fluorescence at 590 nm (red). Once mitochondrial membrane potential decreases, as occur upon cell injury, aggregates are transformed back into JC-1 monomers which emit fluorescence at 529 nm (green). Consequently, mitochondrial depolarization is indicated by a reduction in the red fluorescence. Cells were analyzed on a BD FACSVerse™ flow cytometer (Becton-Dickinson) using a 488 nm excitation with $527/32\text{ nm}$ and $586/42\text{ nm}$ bandpass emission filters. In each study, 10,000 cells were evaluated, and cell debris were excluded from analysis. Cells treated with $50\text{ }\mu\text{M}$ of the depolarizing agent carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) for 30 min were used as a positive control; in these conditions $>95\%$ of cells exhibited low mitochondrial membrane potential.

4.10. Intracellular Reactive Oxygen Species Determination

After treatment, the cells were further incubated with $10\text{ }\mu\text{M}$ of fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{-DCF-DA}$, oxidation-sensitive by peroxides) or dihydroethidium (DHE, oxidation-sensitive by superoxide anion) for 30 min. The cells were collected by centrifugation at $500\times g$ for 10 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, washed with ice-cold PBS and analyzed on a BD FACSVerse™ flow cytometer (Becton-Dickinson) using a 488 nm excitation with $527/32\text{ nm}$ (for detection of $\text{H}_2\text{-DCF-DA}$ oxidation) or $586/42\text{ nm}$ (for detection of DHE oxidation) bandpass emission filters. In each study 10,000 cells were evaluated, and cell debris were excluded from analysis.

4.11. Statistical Analysis

Data are presented as means $\pm$ SE. All determinations were performed in triplicate, and the data shown are representative results from at least three independent experiments. Statistical differences between means were tested using (i) Student's *t* test (two samples) or (ii) one-way analysis of variance (ANOVA; three or more samples) with posteriori pairwise comparisons of means carried out using Tukey's test. A significance level of $p < 0.05$ was used.

5. Conclusions

The data presented here allow us to conclude that ethanol enhances the effectiveness of hyperthermia to induce cell death on human leukemia cells through a mechanism dependent on caspase activation and associated with the decrease in the HSP70 protein (Figure 7). Because the effect of ethanol was achieved with non-cytotoxic concentrations, the results highly suggest its potential as a sensitizer of apoptosis in hyperthermia therapy for cancer.

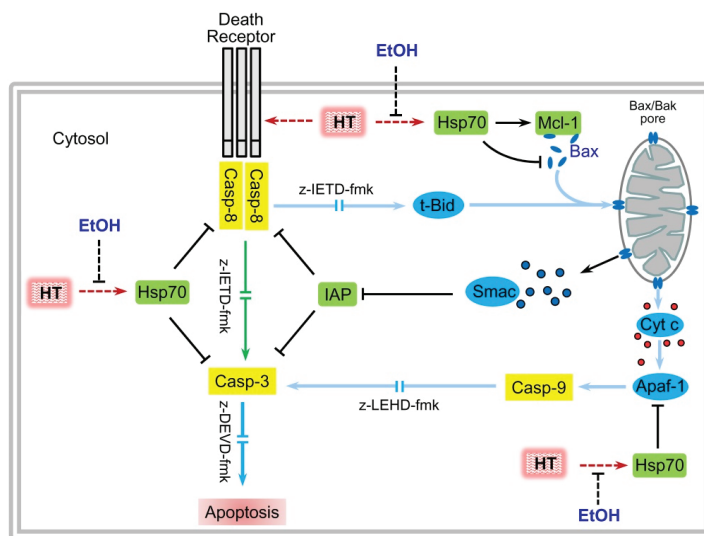


Figure 7. Ethanol enhances apoptotic cell death triggered by hyperthermia on human leukemia cells. Hyperthermia (HT) treatment alone stimulates apoptosis through a mechanism involving mainly caspase-8 and caspase-3 activities and increases the levels of the survival factor HSP70 which is able to: (i) stabilize the anti-apoptotic factor Mcl-1, (ii) to block Bax translocation and apoptosome formation (via binding to Apaf-1) and (iii) to inhibit caspase-8 and caspase-3. Ethanol abrogates hyperthermia-induced HSP70 expression, leading to an increase in caspase-8 activity, hydrolysis of Bid, translocation of Bax, release of mitochondrial factors (cytochrome c and Smac) and finally increase in caspase-9 and caspase-3 activities. Cyt c, cytochrome c; z-IETD-fmk, caspase-8 inhibitor, z-LEHD-fmk, caspase-9 inhibitor; z-DEVD-fmk, caspase-3 inhibitor; tBid, truncated Bid.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22094948/s1>, Figure S1: Autophagy is not involved in the enhancement of hyperthermia-induced apoptotic cell death by ethanol, Figure S2: Ethanol does not stimulate reactive oxygen species generation in cells subjected to hyperthermia, Figure S3: Anti-oxidants do not block the enhancement of hyperthermia-induced apoptotic cell death by ethanol. Whole Western blots.

Author Contributions: M.Q., E.S., H.d.R., I.G. and I.H. conducted all experiments and analyzed the data. J.Q. designed the experiments and wrote the manuscript. F.E. and J.Q. drafted the final version of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FEDER and Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (PROID2017010095 FEDER/ACIISI).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data is contained within the article or Supplementary Materials.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 7–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**. [\[CrossRef\]](#)
3. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

4. Olsson, M.; Zhivotovsky, B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ.* **2011**, *18*, 1441–1449. [\[CrossRef\]](#)
5. Pop, C.; Salvesen, G.S. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21777–21781. [\[CrossRef\]](#)
6. Green, D.R. The coming decade of cell death research: Five riddles. *Cell* **2019**, *177*, 1094–1107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Shaked, Y. The pro-tumorigenic host response to cancer therapies. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 667–685. [\[CrossRef\]](#)
8. Boumahdi, S.; de Sauvage, F.J. The great escape: Tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 39–56. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Yang, Y.; He, P.-Y.; Zhang, Y.; Li, N. Natural products targeting the mitochondria in cancers. *Molecules* **2020**, *26*, 92. [\[CrossRef\]](#)
10. Kok, H.P.; Cressman, E.N.K.; Ceelen, W.; Brace, C.L.; Ivkov, R.; Grüll, H.; Ter Haar, G.; Wust, P.; Crezee, J. Heating technology for malignant tumors: A review. *Int. J. Hyperth.* **2020**, *37*, 711–741. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Bergs, J.W.J.; Franken, N.A.P.; Haveman, J.; Geijsen, E.D.; Crezee, J.; van Bree, C. Hyperthermia, cisplatin and radiation trimodality treatment: A promising cancer treatment? A review from preclinical studies to clinical application. *Int. J. Hyperth.* **2007**, *23*, 329–341. [\[CrossRef\]](#)
12. Roigas, J.; Wallen, E.S.; Loening, S.A.; Moseley, P.L. Effects of combined treatment of chemotherapeutics and hyperthermia on survival and the regulation of heat shock proteins in Dunning R3327 prostate carcinoma cells. *Prostate* **1998**, *34*, 195–202. [\[CrossRef\]](#)
13. Datta, N.R.; Ordóñez, S.G.; Gaip, U.S.; Paulides, M.M.; Crezee, H.; Gellermann, J.; Marder, D.; Puric, E.; Bodis, S. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treat. Rev.* **2015**, *41*, 742–753. [\[CrossRef\]](#)
14. Ahmed, K.; Tabuchi, Y.; Kondo, T. Hyperthermia: An effective strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Apoptosis* **2015**, *20*, 1411–1419. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Skandalakis, G.P.; Rivera, D.R.; Rizea, C.D.; Bouras, A.; Jesu Raj, J.G.; Bozec, D.; Hadjipanayis, C.G. Hyperthermia treatment advances for brain tumors. *Int. J. Hyperth.* **2020**, *37*, 3–19. [\[CrossRef\]](#)
16. Welch, W.J.; Suhan, J.P. Morphological study of the mammalian stress response: Characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.* **1985**, *101*, 1198–1211. [\[CrossRef\]](#)
17. Overgaard, J.; Nielsen, O.S. The importance of thermotolerance for the clinical treatment with hyperthermia. *Radiother. Oncol.* **1983**, *1*, 167–178. [\[CrossRef\]](#)
18. Li, G.C.; Mivechi, N.F.; Weitzel, G. Heat shock proteins, thermotolerance, and their relevance to clinical hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* **1995**, *11*, 459–488. [\[CrossRef\]](#)
19. To, K.K.W.; Poon, D.C.; Wei, Y.; Wang, F.; Lin, G.; Fu, L. Pelitinib (EKB-569) targets the up-regulation of ABCB1 and ABCG2 induced by hyperthermia to eradicate lung cancer. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172*, 4089–4106. [\[CrossRef\]](#)
20. Park, J.; Baek, S.H. Combination therapy with cinnamaldehyde and hyperthermia induces apoptosis of a549 non-small cell lung carcinoma cells via regulation of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase family. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6229. [\[CrossRef\]](#)
21. Alcala, M.A.; Park, K.; Yoo, J.; Lee, D.-H.; Park, B.-H.; Lee, B.-C.; Bartlett, D.L.; Lee, Y.J. Effect of hyperthermia in combination with TRAIL on the JNK-Bim signal transduction pathway and growth of xenograft tumors. *J. Cell Biochem.* **2010**, *110*, 1073–1081. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Song, X.; Kim, S.-Y.; Lee, Y.J. Evidence for two modes of synergistic induction of apoptosis by mapatumumab and oxaliplatin in combination with hyperthermia in human colon cancer cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73654. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Mantso, T.; Vasileiadis, S.; Anastopoulos, I.; Voulgaridou, G.P.; Lampri, E.; Botaitis, S.; Kontomanolis, E.N.; Simopoulos, C.; Goussetis, G.; Franco, R.; et al. Hyperthermia induces therapeutic effectiveness and potentiates adjuvant therapy with non-targeted and targeted drugs in an in vitro model of human malignant melanoma. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10724. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Quintana, C.; Cabrera, J.; Perdomo, J.; Estévez, F.; Loro, J.F.; Reiter, R.J.; Quintana, J. Melatonin enhances hyperthermia-induced apoptotic cell death in human leukemia cells. *J. Pineal Res.* **2016**, *61*, 381–395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Sun, L.; Cui, Z.-G.; Zakki, S.A.; Feng, Q.-W.; Li, M.-L.; Inadera, H. Mechanistic study of nonivamide enhancement of hyperthermia-induced apoptosis in U937 cells. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *120*, 147–159. [\[CrossRef\]](#)
26. Li, P.; Zhao, Q.-L.; Jawaid, P.; Rehman, M.U.; Ahmed, K.; Sakurai, H.; Kondo, T. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by 5z-7-oxozeanol, a TAK1 Inhibitor, in Molt-4 cells. *Int. J. Hyperth.* **2017**, *33*, 411–418. [\[CrossRef\]](#)
27. Milani, V.; Lorenz, M.; Weinkauff, M.; Rieken, M.; Pastore, A.; Dreyling, M.; Issels, R. Combination of hyperthermia and bortezomib results in additive killing in mantle cell lymphoma cells. *Int. J. Hyperth.* **2009**, *25*, 262–272. [\[CrossRef\]](#)
28. Comporti, M.; Signorini, C.; Leoncini, S.; Gardi, C.; Ciccoli, L.; Giardini, A.; Vecchio, D.; Arezzini, B. Ethanol-induced oxidative stress: Basic knowledge. *Genes Nutr.* **2010**, *5*, 101–109. [\[CrossRef\]](#)
29. von Haefen, C.; Siffringer, M.; Menk, M.; Spies, C.D. Ethanol enhances susceptibility to apoptotic cell death via down-regulation of autophagy-related proteins. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2011**, *35*, 1381–1391. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Vaculová, A.; Hofmanová, J.; Soucek, K.; Andera, L.; Kozubík, A. Ethanol acts as a potent agent sensitizing colon cancer cells to the TRAIL-induced apoptosis. *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 309–313. [\[CrossRef\]](#)
31. Moulin, M.; Carpentier, S.; Levade, T.; Arrigo, A.-P. Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. *Apoptosis* **2007**, *12*, 1703–1720. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

32. Plante, M.K.; Arscott, W.T.; Folsom, J.B.; Tighe, S.W.; Dempsey, R.J.; Wesley, U.V. Ethanol promotes cytotoxic effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through induction of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **2013**, *16*, 16–22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Xie, X.; Wang, S.S.; Wong, T.C.S.; Fung, M.C. Genistein promotes cell death of ethanol-stressed HeLa cells through the continuation of apoptosis or secondary necrosis. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13*, 63. [\[CrossRef\]](#)
34. Ogony, J.; Matthews, R.; Anni, H.; Shannon, K.; Ercal, N. The mechanism of elevated toxicity in HepG2 cells due to combined exposure to ethanol and ionizing radiation. *J. Appl. Toxicol.* **2008**, *28*, 345–355. [\[CrossRef\]](#)
35. Guo, F.; Sigua, C.; Bali, P.; George, P.; Fiskus, W.; Scuto, A.; Annavarapu, S.; Mouttaki, A.; Sondarva, G.; Wei, S.; et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood* **2005**, *105*, 1246–1255. [\[CrossRef\]](#)
36. Du, C.; Fang, M.; Li, Y.; Li, L.; Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **2000**, *102*, 33–42. [\[CrossRef\]](#)
37. Kalkavan, H.; Green, D.R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 46–55. [\[CrossRef\]](#)
38. Llambi, F.; Green, D.R. Apoptosis and oncogenesis: Give and take in the BCL-2 family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2011**, *21*, 12–20. [\[CrossRef\]](#)
39. Zhu, P.-J.; Yu, Z.-Z.; You, Q.-D.; Jiang, Z.-Y. Myeloid cell leukemia-1 inhibitors: A growing arsenal for cancer therapy. *Drug Discov. Today* **2020**, *25*, 1873–1882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Jiang, X.; Wang, X. Cytochrome c-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 87–106. [\[CrossRef\]](#)
41. Albakova, Z.; Armeev, G.A.; Kanevskiy, L.M.; Kovalenko, E.I.; Sapozhnikov, A.M. HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells* **2020**, *9*, 587. [\[CrossRef\]](#)
42. Sancho, P.; Troyano, A.; Fernández, C.; De Blas, E.; Aller, P. Differential Effects of Catalase on Apoptosis Induction in Human Promonocytic Cells. Relationships with Heat-Shock Protein Expression. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 581–589. [\[CrossRef\]](#)
43. Linthorst, M.; Baaijens, M.; Wiggenraad, R.; Creutzberg, C.; Ghidry, W.; van Rhoon, G.C.; van der Zee, J. Local control rate after the combination of re-irradiation and hyperthermia for irresectable recurrent breast cancer: Results in 248 patients. *Radiother. Oncol.* **2015**, *117*, 217–222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Mei, X.; ten Cate, R.; van Leeuwen, C.M.; Rodermond, H.M.; de Leeuw, L.; Dimitrakopoulou, D.; Stalpers, L.J.A.; Crezee, J.; Kok, H.P.; Franken, N.A.P.; et al. Radiosensitization by hyperthermia: The effects of temperature, sequence, and time interval in cervical cell lines. *Cancers* **2020**, *12*, 582. [\[CrossRef\]](#)
45. Hervault, A.; Thanh, N.T.K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale* **2014**, *6*, 11553–11573. [\[CrossRef\]](#)
46. Kobayashi, T.; Kakimi, K.; Nakayama, E.; Jimbow, K. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. *Nanomedicine* **2014**, *9*, 1715–1726. [\[CrossRef\]](#)
47. Sahin, O.; Meiyazhagan, A.; Ajayan, P.M.; Krishnan, S. Immunogenicity of externally activated nanoparticles for cancer therapy. *Cancers* **2020**, *12*, 3559. [\[CrossRef\]](#)
48. Hou, C.-H.; Lin, F.-L.; Hou, S.-M.; Liu, J.-F. Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 17380–17395. [\[CrossRef\]](#)
49. Katschinski, D.M.; Boos, K.; Schindler, S.G.; Fandrey, J. Pivotal role of reactive oxygen species as intracellular mediators of hyperthermia-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21094–21098. [\[CrossRef\]](#)
50. Stankiewicz, A.R.; Livingstone, A.M.; Mohseni, N.; Mosser, D.D. Regulation of heat-induced apoptosis by Mcl-1 degradation and its inhibition by Hsp70. *Cell Death Differ.* **2009**, *16*, 638–647. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Jin, M.; Ande, A.; Kumar, A.; Kumar, S. Regulation of Cytochrome P450 2e1 Expression by Ethanol: Role of Oxidative Stress-Mediated Pkc/Jnk/Sp1 Pathway. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e554. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Rao, P.S.S.; Kumar, S. Chronic effects of ethanol and/or darunavir/ritonavir on U937 monocytic cells: Regulation of cytochrome P450 and antioxidant enzymes, oxidative stress, and cytotoxicity. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2016**, *40*, 73–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Yu, D.-Y.; Matsuya, Y.; Zhao, Q.-L.; Ahmed, K.; Wei, Z.-L.; Nemoto, H.; Kondo, T. Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by a new synthesized class of furan-fused tetracyclic compounds. *Apoptosis* **2007**, *12*, 1523–1532. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. De Miguel, D.; Gallego-Lleyda, A.; Anel, A.; Martínez-Lostao, L. Liposome-bound TRAIL induces superior DR5 clustering and enhanced disc recruitment in histiocytic lymphoma U937 cells. *Leuk. Res.* **2015**, *39*, 657–666. [\[CrossRef\]](#)
55. Salvador-Gallego, R.; Mund, M.; Cosentino, K.; Schneider, J.; Unsay, J.; Schraermeyer, U.; Engelhardt, J.; Ries, J.; García-Sáez, A.J. Bax assembly into rings and arcs in apoptotic mitochondria is linked to membrane pores. *EMBO J.* **2016**, *35*, 389–401. [\[CrossRef\]](#)
56. Bleicken, S.; Jeschke, G.; Stegmüller, C.; Salvador-Gallego, R.; García-Sáez, A.J.; Bordignon, E. Structural model of active Bax at the membrane. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 496–505. [\[CrossRef\]](#)
57. Ricci, J.-E.; Muñoz-Pinedo, C.; Fitzgerald, P.; Bailly-Maitre, B.; Perkins, G.A.; Yadava, N.; Scheffler, I.E.; Ellisman, M.H.; Green, D.R. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* **2004**, *117*, 773–786. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Bossy-Wetzel, E.; Newmeyer, D.D.; Green, D.R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* **1998**, *17*, 37–49. [\[CrossRef\]](#)

59. Jost, P.J.; Grabow, S.; Gray, D.; McKenzie, M.D.; Nachbur, U.; Huang, D.C.S.; Bouillet, P.; Thomas, H.E.; Borner, C.; Silke, J.; et al. XIAP Discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **2009**, *460*, 1035–1039. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Yang, Q.-H.; Du, C. Smac/DIABLO Selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and Livin in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16963–16970. [\[CrossRef\]](#)
61. Ichim, G.; Tait, S.W.G. A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 539–548. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Fan, F.; Tonon, G.; Bashari, M.H.; Vallet, S.; Antonini, E.; Goldschmidt, H.; Schulze-Bergkamen, H.; Opferman, J.T.; Sattler, M.; Anderson, K.C.; et al. Targeting Mcl-1 for multiple myeloma (MM) therapy: Drug-induced generation of Mcl-1 fragment Mcl-1(128–350) triggers MM cell death via c-Jun upregulation. *Cancer Lett.* **2014**, *343*, 286–294. [\[CrossRef\]](#)
63. Zhang, H.; Guttikonda, S.; Roberts, L.; Uziel, T.; Semizarov, D.; Elmore, S.W.; Levenson, J.D.; Lam, L.T. Mcl-1 is critical for survival in a subgroup of non-small-cell lung cancer cell lines. *Oncogene* **2011**, *30*, 1963–1968. [\[CrossRef\]](#)
64. Yang, Y.; Li, F.; Saha, M.N.; Abdi, J.; Qiu, L.; Chang, H. miR-137 and MiR-197 induce apoptosis and suppress tumorigenicity by targeting Mcl-1 in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 2399–2411. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Cui, Z.-G.; Piao, J.-L.; Kondo, T.; Ogawa, R.; Tsuneyama, K.; Zhao, Q.-L.; Feril, L.B.; Inadera, H. Molecular mechanisms of hyperthermia-induced apoptosis enhanced by docosahexaenoic acid: Implication for cancer therapy. *Chem. Biol. Interact.* **2014**, *215*, 46–53. [\[CrossRef\]](#)
66. Zakki, S.A.; Cui, Z.-G.; Sun, L.; Feng, Q.-W.; Li, M.-L.; Inadera, H. Baicalin augments hyperthermia-induced apoptosis in u937 cells and modulates the MAPK pathway via ros generation. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *45*, 2444–2460. [\[CrossRef\]](#)
67. Gotoh, T.; Terada, K.; Oyadomari, S.; Mori, M. Hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, 390–402. [\[CrossRef\]](#)
68. Stankiewicz, A.R.; Lachapelle, G.; Foo, C.P.Z.; Radicioni, S.M.; Mosser, D.D. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38729–38739. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Gabai, V.L.; Meriin, A.B.; Mosser, D.D.; Caron, A.W.; Rits, S.; Shifrin, V.I.; Sherman, M.Y. Hsp70 prevents activation of stress kinases: a novel pathway of cellular thermotolerance. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18033–18037. [\[CrossRef\]](#)
70. Beere, H.M.; Wolf, B.B.; Cain, K.; Mosser, D.D.; Mahboubi, A.; Kuwana, T.; Tailor, P.; Morimoto, R.I.; Cohen, G.M.; Green, D.R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 469–475. [\[CrossRef\]](#)
71. Saleh, A.; Srinivasula, S.M.; Balkir, L.; Robbins, P.D.; Alnemri, E.S. Negative Regulation of the Apaf-1 Apoptosome by Hsp70. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 476–483. [\[CrossRef\]](#)
72. Gurbuxani, S.; Schmitt, E.; Cande, C.; Parcellier, A.; Hammann, A.; Daugas, E.; Kouranti, I.; Spahr, C.; Pance, A.; Kroemer, G.; et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* **2003**, *22*, 6669–6678. [\[CrossRef\]](#)
73. Komarova, E.Y.; Afanasyeva, E.A.; Bulatova, M.M.; Cheetham, M.E.; Margulis, B.A.; Guzhova, I.V. Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone Hsp70. *Cell Stress Chaperones* **2004**, *9*, 265–275. [\[CrossRef\]](#)
74. Sverchinsky, D.V.; Nikotina, A.D.; Komarova, E.Y.; Mikhaylova, E.R.; Aksenov, N.D.; Lazarev, V.F.; Mitkevich, V.A.; Suezov, R.; Druzhilovskiy, D.S.; Porokov, V.V.; et al. Etoposide-induced apoptosis in cancer cells can be reinforced by an uncoupled link between Hsp70 and caspase-3. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2519. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Perdomo, J.; Cabrera, J.; Estévez, F.; Loro, J.; Reiter, R.J.; Quintana, J. Melatonin induces apoptosis through a caspase-dependent but reactive oxygen species-independent mechanism in human leukemia Molt-3 cells. *J. Pineal Res.* **2013**, *55*, 195–206. [\[CrossRef\]](#)
76. Demidenko, Z.N.; Vivo, C.; Halicka, H.D.; Li, C.J.; Bhalla, K.; Broude, E.V.; Blagosklonny, M.V. Pharmacological induction of Hsp70 protects apoptosis-prone cells from doxorubicin: Comparison with caspase-inhibitor- and cycle-arrest-mediated cytoprotection. *Cell Death Differ.* **2006**, *13*, 1434–1441. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Sherman, M.Y.; Gabai, V.L. Hsp70 in cancer: Back to the future. *Oncogene* **2015**, *34*, 4153–4161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Kumar, S.; Stokes, J.; Singh, U.P.; Scissum Gunn, K.; Acharya, A.; Manne, U.; Mishra, M. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* **2016**, *374*, 156–166. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Kmiecik, S.W.; Le Breton, L.; Mayer, M.P. Feedback regulation of heat shock factor 1 (Hsf1) activity by Hsp70-mediated trimer unzipping and dissociation from DNA. *EMBO J.* **2020**, *39*, e104096. [\[CrossRef\]](#)
80. Muralidharan, S.; Ambade, A.; Fulham, M.A.; Deshpande, J.; Catalano, D.; Mandrekar, P. Moderate alcohol induces stress proteins HSF1 and Hsp70 and inhibits proinflammatory cytokines resulting in endotoxin tolerance. *J. Immunol.* **2014**, *193*, 1975–1987. [\[CrossRef\]](#)
81. Pignataro, L.; Miller, A.N.; Ma, L.; Midha, S.; Protiva, P.; Herrera, D.G.; Harrison, N.L. Alcohol regulates gene expression in neurons via activation of heat shock factor 1. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 12957–12966. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Pignataro, L. Alcohol protects the CNS by activating HSF1 and inducing the heat shock proteins. *Neurosci. Lett.* **2019**, *713*, 134507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Casañas-Sánchez, V.; Pérez, J.A.; Quinto-Aleman, D.; Díaz, M. Sub-toxic ethanol exposure modulates gene expression and enzyme activity of antioxidant systems to provide neuroprotection in hippocampal HT22 cells. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 312. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Hentze, N.; Le Breton, L.; Wiesner, J.; Kempf, G.; Mayer, M.P. Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *eLife* **2016**, *5*, e11576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

