

**Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Facultad de Medicina**

**Instituto Nacional de Cancerología.**

**Expresión de los receptores de PDGF y sus ligandos en cáncer cervicouterino. Implicaciones para el uso terapéutico de mesilato de Imatinib.**

**TESIS**

**Que para obtener el título de especialista en Oncología Médica presenta:**

**Dr. Jorge Luis Martínez Tlahuel.**

**Tutor:**

**Dr. Alfonso Dueñas González.**

**Director de Investigación, Instituto Nacional de Cancerología.**

**Asesor:**

**M. en C.: Alma Chávez Blanco.**

**Investigador en Ciencias Médicas B, Instituto Nacional de Cancerología**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **ÍNDICE.**

	<b>Pag.</b>
<b>Resumen.</b>	<b>4</b>
<b>Introducción.</b>	<b>5</b>
<b>Antecedentes.</b>	<b>15</b>
<b>Justificación.</b>	<b>18</b>
<b>Hipótesis.</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos.</b>	<b>20</b>
<b>Material y Métodos.</b>	<b>21</b>
<b>Análisis estadístico.</b>	<b>24</b>
<b>Resultados.</b>	<b>25</b>
<b>Discusión.</b>	<b>32</b>
<b>Conclusión.</b>	<b>34</b>
<b>Bibliografía.</b>	<b>35</b>

## **Resumen:**

**El cáncer cervicouterino (CaCU) es la principal causa de muerte en mujeres en edad reproductiva en todo el mundo, principalmente en países en vías de desarrollo, como el nuestro. Mientras que la enfermedad es curable en estadios clínicos tempranos, los resultados del tratamiento multimodal (cirugía, radioterapia y quimioterapia) en la enfermedad localmente avanzada y metastásica son insatisfactorios. Por lo tanto, es necesario investigar blancos moleculares, implicados en la fisiopatogenia, que puedan ser blanco de terapia molecular, que mejore el pronóstico de las pacientes con cáncer de cérvix. La finalidad de este trabajo fue evaluar *in vitro* en una línea de CaCu el papel del mesilato de imatinib en la proliferación celular dependiente del PDGFR $\alpha$ . Por medio de IHQ se documentó la expresión del PDGFR $\alpha$  y  $\beta$  en el 43% y 48%, respectivamente de 36 muestras de pacientes con CaCu. Basados en estos datos se realizaron IHQ en 8 líneas de CaCu presentes en el laboratorio. Las 8 líneas celulares fueron positivas para el PDGFR $\alpha$ .**

**La línea celular CaLo expresó el PDGFR $\alpha$  y los ligandos AA y BB, esta línea se tomó para realizar posteriormente los ensayos *in vitro*.**

**Se demostró que el mesilato de imatinib inhibe el crecimiento celular por interferir en la vía de fosforilación del PDGFR $\alpha$ . Estos resultados abren la pauta a realizar ensayos clínicos fase II, con la finalidad de poder ofrecer a los pacientes terapias alternativas y quizá con mejores resultados que con la terapia convencional.**

## **Introducción:**

**El cáncer cervicouterino es la principal causa de muerte en mujeres en edad reproductiva en el mundo, particularmente en países en vías de desarrollo, como el nuestro. De acuerdo a las estadísticas mundiales publicadas en el año 2000, se diagnosticaron 470, 606 casos, de las cuales murieron 233, 372 pacientes.<sup>1</sup> Es importante mencionar que esto ocurre a pesar de conocer la historia natural de la enfermedad, así como la oportunidad de detectarla y tratarla, antes de llegar a ser invasiva.<sup>2</sup> Tenemos una prueba sencilla, -citología cervical, Papanicolaou-, como método efectivo y sencillo de escrutinio. La epidemiología del cáncer cervicouterino esta ligado fuertemente al estilo de vida de la población en las diferentes áreas geográficas del mundo, por ejemplo, algunas países tiene una tasa de mortalidad mayor a 70 por 100, 000 habitantes, mientras que otros tienen una tasa menor a 10 por 100, 000 habitantes. Esto puede deberse en parte a la distribución de las diferentes variantes del virus del papiloma humano. Casas y colaboradores reportaron una alta prevalencia de la variante Asiático Americana del VPH 16 en mujeres mexicanas.<sup>3</sup> Esta variante parece ser más oncogénica que la Europea y puede contribuir a una mayor incidencia de cáncer cervical en la población infectada por esa variante. En los países desarrollados la incidencia ha disminuido de manera importante gracias a los métodos de escrutinio, ya que se detecta a la enfermedad en etapas tempranas, factibles de una tasa de curación cercana al 100%, con manejo local. Por lo tanto, se trata de una enfermedad curable en estadios clínicos tempranos, sin embargo, los resultados del tratamiento en la enfermedad localmente avanzada o**

metastásica son insatisfactorios. La probabilidad de vida en las pacientes con este tipo de cáncer en general, ha mejorado en décadas recientes a consecuencia del manejo multidisciplinario. El tratamiento estándar con quimioterapia y radioterapia concomitante basada en platino, tiene un 15 a 45% de falla en la curación en la etapa clínica IB2 a IIIB, respectivamente. Esta modalidad terapéutica produce un incremento absoluto del 12% en la supervivencia comparado con la radioterapia sola.<sup>4</sup> Por otro lado, la quimioterapia neoadyuvante, cuando es seguida de cirugía (pero no por radioterapia sola) causa un incremento absoluto del 15% en la supervivencia global a los 5 años de seguimiento.<sup>5</sup> A pesar de estos avances en el manejo multimodal (cirugía, radioterapia y quimioterapia), es probable que no se pueda incrementar de manera sustancial el porcentaje de curación. Por lo tanto, un paso lógico será la de probar terapias dirigidas a blancos moleculares para mejorar el pronóstico de las pacientes con cáncer cervicouterino. Se desconoce la causa del cáncer de cérvix, sin embargo, el virus del papiloma humano es reconocido como el principal factor de riesgo para el desarrollo de este tumor. Además la sobre-expresión de los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico es un hallazgo común y puede desempeñar un papel importante en la oncogénesis. Actualmente la atención se ha centrado en el papel de los factores de crecimiento en la patogénesis del cáncer. Hay evidencia creciente de que los tumores dependen de los factores de crecimiento que actúan de manera autócrina y parácrina. La inhibición selectiva de estos factores de crecimiento puede ser una nueva estrategia de manejo para las neoplasias

**Factor de crecimiento derivado de plaquetas.**

**El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-por sus siglas en inglés-) es un potente mitógeno para las células de origen mesenquimatoso. Aislado originalmente de las plaquetas, esta proteína ha sido identificada en una amplia variedad de células de organismos en desarrollo y tejidos adultos. Tabla 1.**

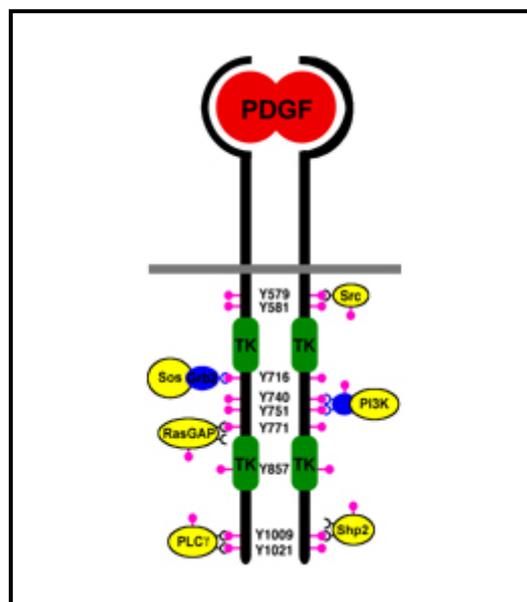
**El PDGF juega un papel central en varios estados patológicos como cáncer, aterosclerosis y enfermedades fibroproliferativas. <sup>6</sup>**

**Los receptores del PDGF se encuentran normalmente en el tejido conectivo y en la glia, pero ausentes en muchos epitelios. La familia del PDGF esta compuesta de isoformas diméricas (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD), que ejecutan sus funciones celulares a través de la unión a receptores con función de tirosina cinasa (TK-por sus siglas en inglés-). El PDGFR- $\alpha$  y el PDGFR- $\beta$  tienen pesos moleculares de ~170 y 180 kDa, respectivamente.<sup>7,8</sup> Cada receptor contiene 5 dominios extracelulares similar a la inmunoglobulinas y un dominio intracelular con actividad de TK, (Figura.1).**

**Tabla 1. Expresión de PDGF-AA y BB en células normales.**

Célula	PDGF
Fibroblasto	+
Queratinocito	+
Leydig	+
Mesangio renal	+
Mioblastos	-
Endotelio vascular	+
Astrocitos	-
Plaquetas	+
Músculo liso	+

Figura.1 Estructura del receptor del PDGF y proteínas de señalización reclutadas a sitios específicos fosforilados del receptor.



La estructura del PDGFR es similar al receptor del factor estimulante de colonias tipo 1 y al c-kit.

Al mismo tiempo que el PDGF promueve el crecimiento celular, este puede ejercer un efecto protector sobre las células al inhibir la apoptosis. En fibroblastos y neuronas, la activación de la vía del fosfatidil inositol-3 cinasa por la unión del PDGF a su receptor lleva a la fosforilación de la cinasa de treonina/serina Akt. La activación de Akt lleva a la fosforilación de BCL-2, miembro de la familia de BAD, que inhibe la interacción de BAD con BCL-2.<sup>9,10</sup>

### Funciones biológica y fisiológica del PDGF:

Todas las isoformas del PDGF, excepto el PDGF-DD, inducen la dimerización del PDGFR $\alpha$ , mientras que el PDGF-BB y PDGF-DD solo pueden activar al PDGFR $\beta$ , la activación de los receptores induce proliferación celular por la estimulación autócrina y parácrina, además de favorecer la angiogénesis. Figura 2 6.8,11.

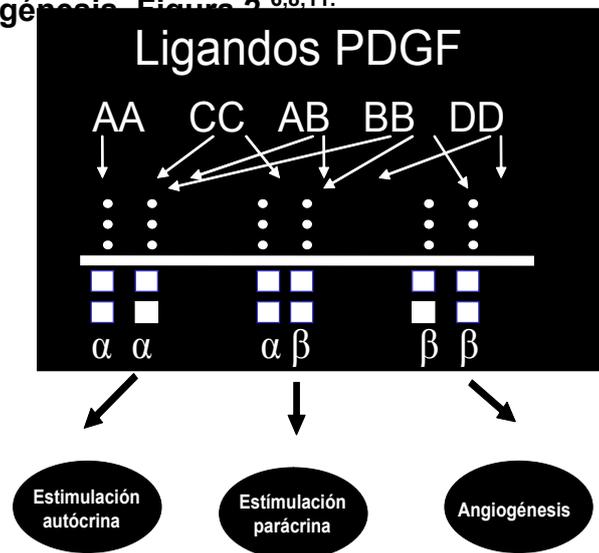


Figura 2. Funciones biológicas del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

La activación de los receptores, condiciona varias respuestas celulares, como; la proliferación celular, supervivencia, y migración.

Las funciones principales del PDGFR $\beta$ , incluyen el reclutamiento de los pericitos a los capilares, el desarrollo de células de músculo liso en los vasos sanguíneos, y el desarrollo de células mesangiales en el riñón. Por otra parte, la activación del PDGFR $\alpha$  por el PDGF-AA, lleva a la formación de células de músculo liso en el alveolo, el desarrollo del folículo piloso, la formación de las vellosidades intestinales, y el desarrollo de los oligodendrocitos. Sin embargo, en el tejido adulto, el PDGF contribuye a la adecuada reparación de los tejidos dañados, a través de la estimulación de fibroblastos, células del músculo liso, y diversas células que actúan en la inflamación. Un hecho relevante, es que el PDGFR $\beta$ , regula de manera importante la presión intersticial y potencialmente controla el transporte de sustancias del espacio intravascular hacia el compartimiento extracelular en el tejido conectivo, Figura 3.

#### **Antagonistas del PDGF:**

Diversos antagonistas del PDGF han sido descritos, los más importantes son los anticuerpos o haptameros contra los ligandos o la porción extracelular de sus receptores; así mismo, existen compuestos de bajo peso molecular, capaces de inhibir la tirosina cinasa<sup>12</sup>. El mesilato de imatinib pertenece a esta familia de medicamentos, además de inhibir al PDGFR $\alpha$  y  $\beta$ , inhibe al kit, Abl y Arg tirosina cinasa. Este fármaco ha sido aprobado por la FDA para el manejo de la leucemia mieloide crónica y para los tumores del estroma gastrointestinal.

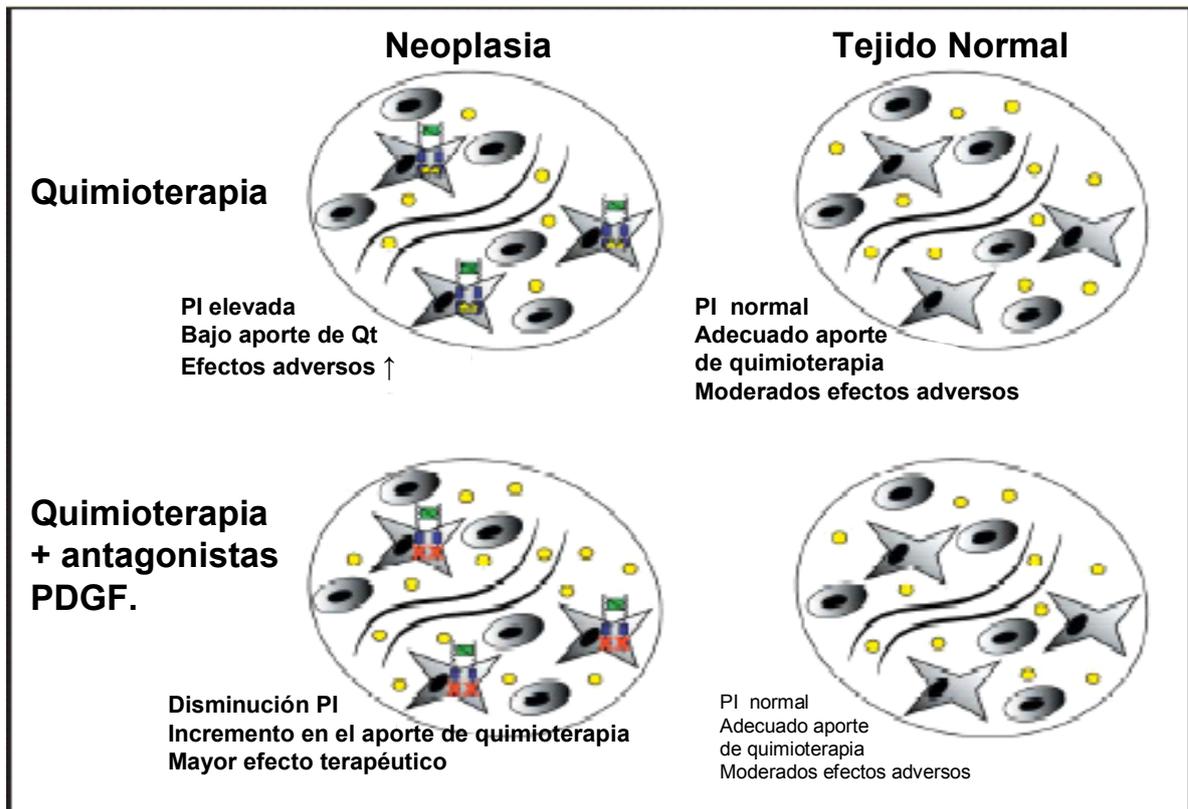
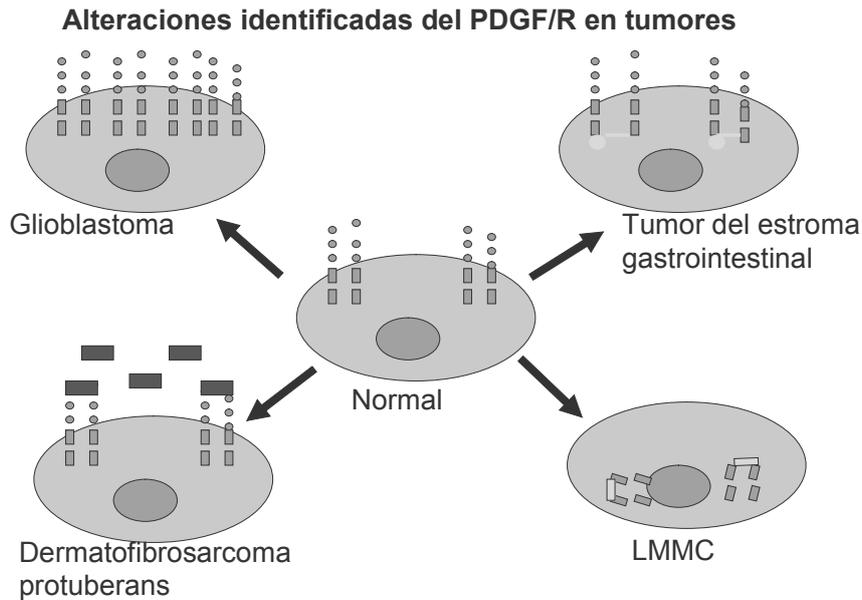


Figura 3. Regulación de la presión intersticial (PI) por el PDGFR $\beta$  y el papel que desempeña en regular el transporte transcelular en tejidos normales y cáncer.

#### Mecanismos patógenos de activación del PDGF:

En ciertas neoplasias, existen alteraciones genéticas que condicionan la activación constitutiva de los receptores del PDGF y la estimulación autócrina<sup>6</sup>. Figura 4.

Por ejemplo, la amplificación del PDGFR $\alpha$ , ocurre en los gliomas de alto grado; la fusión del PDGFR $\beta$  con proteínas ha sido descrita en la leucemia mielomonocítica crónica, en este trastorno la fusión del receptor del PDGF a la rabaptina-5 causa la dimerización del receptor e induce la activación constitutiva del PDGFR.



**Figura 4. Alteraciones genéticas que condicionan la activación constitutiva de los receptores del PDGF y la estimulación autócrina.**

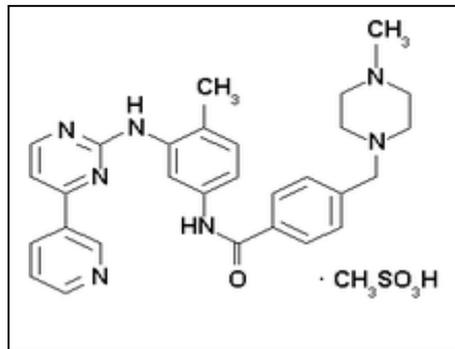
La estimulación parácrina puede afectar el reclutamiento y crecimiento del estroma tumoral. Como puede observarse en la desmoplasia excesiva desarrollada en las células del carcinoma de mama, debido a la producción excesiva de matriz extracelular y a la proliferación de miofibroblastos. Diversos estudios han demostrado *in vitro* el efecto aditivo del uso de imatinib y quimioterapia citotóxica versus imatinib solo sobre los efectos antitumorales.

**Imatinib:**

El imatinib (Fig. 5), fue desarrollado como un inhibidor específico de la proteína con actividad de tirosina cinasa producto de la fusión del Abl-Bcr. El STI571 compite con el ATP (adenosín trifosfato) por su sitio de unión específico en el dominio cinasa y ha demostrado ser altamente efectivo en el manejo de la Leucemia Mieloide Crónica. Además de inhibir

al Bcr-Abl, también inhibe al PDGF, c-kit y a otras tirosinas cinasas<sup>12</sup>,

Tabla 2.



**Figura 5.** El imatinib (4-[(4-metil-1-piperazinil)metil]-N-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2-pirimidinil]amino]-fenyl] benzamida metanesulfonato,).

#### Selectividad celular del mesilato de imatinib.

Cinasa	CI 50 (µM)
v-Abl	0.1-0.3
TEL-Abl	0.25
TEL-Arg	0.35
Receptor del PDGF	0.1
Kit	0.15
Flt-3	>10
c-erbB1, c-erbB2	>100

**Tabla 2. CI50: La concentración de imatinib necesaria para causar una disminución del 50% en la actividad celular cinasa.**

### **Antecedentes:**

Por definición, el crecimiento autócrino ocurre en aquellos tejidos que expresan tanto al receptor como a su ligando. La coexpresión de PDGFR y su ligando ha sido observado en varias neoplasias humanas incluyendo; meningiomas, melanomas, tumores neuroendocrinos, cáncer de ovario, carcinoma pancreático, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de mama, osteosarcoma, y cáncer de próstata. La expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas y sus receptores en cáncer epitelial de ovario tiene implicaciones pronósticas, Henriksen<sup>13</sup> estudio por medio de inmunohistoquímica la co-expresión del PDGFR y sus ligandos en muestras de ovario normal, tumor limítrofe y en cáncer epitelial de ovario, la co-expresión del PDGFR $\alpha$  y su ligando es un factor de pronóstico adverso para la supervivencia global. En líneas celulares de osteosarcoma<sup>14</sup> y cáncer de páncreas<sup>15</sup>, el uso de imatinib produce una inhibición del crecimiento celular y apoptosis, al inhibir la fosforilación del PDGFR. Por otra parte, los tumores del estroma gastrointestinal (TEGI) expresan tanto al c-kit como al PDGFR $\alpha$ , la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC)<sup>16</sup>, realizó análisis mutacionales para predecir la respuesta clínica con el uso del STI571 en el manejo de los TEGI, las principales alteraciones se encontraron en los exones 9, 11, 13 y 17 del c-kit y en los exones 12 y 18 del PDGFR $\alpha$ . Se encontró que el estado mutacional de estas oncoproteínas puede ser útil como predictor de la respuesta clínica,

ya que estos pacientes pueden tener una mayor supervivencia y una menor probabilidad de progresión de la enfermedad.

En próstata, se han realizado estudios fase I y II con la finalidad de demostrar un beneficio en la respuesta según la disminución del antígeno prostático específico, y tiempo para la progresión<sup>17</sup>. Cáceres-Cortes<sup>18</sup> en estudios *in vitro* ha demostrado la presencia de c-kit en dos líneas celulares de cáncer de cérvix (Calo e InBI), donde la estimulación parácrina puede ser un factor importante en la estimulación del crecimiento en cáncer. Sin embargo, no hay estudios en la literatura mundial que estén evaluando el papel del PDGF en el cáncer cervicouterino. Mayer y colaboradores<sup>19</sup>, encontraron que durante las fases tempranas de la progresión del cáncer cervical, el PDGF es importante para el desarrollo y mantenimiento de la displasia, lo que sugiere que pueda tratarse de un marcador clínico en la progresión de la carcinogénesis cervical.

Un hecho sobresaliente es la importancia del PDGFR $\beta$  en la regulación de la presión intersticial, Kristian Pietras<sup>20, 21</sup> ha demostrado en varios estudios *in vitro*, que la expresión del PDGF y sus receptores en el estroma tumoral, causan un incremento en la presión intersticial en diversas líneas celulares de cáncer, lo que puede tener implicaciones terapéuticas y pronósticas. Con respecto a este último aspecto, Milosevic<sup>22</sup> demostró que un incremento en la presión intersticial es un factor independiente de pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad y recaída local en pacientes con cáncer cervicouterino localmente avanzado, tratadas únicamente con radioterapia.

En las décadas pasadas, antagonistas específicos para el PDGF y PDGFR han sido desarrollados y usados para investigar el papel del PDGF en varias enfermedades. Actualmente, se han desarrollado compuestos que inhiben la cinasa del PDGFR. El STI571 fue desarrollado como un inhibidor competitivo del ATP. La capacidad de esta droga para bloquear a la tirosina cinasa de Bcr-Abl, en la leucemia mieloide crónica, lo han llevado a ser aprobada por la Administración de drogas y Alimentos (FDA-por sus siglas en inglés-) en los Estados Unidos para su tratamiento, además de estar indicado para el manejo de los pacientes con tumores del estroma gastrointestinal.

**Justificación:**

**El cáncer cervicouterino es un problema de salud pública, a pesar del manejo multimodal, las tasas de curación han permanecido sin cambio en la enfermedad localmente avanzada y metastásica. Es necesario investigar blancos moleculares que mejoren la respuesta a tratamiento del CaCu, en esta perspectiva el PDGFR puede ser un blanco específico, para el mesilato de imatinib.**

**Hipótesis:**

**Conocer si el PDGF y sus receptores se encuentran expresados en el cáncer cervicouterino y saber si ¿el mesilato de imatinib inhibe el crecimiento celular de una o más líneas celulares de cáncer de cérvix?**

**Objetivos:**

**Determinar en los tumores de las pacientes y/o líneas celulares de carcinoma cervicouterino el estado de expresión de los ligandos y sus receptores.**

**Evaluar si la presencia de PDGF es un factor de pronóstico en la supervivencia de las pacientes con cáncer cervicouterino.**

**Evaluar si el imatinib inhibe el crecimiento celular en líneas celulares de cáncer cervical que expresen el receptor alfa y su(s) ligandos.**

## **Material y Métodos:**

### **Espécimen Tumoral:**

Treinta y seis tejidos de tumor embebidos en parafina de pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de cérvix en etapa clínica IB2-IIIB, tratadas con quimioterapia basada en platino semanal y radioterapia concomitante fue utilizado. El diagnóstico se realizó con la tinción de hematoxilina y eosina, bajo microscopia de luz, de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud. El espécimen fue tomado antes de proceder a cualquier procedimiento terapéutico.

### **Líneas celulares y reactivos:**

Utilizamos 8 líneas celulares de cáncer cervicouterino, que se encuentran enumeradas de la siguiente manera:

1. HeLa
2. CasKy
3. SiHa
4. C33
5. ViBo
6. InBI
7. ViPa
8. CaLo.

Las primeras cuatro líneas celulares fueron obtenidas del ATCC, ViBo fue obtenida de una paciente Mexicana con cáncer de cérvix, donada amablemente por el Dr. Monroy (FES Zaragoza, UNAM, Ciudad de México).

Estas líneas celulares se cultivaron en cajas de 75 mL, con medio de cultivo DMEM (Gibco, BRL Life Technologies, Grand Island, NY) o RPMI (9mL) adicionadas con suero fetal bovino al 5%, crecieron hasta alcanzar una confluencia al 75%. Posteriormente, las células se lavaron con PBS en tres ocasiones y se despegaron con PBS+EDTA 10mM (6 mL) y con 40 $\mu$ L de tripsina al 2.5%. Las células se colocaron en tubos de 50mL y se centrifugaron a 1700 revoluciones por minuto, durante 5 minutos, el botón de células se fijo en xilol.

#### **Inmunohistoquímica:**

Para las tinciones de inmunohistoquímica, se deshidrataron las células al pasarlas por diferentes concentraciones de alcoholes hasta etanol al 100%, se hicieron bloques de parafina y con el micrótopo se realizaron cortes de 4 micras, los cortes obtenidos se colocaron en portaobjetos y guardaron para su posterior uso.

Los siguientes anticuerpos fueron usados para determinar la presencia de PDGFR y sus ligandos:

Para el ligando A, se utilizo el anticuerpo monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-9974), para el ligando B, el anticuerpo policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-7878), para el PDGFR $\alpha$ , el anticuerpo policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-3838), y finalmente para el PDGFR $\beta$  el anticuerpo monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, sc-6252).

Las diluciones de los diferentes anticuerpos fueron de 1:75.

### **Ensayos de proliferación celular:**

Se utilizaron cajas de 96 pozos, donde se resembraron 500 células por cada pozo, se agregó 100 $\mu$ L de medio de cultivo DMEM adicionados con SBF al 10%. Las células se cultivaron, durante 24 horas a 37°C y CO<sub>2</sub> al 4%; alcanzaron una confluencia al 30%. Para arrestar a las células, se dejaron 48 horas con medio de cultivo, sin suero bovino fetal. Posteriormente, por triplicado se agregaron 10ng/ml de PDGF BB, imatinib 10 $\mu$ M y al otro grupo la combinación de ambos compuestos. A los controles se agregó medio de cultivo enriquecido con ITS (sin SBF). El ensayo duro 8 días, se utilizó la técnica de XTT para determinar la viabilidad celular (proliferación), las cajas se leyeron en lector de ELISA usando filtro de 450nm. Aunado a estos ensayos se realizaron cultivos en cajas de 24 pozos, se colocaron 2000 células en 1500  $\mu$ L de medio de cultivo por cada pozo, manteniéndose las mismas condiciones experimentales que en los ensayos de proliferación.

### **Western Blot:**

En cajas de 75 mL, se resembró la línea celular CaLo, hasta alcanzar un confluencia al 75%, se arrestaron las células al dejarlas durante 48hrs con medio de cultivo únicamente, utilizamos la metodología previa, con un grupo control, otro grupo con la presencia del ligando BB 10ng/m, uno más con imatinib 10 $\mu$ M y finalmente con la combinación del ligando BB e Imatinib. En los ensayos donde se utilizó imatinib, éste se colocó 2 horas previas al ligando BB, con la finalidad de inhibir la fosforilación del PDGFR.

**Análisis estadístico:**

**Las variables nominales fueron expresadas en porcentajes.**

**Las variables continuas fueron presentadas por media aritmética y error estándar.**

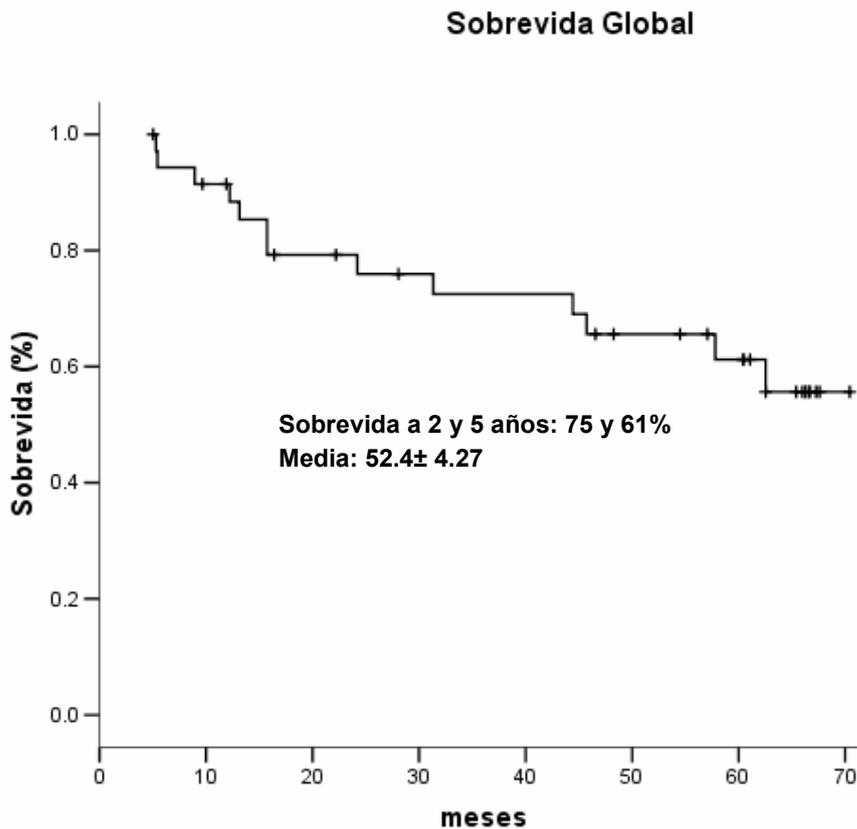
**La comparación de sobrevida fue representada por Kaplan y Meier, y analizadas por log rank.**

**La correlación de las variables nominales con la expresión de PDGF y sus ligados fue realizada por Chi cuadrada ó prueba exacta de Fisher.**

**Se considero significativo un valor de  $p < 0.05$ .**

**Resultados:**

Todas las pacientes tenían carcinoma epidermoide. La etapa clínica de las 36 pacientes al momento del diagnóstico fue IB2, II y III en 3, 16 y 17 pacientes, respectivamente. La edad media de presentación fue de 37 años, con un nivel de hemoglobina media al diagnóstico fue de 11.7g/dL. La supervivencia global a los 2 y 5 años fue de 75 y 61%, respectivamente. Figura 6.



**Figura 6. Curva de sobrevida global en pacientes con cáncer cervicouterino tratadas con quimioterapia y radioterapia concomitante.**

## Expresión de PDGF en cáncer cervicouterino.

En la tabla 3 se resume los resultados del análisis de inmunohistoquímica para PDGFR $\alpha$  /  $\beta$  y sus ligandos en las muestras de tumor examinado.

Las células tumorales fueron positivas para el PDGFR $\alpha$ , PDGF-AA y PDGFR $\beta$  en un 43, 41 y 48%, respectivamente. En el estroma de las muestras analizadas, la expresión de PDGFR $\alpha$ , PDGF-AA y PDGFR $\beta$  fue muy similar a la observada en el tejido tumoral. Ninguna pieza de tejido cervical expresó el ligando-BB, Figura 7.

Tabla 3. Expresión del PDGF y sus ligandos en muestras de tejido cervical, en pacientes con cáncer cervicouterino.

Variable	Expresión por IHQ (%)	Expresión por IHQ(%)
	Tumor	Estroma
PDGFR $\alpha$	~43	~41
PDGF-AA	~41	~48
PDGFR $\beta$	~48	~41
PDGF-BB	0	0

IHQ: Inmunohistoquímica.

Además, observamos que un 37% de las muestras analizadas en pacientes con cáncer cervicouterino co-expresaban tanto al PDGR $\alpha$  y su ligando AA. Este hallazgo es muy importante desde el punto de vista funcional, es la condición indispensable del crecimiento autócrino observado en otras líneas celulares de diversos tumores.

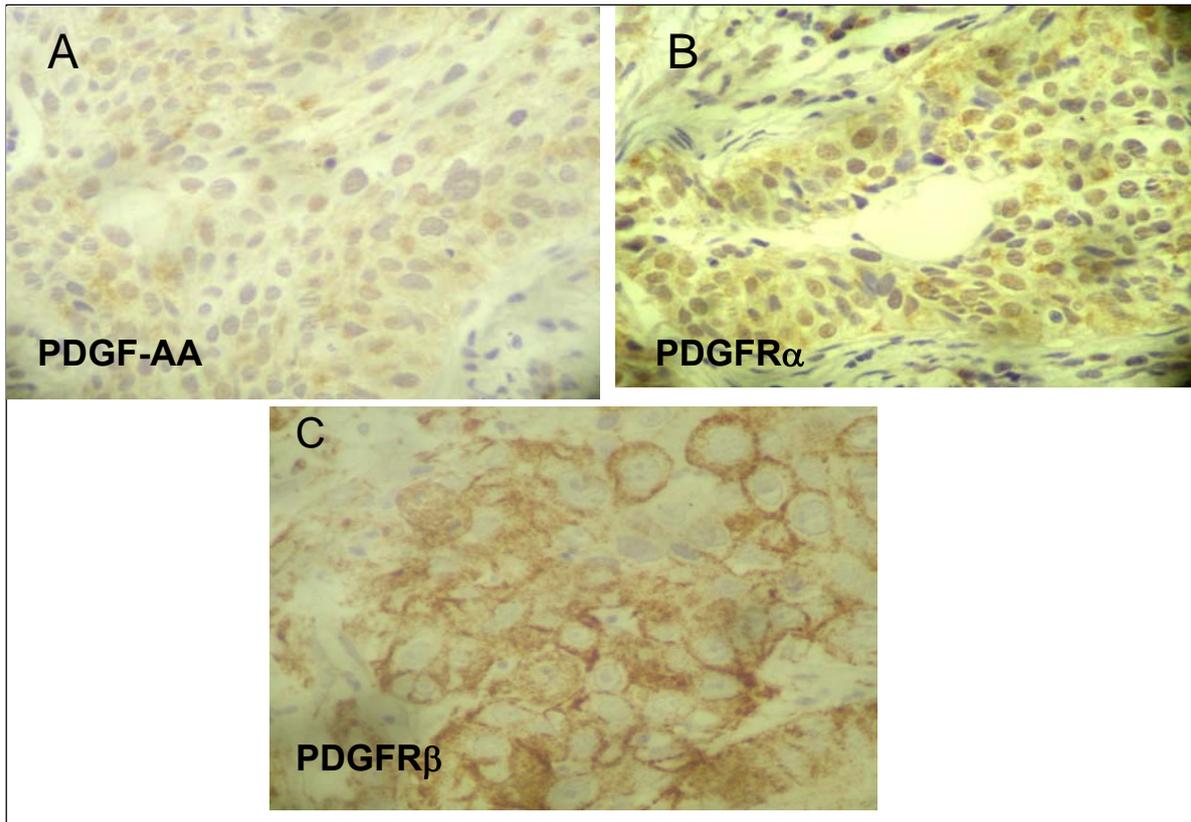


Figura 7. Expresión de PDGFR $\alpha$  y  $\beta$ , PDGF-AA, en tejido cervical de una paciente con cáncer cervicouterino.

**Correlación entre el curso clínico y la expresión de PDGF y sus receptores.**

La expresión de PDGF y sus receptores en los tumores malignos y el estroma adyacente fue comparada con la sobrevida. El seguimiento clínico fue posible en las 36 pacientes. Sin embargo, no encontramos ninguna asociación entre las diferentes variables y la sobrevida, hubo una ligera tendencia en la expresión del ligando AA y sobrevida, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (datos no presentados).

**Expresión de PDGF y sus receptores en líneas celulares de cáncer cervicouterino.**

Como puede observarse en la tabla 4, todas las líneas celulares expresaron el PDGFR $\alpha$ , mientras que Hela, SiHa, CasKy y Calo expresaron el ligando-AA, la expresión del ligando BB estuvo presente en C33A, InBI, ViP, ViBo y Calo, sorprendentemente ninguna línea celular expreso el PDGFR $\beta$ . CaLo fue la única línea celular que expreso tanto al PDGF-BB como la co-expresión del PDGFR $\alpha$  y su ligando-AA, esto puede observarse en la Tabla 4.

**El STI571 inhibe la fosforilación del PDGFR $\alpha$  en CaLo.**

La fosforilación del receptor fue determinada por Western blot con anticuerpos primarios específicos para el epítoto correspondiente a la secuencia corta de aminoácidos que tiene a la Tyr-720 fosforilada.

A la concentración de 10ng/mL del PDGF-BB durante 10 minutos pudo observarse la estimulación del receptor. El imatinib inhibe esta fosforilación a una concentración de 10mM, cuando se agregó 2 horas previas a la estimulación. Figura 8.

Tabla 4. Expresión de PDGF y sus receptores en líneas celulares de cáncer de cérvix.

Línea celular	PDGFR $\alpha$	PDGF AA	PDGFR $\beta$	PDGF BB
C33A	+	-	-	+
InBl	+	-	-	+
ViPa	+	-	-	+
ViBo	+	-	-	+
HeLa	+	+	-	-
SiHa	+	+	-	-
CaLo	+	+	-	+
Casky	+	+	-	-

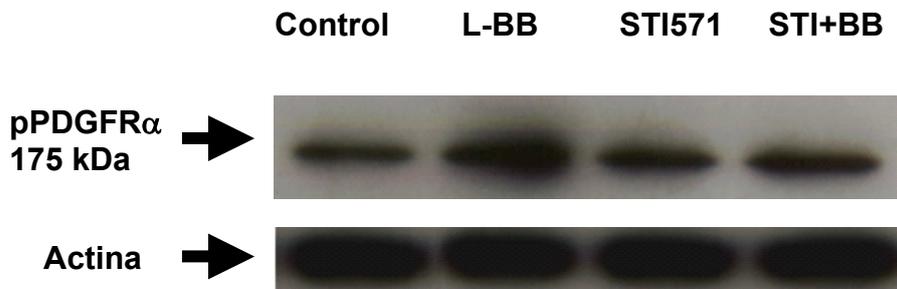


Figura 8. Activación e inhibición del PDGFR $\alpha$  en CaLo, por el ligando BB e imatinib, respectivamente. L-BB: Ligando-BB, STI571:Imatinib.

### Ensayos de proliferación celular.

Cuando utilizamos la técnica de XTT, no se observó disminución del crecimiento celular en CaLo, esto lo podemos observar en la figura 9. Por otro lado, de manera cualitativa, observamos una disminución importante en el crecimiento celular, cuando se utilizó la técnica de azul violeta, figura 10. Existieron cambios morfológicos sugestivos de apoptosis en la línea CaLo, cuando esta línea celular se incubó con STI571, caso contrario ocurrió cuando se incubó con el factor de crecimiento. Estos hallazgos, también los identificamos al observar cambios morfológicos sugestivos de apoptosis en la línea CaLo, cuando se incubó con STI571 y no con el factor de crecimiento, Figura 11.

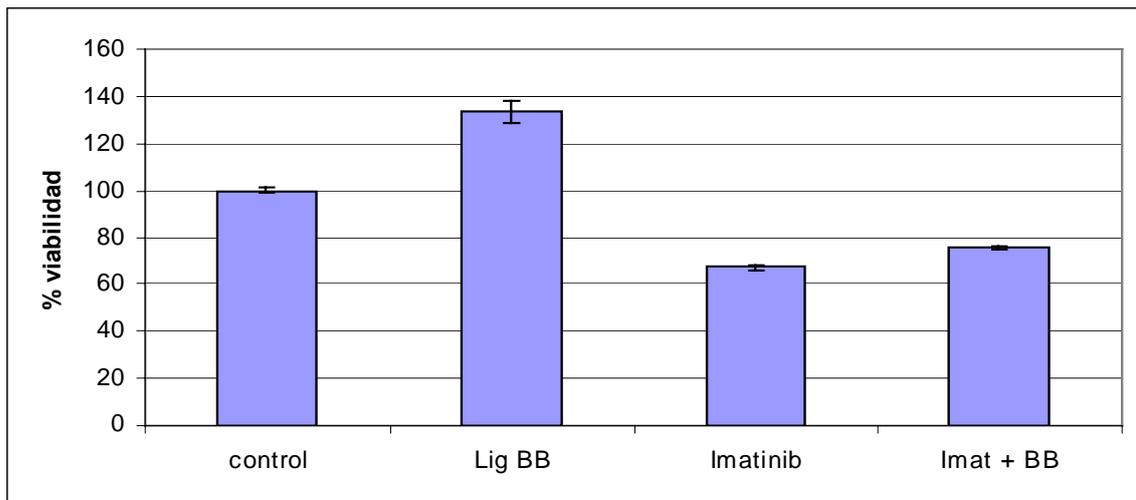


Figura 9. Ensayo de proliferación celular, en CaLo por medio la técnica de XTT.

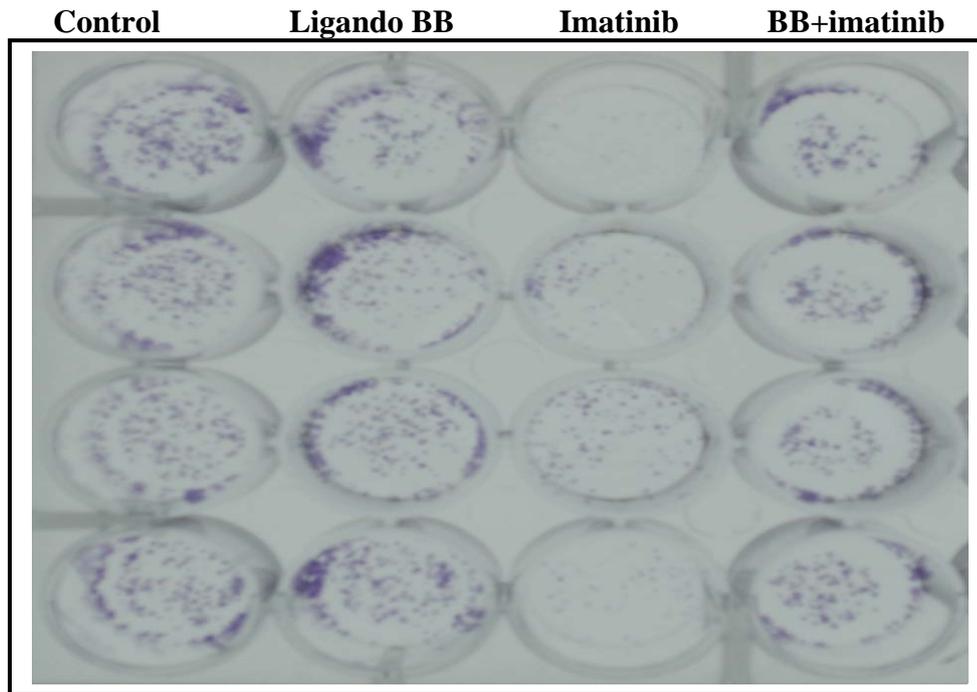


Figura 10. Ensayo de cristal violeta para valorar la proliferación celular en la línea celular calo.

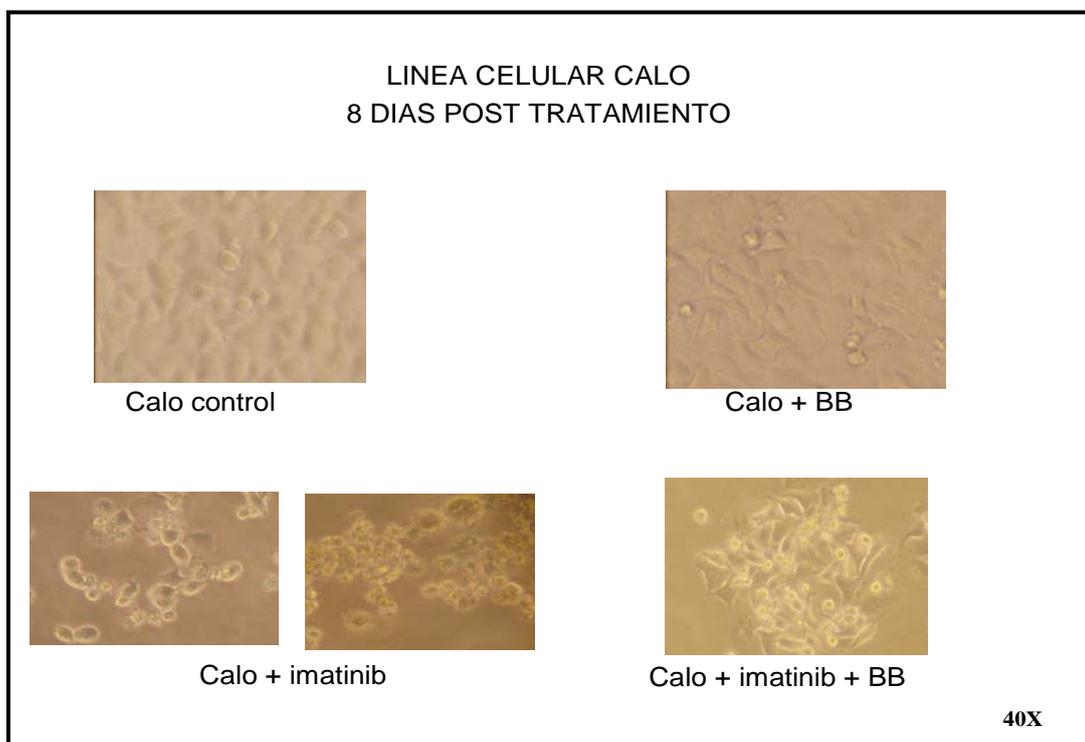


Figura 11. Cambios citopáticos observados en CaLo al ser incubadas 8 días con imatinib.

## Discusión.

La co-expresión de PDGF y sus receptores ha sido descrita en cerca de la mitad de las enfermedades neoplásicas<sup>6,7,8,11,13,14,15,23</sup>, sin embargo el papel de estos factores de crecimiento, no ha sido descrita en cáncer cervicouterino. El PDGF normalmente se encuentra expresado en tejidos mesenquimatosos y ausente de los epitelios. Sin embargo, Mayer<sup>19</sup> y colaboradores, encontraron que durante las fases tempranas de la progresión del cáncer cervical, el PDGF es importante para el desarrollo y mantenimiento de la displasia, lo que sugiere que pueda tratarse de un marcador clínico en la progresión de la carcinogénesis cervical. Para nuestro conocimiento es el primer estudio que demuestra el papel que desempeña la familia del PDGFR y sus ligandos en cáncer cervicouterino. Estudios de cohorte en pacientes con osteosarcoma, próstata, y ovario han encontrado que la expresión del PDGFR es un factor de pronóstico adverso, ya que se asocia con un incremento en la mortalidad, por ejemplo Henriksen<sup>13</sup>, demostró que la expresión del PDGFR $\alpha$  en cáncer epitelial de ovario, es un factor de pronóstico adverso para la supervivencia global. Sin embargo, nosotros no encontramos ninguna asociación entre la expresión de PDGFR y sus ligandos y sobrevida. La amplificación, sobre-expresión y co-expresión de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, ha sido implicada en la progresión de diversas neoplasias, pero su valor pronóstico en cáncer cervicouterino, ha reportado resultados contradictorios, por ejemplo EGFR y HER2 han sido factores independientes de pobre pronóstico en CaCu, pero otros autores no han demostrado esta hipótesis<sup>24</sup>, lo que

habré la pauta a realizar otros estudios para tratar de demostrar si la expresión de PDGFR es un factor de pronóstico adverso. Por otro lado, el porcentaje de expresión del PDGF-AA fue similar al reportado por Henriksen en cáncer epitelial de ovario, además existe una correlación importante entre la co-expresión PDGFR y sus ligandos en el tejido tumoral y estroma lo que sugieren implicaciones de crecimiento autócrino y parácrino. Y a diferencia del estudio mencionado, nosotros encontramos un 41% de expresión por inmunohistoquímica del PDGFR $\beta$  en el estroma tumoral, este es un hallazgo relevante clínicamente, ya que este receptor regula la presión intersticial, que condiciona de manera secundaria modificaciones el aporte de oxígeno a los tejidos. Milosevic<sup>22</sup>, demostró que una presión intersticial  $\geq 19$  mmHg en el tejido tumoral de pacientes con carcinoma cervicouterino es un factor pronóstico independiente para la sobrevida libre de enfermedad y recaída local. Además Pietras<sup>20,21,25</sup> ha documentado que el incremento en la presión intersticial intratumoral y estromal condiciona un pobre aporte de los agentes citotóxicos al microambiente tumoral, el uso de imatinib permite disminuir la PI y así facilitar el mejor aporte de los agentes quimioterapéuticos a las células tumores y obtener un mejor beneficio clínico.

Nosotros demostramos que existe una clara disminución en la proliferación celular *in vitro* en la línea celular CaLo a través de la inhibición de la fosforilación del PDGFR $\alpha$  por medio de imatinib, estos resultados concuerdan con lo encontrados en otras enfermedades, por ejemplo osteosarcoma, páncreas, próstata, donde se trata de investigar

nuevas modalidades de tratamiento, ya que el manejo actual en estas enfermedades es precario. A pesar del manejo multimodal, la supervivencia del cáncer cervicouterino en etapas localmente avanzada y metastásica ha permanecido sin cambios en las últimas décadas, el advenimiento de nuevos medicamentos capaces de inhibir los factores de crecimiento con actividad de tirocina cinasa, pueden modificar el curso de esta enfermedad.

**Conclusión:**

**Para nuestro conocimiento, presentamos el primer reporte en la literatura que describe el estado de expresión del PDGFR y sus ligandos en pacientes y líneas celulares con cáncer cervicouterino, demostramos la inhibición *in vitro* del crecimiento de la línea celular CaLo a través de la inhibición de la fosforilación del PDGFR $\alpha$ , estos resultados sugieren una nueva alternativa de manejo en pacientes con cáncer de cérvix, que deberá ser evaluada en ensayos fase II.**

## **Bibliografía:**

- 1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-157.**
- 2. Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical displasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105: 371-386.**
- 3. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM et al. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 83: 449-455.**
- 4. Rose PG. Combined-Modality of Locally Advanced Cervical Cancer. *J of Clin Onco*, 2003; 21: 211s-217s.**
- 5. Tierney J. Neoadjuvant chemotherapy for locally advanced cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 21 randomised trials. *Eur J of Can*, 2003; 39: 2470-2486.**
- 6. Pietras K, Sjöblom T, Rubin K et al. PDGF receptors as cancer drugs targets. *Cancer Cell* 2003; 3, 439-443.**
- 7. McGary E, Weber K, Mills L et al. Inhibition of Platelet-derived Growth Factor-mediated Proliferation of Osteosarcoma Cells by the Novel Tyrosine Kinase Inhibitor STI571. *Clin Can Res* 2002; 8, 3584-3591.**
- 8. Heldin C-H and Westermark B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Physiological Reviews* 1999; 79, 1283-1316.**

9. Datta S, Dudek H, Tao X, *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231-241.
10. Zha J, Harada H, Yang E, *et al.* Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996; 87: 619-628.
11. George D. Platelet-derived Growth factor Receptors: a Therapeutic Target in Solid Tumors. *Sem Oncol.* 2001; 28 (5, s-17): 27-33.
12. Buchdunger E, O'Really T and Wood J. Pharmacology of Imatinib (STI571). *Eur J of Can* 2002; 38 (s5), 828-836.
13. Henriksen R, Funa K, Wilander E, *et al.* Expression and prognostic significance of platelet-derived growth factor and its receptors in epithelial ovarian neoplasms. *Cancer Res* 1993; 53, 4550-4554.
14. McGary E, Weber K, Mills L, *et al.* Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Can Res* 2002; 8, 3584-3591.
15. Hwang R, Yokoi K, Bucana C, *et al.* Inhibition of platelet-derived growth factor receptor phosphorylation by STI571 (Gleevec) reduces growth and metastasis of human pancreatic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Clin Can Res* 2003; 9, 6534-6544.
16. Heinrich M, Corles C, Demetri G, *et al.* Kinase Mutations and Imatinib Response in patients With Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumor. *J of Clin Oncol* 2003; 21, 4342-4349.

17. Blackledge G. Growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors; clinical development and potential for prostate cancer therapy. *J of Urol.* 2003; 170, S77-S83.
18. Caceres-Cortes J, Alvarado-Moreno J, Waga K, et al. Implications of Tyrosine Kinase Receptor and Steel factor in Cell Density-dependent Growth in Cervical Cancers and Leukemias. *Cancer Res* 2001; 61, 6281-6289.
19. Mayer TJ, Fraumeni E and Meyers C. Expression of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors during cervical carcinogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* . 2000; 36:667-676.
20. Pietras K, Östman A, Sjöquist et al. Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. *Cancer Res* 2001; 61, 2929-2934.
21. Pietras K, Rubin K, Sjöblom T, et al. Inhibition of PDGF receptor signaling in tumor stroma enhances antitumor effect of chemotherapy. *Cancer Res* 2002; 62, 5476-5484.
22. Milosevic M, Fyles , Wong A, et al. Interstitial fluid pressure in cervical carcinoma. *Cancer*; 82, 2418-2426.
23. Furuhashi M, Sjöblom T, Abramsson A, et al. Platelet-derived growth factor production by B16 melanoma cells leads to increased pericyte abundance in tumors and an associated increase in tumor growth rate. *Cancer Res* 2004; 64, 2725-2733.
24. Lee C, Shrieve D, Zempolich K, et al. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4),

phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2005; 99, 415-421.

25. Pietras k. Increasing tumor uptake of anticancer drugs with Imatinib. *Sem Oncol.* 2004; 31 (s6), 18-23.