

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
DR. SALVADOR ZUBIRÁN**

**CARACTERIZACIÓN DE DISTINTAS SUBPOBLACIONES
CELULARES DE UN TUMOR PRIMARIO
DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN

ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

KATHIA SUSANA ZAMUDIO OSUNA

ASESOR:

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

COASESOR:

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ

MÉXICO D.F. AGOSTO 2010



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.

Autorización:

Dr. Eucario León Rodríguez.

Coordinador y Profesor Titular de Oncología Médica

Tutor de Tesis

Dra. Maria de Jesús Ibarra Sánchez

Investigadora en Ciencias Médicas

Cotutora de Tesis

Dr. Luis F. Uscanga Domínguez

Director de Enseñanza

AGRADECIMIENTOS

Agradezco y dedico esta tesis principalmente a mi valiente primo *Marco Antonio*, quien fue un guerrero hasta el final y me motivó a ser ante todo una mejor persona y después, a elegir este camino que considero una de las mejores decisiones de mi vida. Donde quiera que estés recuerda que te extraño y en cada uno de mis pacientes intentaré por ti ser un mejor médico. Te quiero mucho.

Al *Doctor Eucario León*, el cual sin duda, ha llegado a ser mi mejor maestro, mi amigo y será una de las personas a las que más extrañaré. Muchas gracias por creer en mí en todo momento, por sus consejos y por su enorme enseñanza.

A mi esposo Gabriel porque ha caminado conmigo y me ha motivado a continuar con nuestros sueños.

A mis Papás, mis Hermanos, y mis sobrinas *Dafne* y *Paulita* (que en unos días conocerá el mundo) que confían en mí y que ahora espero tenerlos nuevamente cerca,

A *Manfredo*, *Elvis* y *Tito*, por ser los seres más nobles y por ser los autores de múltiples momentos de felicidad.

A la Doctora *María Ibarra* por ser mi amiga y guía en este trabajo, por su confianza y por la constancia que mantuvo para llevarlo a cabo.

Al *Dr José Esparza* por su enseñanza y por aportar la paciencia que le faltaba a la Dra. Mary.

Al *Dr. Alejandro Zentella* por la enorme aportación a mi enseñanza y por abrirme las puertas para poder realizar esta tesis.

A todo el equipo de Oncología por ser cada uno de ellos una parte fundamental de mi formación y al apoyo que tuve de todas las personas que integran la Unidad de Bioquímica durante mi rotación.

Y finalmente al Instituto, que me acogió por todos estos años, y me permitió formar parte de un valioso equipo de trabajo con una visión más humana de la medicina.

ÍNDICE

Introducción.	5
Antecedentes	17
Justificación	18
Objetivos	19
Hipótesis	20
Materiales y Métodos	21
Resultados	27
Discusión	39
Referencias	42

INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama a nivel mundial es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. En Estados Unidos, se encuentra como la segunda causa de mortalidad por cáncer en mujeres de manera global, pero la principal entre las edades de 40 a 59 años. En el 2009 se diagnosticaron 182,460 casos con 40,480 muertes⁽¹⁾ La probabilidad de desarrollar un cáncer de mama de manera global es de 1 en 8 mujeres,⁽²⁾ En nuestro país, esta neoplasia ha superado al cáncer cervicouterino como causa de muerte por cáncer en mujeres, a partir del 2006, y la incidencia actual es de 8 por 100,000 habitantes.⁽³⁾

Subtipos De Cáncer De Mama

Más del 95% de las lesiones malignas de mama surgen de elementos epiteliales mamarios (carcinomas) y estos comprenden un diverso grupo de lesiones las cuales difieren en apariencia microscópica y en su comportamiento biológico aunque se tratan como una sola entidad. El 76% corresponden a carcinomas de tipo ductal.^(4,6)

El cáncer de mama además se divide en los dos grupos principales: Cáncer de mama *in situ* y cáncer de mama invasor en relación a la invasión o no del estroma subyacente y este último puede presentarse como localizado o como enfermedad diseminada. Esta diferencia en estadio a la presentación de la enfermedad (in situ, invasor localizado e invasor metastásico) es el principal factor pronóstico con tasas de supervivencia global a 5 años del 90% en estadio I en comparación con un 18% en el estadio IV.^(5,6)

Además del estadio al diagnóstico, el estado ganglionar a la presentación es otro factor pronóstico importante y existen otros factores que contribuyen a determinar no sólo el riesgo de recurrencia y la probabilidad de supervivencia sino también proporcionan información que nos ayuda a predecir la respuesta del tratamiento, como es el caso de la determinación de los receptores hormonales que predicen

respuesta a fármacos con el tamoxifeno o inhibidores de aromatasas ó el receptor de factor de crecimiento epidérmico HER2, el cual se encuentra sobreexpresado en un 20% de las pacientes y aunque es un factor pronóstico adverso, por otro lado predice respuesta a la terapia con los anticuerpos monoclonales: trastuzumab y lapatinib. Estos factores son determinados en la muestra de tejido y proporcionados en el reporte de histopatología. (5, 7-12)

El perfil molecular, basado en variaciones en la expresión de genes ha sido usada para caracterizar al cáncer de mama más allá del convencional tipo histológico, grado de diferenciación y análisis de inmunohistoquímica de receptores hormonales o de sobreexpresión de HER2. La taxonomía resultante ha definido al cáncer de mama en subtipos intrínsecos para incrementar la capacidad de predecir los resultados clínicos y la respuesta al tratamiento (Fig 1) (13)

Fig 1. Subtipos de cáncer de mama en base al perfil de expresión génica.

Tipo	Frecuencia	Expresión de Receptores	Pronóstico
Luminal A	40%	RH+++ / HER2-	Buen px
Luminal B	20%	RH+ / HER2 +/-	Px variable
Basaloide	15-20%	RH- / HER2-	Pobre px
Tipo HER2	10-15%	RH- / HER2+++	Pobre px

Debido a que el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y compleja, el estudio y comprensión de su comportamiento biológico por medio de la identificación de los mecanismos de iniciación del tumor y de expresión de marcadores pronósticos son actualmente de importancia para los nuevos abordajes terapéuticos.

Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR).

Además de que se sabe que factor de crecimiento epidérmico HER2 tiene un papel importante en la señalización relacionada con la proliferación y supervivencia celular en el cáncer de mama, se han realizado estudios sobre otros receptores y sus vías y sus ligandos relacionados a las proteínas de tirosina cinasa tales como el c-Kit, VEGFR (Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular), EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico), y PDGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas) entre otros. Este último es un miembro de los receptores de la misma familia de tirosinacinas cuyo ligando es el factor de crecimiento derivado de plaquetas. Las dos clases de este receptor son **PDGFR α** y **PGFR β** y a este último se le relaciona con mayor frecuencia en la patogénesis del cáncer de mama.

La unión del ligando induce dimerización del receptor, el cual lleva a activación del dominio de torisinacinas intrínseco por fosforilación y subsecuente reclutamiento de proteínas de señalización que contienen el dominio SH-2. Finalmente, la activación de esta vía lleva a respuesta celular, como proliferación y migración ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

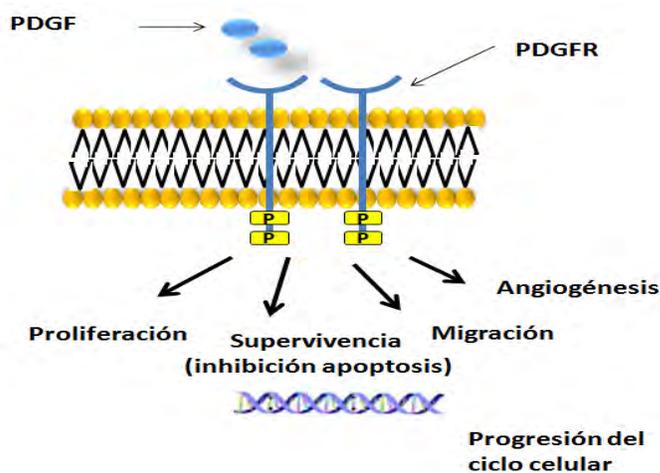


Fig 2. Receptor de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PDGFR y Cáncer De Mama.

En las ultimas dos décadas, se ha mostrado que PDGF y PDGFR están involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer humano a través de estimulación tanto autócrina como parácrina. Tanto el PDGF como el PDGFR están involucrados en el cáncer por mutaciones que pueden llevar a un incremento en los niveles de PDGF ó en actividad de PDGFR pero retienen su estructura y función.

PDGFR β , es expresado tanto por las células del cáncer de mama como las células endoteliales asociadas al tumor en el 69.7% de los casos . También se ha observado expresión en el estroma adyacente sugriendo una estimulación parácrina del tejido estromal. Esta expresión en el cáncer invasor es comparativamente mayor que en el tejido normal o las condiciones premalignas.

Se ha observado que existe relación entre la progresión tumoral y la angiogénesis inducida por la señalización de PDGFR en cáncer de mama, y esto se ha visto también en otros tumores como el cáncer de próstata, donde la expresión de PDGFR se asoció con progresión tumoral y la sobreexpresión se encontró más en las metástasis ^(14, 16)

A pesar de estos hallazgos, la inhibición de señalización de PDGFR ha sido poco estudiada como un potente blanco para el tratamiento del cáncer de mama. Por lo que sería importante investigar más allá del uso de inhibidores específicos que intervengan en el crecimiento tumoral, agresividad y las metástasis.

Imatinib.

El mesilato de Imatinib (Gleevec) es un inhibidor de tirosina cinasa competidor de los sitios de ATP específicos tales como Bcr-Abl, (causante de la leucemia mieloide crónica, (LMC)), C-Kit, y PDGFR. (fig 3). Está aprobada para el tratamiento de la LMC, y tumores del estroma gastrointestinal (GIST). Estudios in vitro han mostrado inhibición de la proliferación celular de manera dosis dependiente en líneas celulares de cáncer de mama y se han llevado a cabo pocos estudios del efecto del imatinib sólo o en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer de mama metastásico con tumores con expresión de PDGFR β poniendo en duda su utilidad ^(16,17) sin embargo, no existen estudios con

combinación con drogas más activas como la doxorubicina o taxanos, salvo resultados preliminares en líneas celulares que muestran un efecto aditivo del imatinib con vinorelbine o doxorubicina (18, 19).

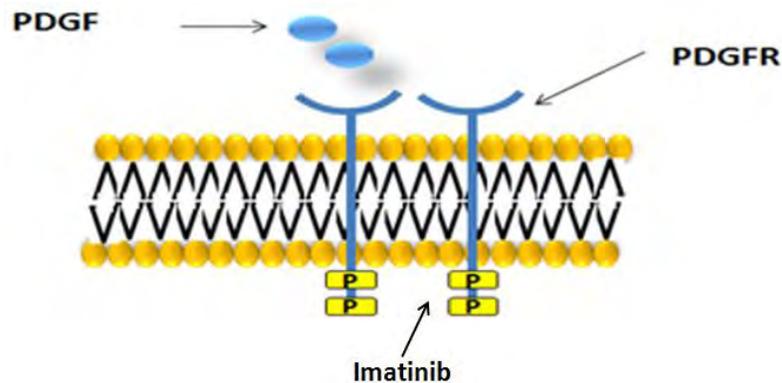


Fig 3. Mecanismo de acción del Mesilato de Imatinib. (Inhibidor de Tirosincinasa, por unión competitiva a los sitios de ATP)

Heterogeneidad Tumoral

A principios de los años 80's se llevaron a cabo diversos estudios que mostraron que existía una llamativa variabilidad entre las células dentro de un mismo tumor, Esta variabilidad ha sido en relación a su tamaño, morfología expresión antigénica, y composición de membrana así como en comportamiento tal como la tasa de proliferación, interacción célula-célula, propensión a metastatizar y sensibilidad a la quimioterapia. Esa heterogeneidad tumoral complica el estudio y el tratamiento del cáncer debido a que las muestras del tumor pueden no ser representativas del conjunto, y porque sus orígenes son poco claros ⁽²⁰⁻²²⁾

Dos actuales ideas que intentan describir el establecimiento y mantenimiento de la heterogeneidad del tumor son las hipótesis de la célula madre del cáncer y el modelo de evolución clonal. ⁽²²⁾

El **modelo de la evolución clonal** de la heterogeneidad tumoral plantea que las células del cáncer sobre el tiempo adquieren varias combinaciones de mutaciones y

cambios epigenéticos dentro de un tumor y que existe selección natural gradual para las más aptas, y que las más agresivas conducen a la progresión tumoral. De acuerdo a esta idea, la iniciación tumoral tiene lugar una vez que múltiples mutaciones han ocurrido en una sola célula aleatoria, proporcionándole una ventaja de crecimiento selectiva sobre las células normales adyacentes. Como la progresión tumoral, la inestabilidad genética y la proliferación descontrolada permiten la producción de células con mutaciones adicionales y por lo tanto nuevas características. Esas células pueden llevar a un gran número de descendientes al azar, o las nuevas mutaciones pueden ofrecer una ventaja en el crecimiento sobre otras células tumorales tales como resistencia a la apoptosis. En cualquier caso, nuevas subpoblaciones de las variantes celulares están naciendo, y otras subpoblaciones pueden morir, resultando en heterogenidad tumoral. Aunque este proceso, el cual ocurre a través del curso de la vida de un tumor, cualquier célula de cáncer puede potencialmente convertirse en tumorigénica, invasora y causar metástasis o convertirse en resistente a las terapia y causar recurrencias.

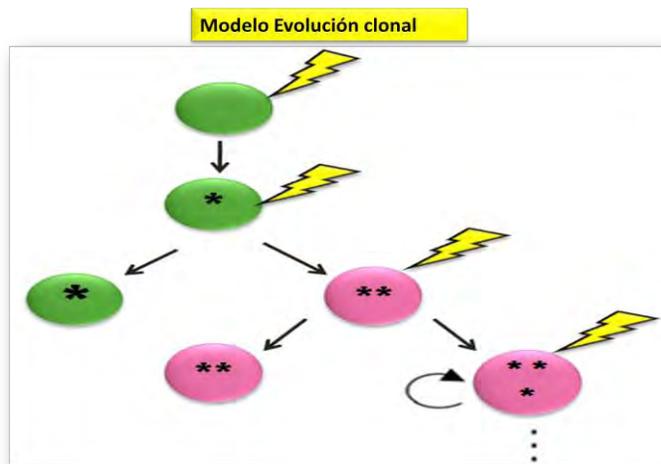


Fig 4. Representación del Modelo de Evolución Clonal. Adquisición de distintas mutaciones y cambios epigenéticos que ocasiona un estado de selección gradual para la proliferación de las más aptas.

La **hipótesis de las células madre del cáncer** establece que solo un particular subgrupo de células tumorales con propiedades parecidas a las células madre llamadas "células madre del cáncer" originan la iniciación, progresión y recurrencia

tumoral. Por definición, esas células tienen capacidad para autorenovarse indefinidamente y de diferenciarse, características de las células madre adultas normales. Su autorenovación y diferenciación lleva a la producción de todos los tipos de células del tumor, de tal modo que genera la heterogeneidad tumoral. Mientras tanto, las otras células en un tumor no tienen la capacidad de autorenovarse y no pueden diferenciarse para producir todos los tipos de células tumorales. Las células madre de cáncer se cree que surgen de las células madre o células progenitoras normales de un órgano y que persisten como una pequeña fracción de las células en un tumor. También, de acuerdo a la hipótesis de las células madre del cáncer, la progresión tumoral es un resultado de la diseminación metastásica de esas células, y la recurrencia del cáncer es causada por su resistencia a la terapia ^(22- 27).

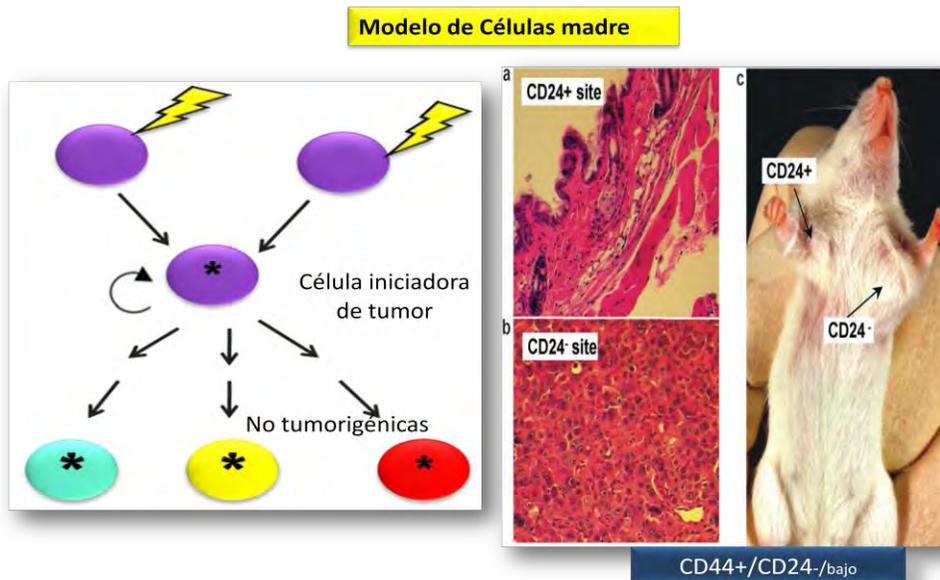


Fig 5. Modelo de Heterogeneidad de Células Madre. Izquierda. La célula iniciadora de tumor (Célula Madre de Tumor) tiene la capacidad de autorenovarse o diferenciarse en células no tumorigénicas. Derecha. Las células de cáncer con expresión de CD44+/CD24-/baja son tumorigénicas a diferencia de células con CD24+.

Esta teoría se reforzó cuando, un marcador asociado con las células madre normales (CD44), fue utilizado para identificar a las células madre del cáncer de mama en 2003. Este fue el primer tumor sólido de aislamiento de células madre del cáncer. Particularmente, se mostró que las células del cáncer de mama tenían un fenotipo CD44+/CD24⁻/bajo, podían eficientemente formar tumores que contienen un arsenal de

tipos de células similares a la encontradas en las muestras de carcinoma originales cuando se inyectan a ratones inmunodeficientes, mientras que las células del cáncer CD44-/CD24+, no pudieron. Reforzando estos hallazgos, otros han mostrado que las células de los cánceres de mama y próstata que expresan CD44 son tumorigénicos y tienen propiedades de células progenitoras ⁽²³⁾.

Aunque tienen distintos fundamentos, las dos teorías sostienen que sólo pocas poblaciones dentro de un tumor serán capaces de proliferar y de sostener el crecimiento tumoral y que son las responsables de las recurrencias o de la progresión en las pacientes con cáncer de mama.

Modelos experimentales en cáncer de mama

Lineas celulares de Cáncer de mama.

Una considerable parte de nuestro conocimiento de los carcinomas de mama está basado en estudios *in vivo* o *in vitro* llevados a cabo con líneas celulares de cáncer de mama (LCCM) comerciales. Estas proporcionan una fuente ilimitada de material homogéneo de autorreplicante, libre de contaminación de células estromales, y son fácilmente cultivadas en un medio estándar simple. La primera línea celular descrita, la BT-20, fue establecida en 1958. Desde entonces, y a pesar del trabajo sostenido en ésta área, el número de permanentes líneas obtenidas ha sido llamativamente bajo (aprox 100), Muchas de las actualmente usadas fueron establecidas a finales de los 1970's, sin embargo, muy pocas, llamadas MCF-7, T-47D, y MDA-MB-231 dan cuenta de más de dos tercios de todos estudios reportados en donde mencionan las LCCM ⁽²⁸⁾

La mayoría de las LCCM provienen de tumores metastásicos, principalmente de derrames pleurales debido a la poca probabilidad de contaminación con fibroblastos u otras células del estroma, ya que los intentos para cultivar células provenientes de tumores primarios han sido la mayoría de las veces un fracaso (tasas de éxito 0.7-10%). La pobre eficiencia para mantener las líneas celulares de tumores primarios con frecuencia se ha explicado por dificultades técnicas asociadas con la extracción de células tumorales viables de su estroma circundante. ⁽²⁸⁻²⁹⁾

A pesar de los beneficios que han aportado a la investigación las líneas celulares comerciales, se ha observado que son propensas a cambiar tanto en el estado hormonal, cariotipo, clonogenicidad, durante los cultivos continuos y se ha cuestionado si realmente son representativas de los tumores primarios originales.⁽²⁸⁻²⁹⁾

Esto es una causa de frecuente preocupación especialmente si tales líneas celulares son vistas como un modelo válido para evaluar la fisiopatología del cáncer de mama y/o la probabilidad de respuesta a las nuevas terapias.

Otra desventaja de las líneas celulares que algunos sostienen, es que probablemente son menos representativas de la heterogeneidad intratumoral de un tumor primario, siendo líneas purificadas, y que además, provienen de tejido metastásico y no de tumores primarios en su mayoría, lo cual hace más probable el no contar con las características del tumor original.

Cultivos primarios de Cáncer de mama.

Una alternativa a las líneas celulares, es la preparación de células derivadas de cultivos primarios de tumores malignos. Esto tiene como ventaja el que no solo son células directamente aisladas del sitio del tumor, sino que también la detallada patología está disponible para permitir las características del cultivo y compararlo con el tumor original. Por lo general, tales cultivos pueden ser establecidos ya sea como explantes, en los cuales las poblaciones celulares mixtas crecen fuera del tejido desde fragmentos pequeños del tejido, o como poblaciones enriquecidas de tipos celulares definidos⁽²⁹⁾

Existen muchos beneficios de usar cultivos primarios enriquecidos. En algunos casos las células solamente se mantienen en cultivo por un finito periodo de tiempo, y ellas tienen poca oportunidad de someterse a transformaciones que son vistas en los cultivos de líneas celulares inmortalizadas. Sin embargo, existe la posibilidad de que las células aisladas del tumor primario de cáncer de mama se comporte de manera diferentemente en cultivos cuando se compara con su respuesta cuando ellos son parte de un tejido/órgano, debido a que las interacciones célula-célula que existen en tejido pueden perderse *in vitro* y frecuentemente las células sólo sobrevivirán dos o

tres pasajes. Además, existe dificultad de investigar cultivos primarios en cáncer de mama debido a que se el tumor es heterogéneo y no es posible llevar a una clara distinción entre el tumor cultivado del epitelio normal en el cultivo.

Por esta dificultad de mantener viables células de un cultivo primario no existe debate de que las líneas celulares comerciales establecidas continúen siendo utilizadas como modelos de investigación de cáncer de mama. Sin embargo, se sabe que de estas, las provenientes de tumores primarios son una valiosa herramienta de investigación.⁽²⁹⁾

Modelos animales de cáncer de mama.

Aunque el cultivo *in vitro* de líneas celulares de cáncer de mama establecidas es probablemente el modelo más ampliamente utilizado para la evaluación clínica y preclínica, tiene limitaciones en cuanto a que no contiene células estromales y, la falta de una estructura tridimensional. Esas limitaciones lo hacen poco representativo de un cáncer real. Los modelos animales en los cuales el estroma y la estructura están presentes son útiles, ya que poseen biomarcadores genéticos y otras anomalías similares a los de los tumores en humanos. La vía más directa para llevar esto es en la fusión de modelos humanos-animales en la forma de tejidos heteroinjertados, implantados ya sea heterotópicamente (subcutáneo) u ortotópicamente (en tejido adiposo mamario).⁽³⁰⁾

Modelos de xenoinjertos

La formación de tumores en ratones inmunodeficientes originados de líneas celulares de cáncer de mama fue primero reportado por Isaacson y Cattanach en 1962. Sin embargo, la complejidad del procedimiento utilizado para originar ratones inmunodeficientes silvestres, una combinación de cirugía (timectomía) radiación y/o fármacos, hizo este abordaje no utilizado ampliamente hasta la introducción de los ratones mutantes desnudos, los cuales actualmente son los modelos de investigación más comúnmente utilizados en experimentos de xenotransplantes. Los ratones desnudos tienen una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 11 que causa

una falla de crecimiento de cabello y otros defectos, incluyendo disgenesia epitelial atímica, lo cual los hace deficientes de células T.

El cáncer de mama es uno de los tumores más difíciles de injertar en animales experimentales, incluyendo ratones desnudos. Las tasas de éxito reportadas van de un 7 a 20% ⁽³⁰⁾ con diferencias consideradas por el sitio de implantación (ortotópico siendo mejor), la edad y la cepa del raton utilizado y si se utiliza suplementación hormonal (ratones desnudos tienen bajos niveles de estrógenos comparados con los humanos). Los xenoinjertos transplantables en serie son muy raros y además las tasas de éxito con células de tumores primarios son aún más difíciles que en las líneas celulares ⁽³¹⁾. Sin embargo, con el hallazgo de los subgrupos de células inmunofenotípicamente distintas (CD44+/CD24-) dentro de los tumores primarios de mama las tasas de éxito esperadas de xenoinjertos son mayores, debido a que son las subpoblaciones únicas capaces de generar tumores, y pueden ser identificadas. Además, actualmente se utilizan la suplementación con estrógenos, y materiales de componentes de matriz de tejido de membrana basal (metrigel) para incrementar la probabilidad de crecimiento tumoral en injertos. ⁽²⁹⁻³¹⁾

Existen actualmente muchos modelos de xenoinjertos disponibles para uso de la investigación en cáncer. La mayoría de ellos son derivados de líneas celulares establecidas y espontáneamente o por ingeniería genética immortalizan las células epiteliales normales de cáncer. Entre las más comúnmente utilizadas están la MCF10AT y la MCF-7, probablemente por su fácil uso y la abundante información disponible de esas líneas de los estudios previos *in vitro*. Sin embargo, el uso de líneas celulares establecidas como fuente de modelos de xenoinjertos lleva a varias cuestiones. Las células han sido adaptadas a crecer en cultivos mucho tiempo y como ya se mencionó, con la probabilidad de cambios en los patrones de expresión y proliferación, además es probable que tengan diferentes requerimientos ambientales que las células de un tumor primario y esto podría impactar en la viabilidad y en su comportamiento en el modelo murino. ⁽³⁰⁻³¹⁾.

En virtud de todo lo anterior, y conociendo que el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y compleja, se realizó el siguiente trabajo, con la finalidad de investigar la

heterogeneidad tumoral utilizando un cultivo primario de cáncer de mama, mediante la caracterización de distintas subpoblaciones celulares de este cultivo, por medio de la identificación de la expresión de receptores hormonales y de factores de crecimiento. Por otra parte se determinó si existen diferencias entre estas subpoblaciones en cuanto a su velocidad de proliferación, sensibilidad a quimioterapia y terapias blanco, y a su capacidad tumorigénica.

ANTECEDENTES DEL TRABAJO

En diciembre de 2004 se hizo el diagnóstico de cáncer de mama en estadio IIIA en una paciente postmenopáusica (65 años). El tamaño inicial del tumor era de 4 x 3 cm de diámetro, con ganglios axilares positivos fijos. El diagnóstico histopatológico fue de un carcinoma ductal infiltrante SBR 3+1+1 bien diferenciado, con Receptores de Estrógeno Positivos en un 90% (+++), Receptores de progesterona Positivos en 90% (+++) y Her2Neu +++ >10%. La paciente fue sometida a neoadyuvancia con quimioterapia a base de Epirubicina, Ciclofosfamida y 5-fluoracilo (Esquema FEC 75) por 4 ciclos, con 4 ciclos más de Paclitaxel trisemanal. Con dicha quimioterapia la paciente presentó respuesta parcial con tumor residual de 1.5 cm y fue sometida a mastectomía debido a multicentricidad y a biopsia de ganglio centinela en julio de 2005. Recibió radioterapia adyuvante y posteriormente tamoxifeno, el cual toma hasta la actualidad. No se pudo dar adyuvancia con trastuzumab por motivos económicos.

Generación de Cultivo Primario:

En la Unidad de bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición (INCMN) se realizó un cultivo primario por explantes de una muestra de dicho tumor. (Aprobación del comité de ética con la REF 159). Brevemente, el tejido fue cortado en trozos pequeños y sembrado como explantes y sembrado en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las células se dejaron crecer hasta la saturación del plato de cultivo. Estas células fueron tripzinizadas y mantenidas como cualquier línea celular. La inmortalización se asumió después de mantenerlas en crecimiento continuo in vitro por más de dos meses. Posteriormente se llevó a cabo la segregación celular a partir del método de dilución limitante, el cual se llevó a cabo mediante diluciones continuas de tal forma que la concentración de células por volumen de suspensión llegara a 1 sola célula por volumen. Este volumen se colocó en placas de 96 pozos (1 célula por pozo) dejándola proliferar para posteriormente aislar la población desarrolladas.

JUSTIFICACIÓN

La investigación convencional en cáncer de mama se lleva a cabo por lo general a través de líneas celulares comerciales establecidas, que crecen en medios de cultivo adaptados, y provienen en la mayoría de los casos, de tumores metastásicos. Existe la cuestión de si éstas células realmente representan a las células de los tumores primarios de las cuales se originaron debido a los cambios que se ha observado que pueden presentarse durante la progresión o recurrencia tumoral y a la diversidad de las células dentro de un mismo tumor.

Aunque estas líneas se han ido caracterizando con respecto a la expresión tanto de receptores hormonales como de los receptores de los factores de crecimiento que participan en la patogénesis neoplásica, y se ha ido identificado su comportamiento *in vivo* en modelos murinos, podría ser de utilidad estudiar de la misma manera, células originadas de un tumor primario, subrayando sus diferencias en cuanto a los patrones de expresión de dichos receptores, en su proliferación, sensibilidad a la terapia antineoplásica y en su capacidad tumorigénica *in vivo*, con la finalidad de establecer subpoblaciones celulares útiles como herramientas de estudio, con respecto al comportamiento del cáncer de mama, e iniciar protocolos con nuevas terapias en modelos murinos.

OBJETIVO PRIMARIO

- 1) Caracterización de distintas poblaciones de células de un cultivo primario de cáncer de mama.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1) Cuantificar la expresión de Receptores hormonales (RE y RP) y de factores de crecimiento (PDGFR y Her2)
- 2) Determinar la velocidad de crecimiento de las células con distintos fenotipos identificados
- 3) Evaluar la susceptibilidad de las diferentes clonas a antraciclenos y a terapia anti- PDGFR y anti-HER2 (con Imatinib y Lapatinib respectivamente).
- 4) Evaluar la tumorigenicidad de las clonas del cultivo primario, por inoculación en ratones desnudos.

HIPÓTESIS

En diferentes subpoblaciones de células de un tumor primario de cáncer de mama existe diferencia en la expresión de receptores hormonales y de factores de receptores de crecimiento y en su comportamiento y sensibilidad a quimioterapia y terapias blanco tanto *in vitro* como en modelos murinos.

HIPÓTESIS NULA.

En diferentes subpoblaciones de células de un tumor primario de cáncer de mama no existen diferencias en la expresión de receptores hormonales o de factores de receptores de crecimiento ni en su comportamiento y sensibilidad a quimioterapia y terapias blanco tanto *in vitro* como en modelos murinos

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de las subpoblaciones del tumor.

Reactivos

1. Anticuerpos primarios:

- a. Anti-Receptor de Estrógenos (Cell Marque) de conejo
- b. Anti-Receptor de Progesterona (Cell Marque) de ratón
- c. Anti-HER2 (Millipore) de ratón
- d. Anti-Tubulinas (Santa Cruz Biotechnology) de ratón
- e. Anti-PDGFR (Santa Cruz Biotechnology) de conejo.

2. Anticuerpos secundarios

- a. Thermo scientific cabra anti-conejo.

3. Fármacos

- a. Doxorrubicina (Sigma-Aldrich),
- b. Imatinib (Novartis)
- c. Lapatinib (GSK)

Cultivo de Líneas celulares.

Cultivo de Células de Cáncer de Glándula Mamaria. Las línea celular MCF-7, el cultivo primario MBCDF y sus subpoblaciones fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI-1640 libre de rojo fenol (MicroLabs S.A. México) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, antibióticos y antimicóticos. El cultivo celular MBCDF fue generado a partir de explantes derivados de una biopsia obtenida a partir de una mastectomía radical (Protocolo aprobado por el Comité de Ética del

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” Ref:159). Brevemente, el tejido fue cortado en trozos pequeños y sembrados como explantes y sembrados en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de bovino. Las células se dejaron crecer hasta que llenaron el plato de cultivo. Estas células fueron tripsinizadas y mantenidas como cualquier línea celular. La inmortalización se asumió después de mantenerse en crecimiento continuo *in vitro* por más de dos meses.

Ensayo de Western Blot.

Las células fueron sembradas en cajas de petri en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 10% de suero fetal de bovino. Se dejó que la células tuvieran una confluencia del 100% y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y se dejaban 24 horas en medio de RPMI-1640 libre de rojo fenol con 10% de suero fetal bovino.

Posteriormente se lisaron en buffer de lisis que contiene 50 mM HEPES (ph 7.4), 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1% de Nonidato P-40, 10 mM NaF, 1 mM Vanadato de Sodio y 1X mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, EDTA-free, Roche). Treinta microgramos de proteína fueron sometidos a una electroforesis en un gel de policramida desnaturalizante y se transfirió a una membrana Immobilon-P PVDF (Millipore Corp Bedford, MA). La membrana se bloqueo 1h con leche 5% en PBS-Tween. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios anti- PDGFR, RE, RP y HER2 toda la noche a 4 °C. Se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente por 45 min. La señal fue visualizada por quimioluminiscencia y se expuso a una película radiográfica (Kodak).

Ensayos de Proliferación celular

Se realizaron ensayos de proliferación celular con la finalidad de identificar la velocidad de crecimiento de cada fenotipo de clona aislada.

Para cada subpoblación celular elegida, se sembraron un número basal de células por pozo de 1,500/cm² en 5 pozos y por triplicado, en 3 experimentos distintos, en una placa de 48 pozos y se obtuvieron evaluaciones en los días 0,1, 3, 5, 7, fijando las células a estos tiempos con glutaraldehído al 1.1% en PBS por 20 minutos, y posteriormente se tiñeron con la técnica de cristal violeta y lavadas con agua para eliminar el exceso del colorante. Se les colocó ácido acético al 10% para disolver el colorante y posterior a 15 minutos se determinó la absorbancia con la lectura de un espectrofotómetro de ELISA. Posteriormente se realizaron las curvas de viabilidad celular.

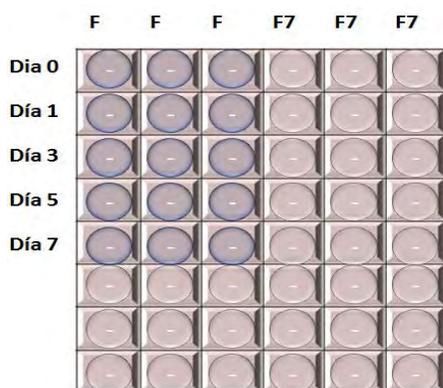


Fig. 6. Ensayo de Proliferación celular

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Se realizaron estudios de citotoxicidad con los el antineoplásico Doxorrubicina, y los anticuerpos monoclonales anti PDGFR y antiHer2 Imatinib y Lapatinib respectivamente. También se realizó un ensayo de citotoxicidad con la combinación de Imatinib con doxorrubicina para evaluar el sinergismo de ambos como ha sido sugerido en estudios previos.

Citotoxicidad con Doxorrubicina

Se sembraron un número de 7,500 cel/cm² (por pozo) de cada una de las clonas, realizándose por 7 pozos por triplicado. 24 horas después se les agregó doxorrubicina a diferentes concentraciones: (0, 0.001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, y 10 micromolar) y se dejó actuar el fármaco por 24 horas a 37 grados.

Posteriormente se detuvo el experimento fijando las células con glutaraldehído al 1.1% en PBS y posteriormente se realizó la tinción con cristal violeta, el lavado con ácido acético y la lectura en el espectrofotómetro como previamente se describió. Se realizaron curvas de citotoxicidad.

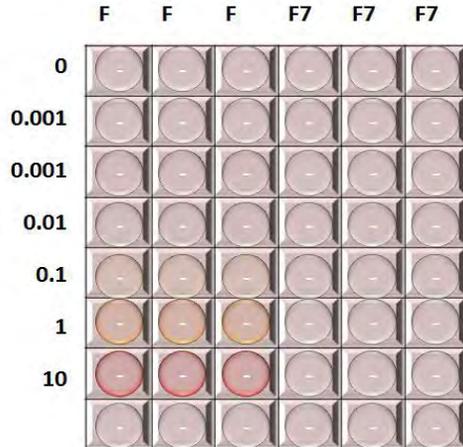


Fig. 7. Ensayo de Citotoxicidad con Doxorrubicina

Citotoxicidad con Lapatinib

Con la misma metodología y con un número sembrado de células de 7,500/cm² se realizaron 3 experimentos de citotoxicidad por lapatinib por triplicado a concentraciones de 0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 5 micromolar. Y se dejó actuar el fármaco por 48 horas. Posteriormente se fijaron las células, se tiñeron con cristal violeta y se midieron con lector de ELISA conforme al protocolo ya descrito.

Citotoxicidad con Imatinib

Se realizó ensayo de citotoxicidad por triplicado con imatinib a concentraciones de 0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10 y 50 micromolar y se dejó actuar el fármaco por 48 horas para posteriormente continuar con el protocolo previo y realizando las curvas de citotoxicidad.

Citotoxicidad combinación Imatinib-Doxorrubicina

Se realizó ensayo de citotoxicidad con la combinación de Imatinib a concentraciones de 0, 0.1, 1, y 10 micromolar dejando actuar el fármaco por 1 hora, y posteriormente a la mitad de los pozos se les agregó doxorrubicina con la concentración de 0.1 micromolar, que se determinó como la dosis IC50 previamente.

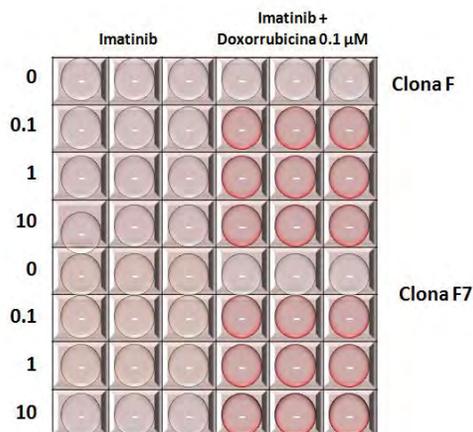


Fig. 8. Ensayo de Citotoxicidad con Imatinib (lado izquierdo) y con la combinación Imatinib-Doxorrubicina (derecha).

Capacidad Tumorigénica de las clonas celulares

Para evaluar la capacidad tumorigénica de los 4 fenotipos de clonas elegidas, se inocularon 1,000,000 de células de 8 de las 9 clonas por duplicado. Estos se inocularon en ratones hembras y en machos en sitio subcutáneo, y con la siguiente metodología:



Ratones	Clona	Fenotipo
Raton Hembra	F	PDGFR +++ /Her2 +++
Raton Hembra	F	PDGFR+++/Her2 +++
Raton Macho	F7	PDGFR +++ /Her2 +++
Raton Macho	F7	PDGFR+++/Her2 +++
Ratón Hembra	D4	PDGFR +++ /Her2 -
Raton Hembra	D4	PDGFR +++ /Her2 -
Raton Macho	C9	PDGFR+++/Her2 -
Raton Macho	C9	PDGFR +++ /Her2 -
Raton Hembra	F5	PDGFR -/Her2 +++
Raton Hembra	F5	PDGFR -/Her2 +++
Raton Macho	F3	PDGFR +/Her2 +++
Raton Macho	F3	PDGFR +/Her2 +++
Ratón Hembra	D5	PDGFR -/Her2 +
Raton Hembra	D5	PDGFR -/Her2 +
Raton Macho	B3	PDGFR -/Her2 +
Raton Macho	B3	PDGFR -/Her2 +

Fig. 9 Subpoblaciones celulares inoculadas en los ratones y tipo de fenotipo.

Valoración del crecimiento tumoral

Se realizaron revisiones clínicas de los ratones 3 veces por semana en búsqueda de aparición de tumor, y se hizo el registro del tamaño de los mismos, con medición por medio de un vernier. Se sacrificó al ratón una vez que el tamaño alcanzaba el tamaño aproximado de 1 cm en su diámetro mayor.

Análisis estadístico Se realizó mediante una ANOVA y prueba post-hoc en el apartado de citotoxicidad con Imatinib para ver diferencias entre grupos. Se consideró significativo con una $p < 0.005$.

RESULTADOS

El nombre del tipo de célula parental es MBCDF (F), la cual dio origen al resto de las subpoblaciones celulares durante el proceso de dilución limitada.

Durante el proceso de clonación, se identificó un comportamiento distinto en el tipo D5, la cual no era una subpoblación pura y originó nuevas subpoblaciones distintas.

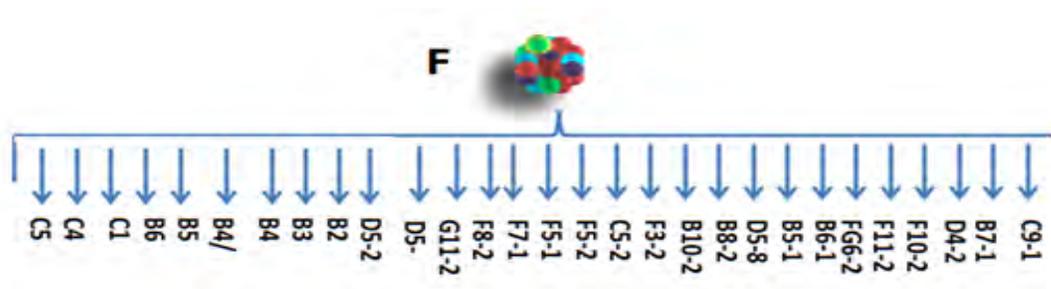


Fig 10. Célula parental (F) y 28 subpoblaciones provenientes de ella segregadas por el método de dilución limitante.

Western Blot.

La distribución de los ensayos de Western Blot mostró la negatividad de la expresión para receptores hormonales (Receptor de Estrógenos y Progesterona) en todas las subpoblaciones estudiadas. Estas presentaron alta expresión de receptor de PDGF en un 38% y en 51% del receptor de Her2 independientemente del resto de los receptores. En un 24% existió alta expresión tanto para PDGFR como para HER2, un 27% fue altamente positiva para Her2 pero negativa para PDGFR, sólo un 7% fue altamente positiva para PDGFR pero negativa para HER2, y un 21% fue PDGFR negativa con expresión mínima de HER2, y otro 21% tuvo moderada expresión ya fuera para PDGFR ó para HER2

Resultados de la expresión de Receptores Hormonales por Western Blot

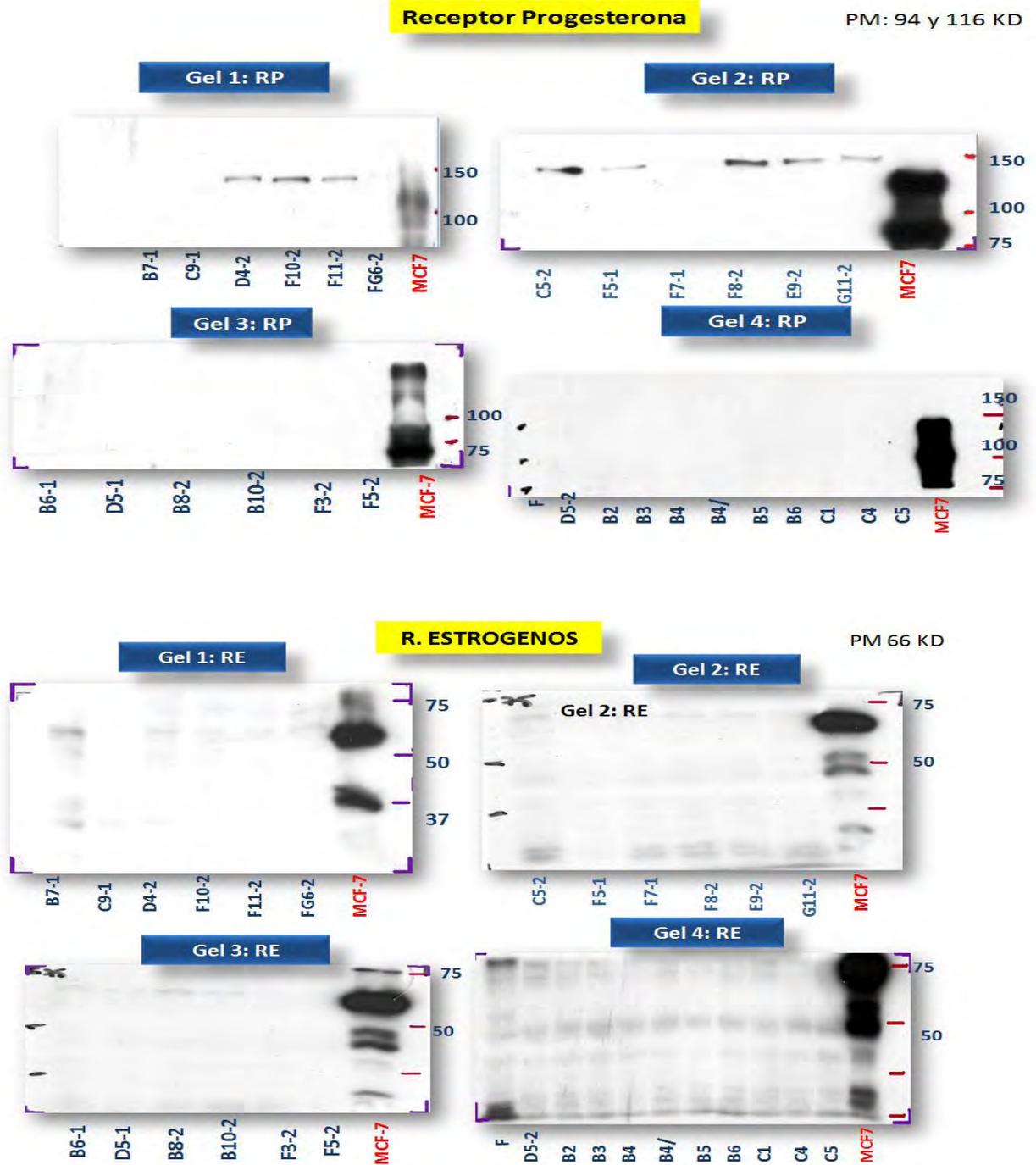


Fig 11. Expresión de Receptores Hormonales por Western Blot de las 29 subpoblaciones. Todas fueron negativas para dichos receptores.

Resultado de Expresión de Receptores de Factores de Crecimiento por Western Blot

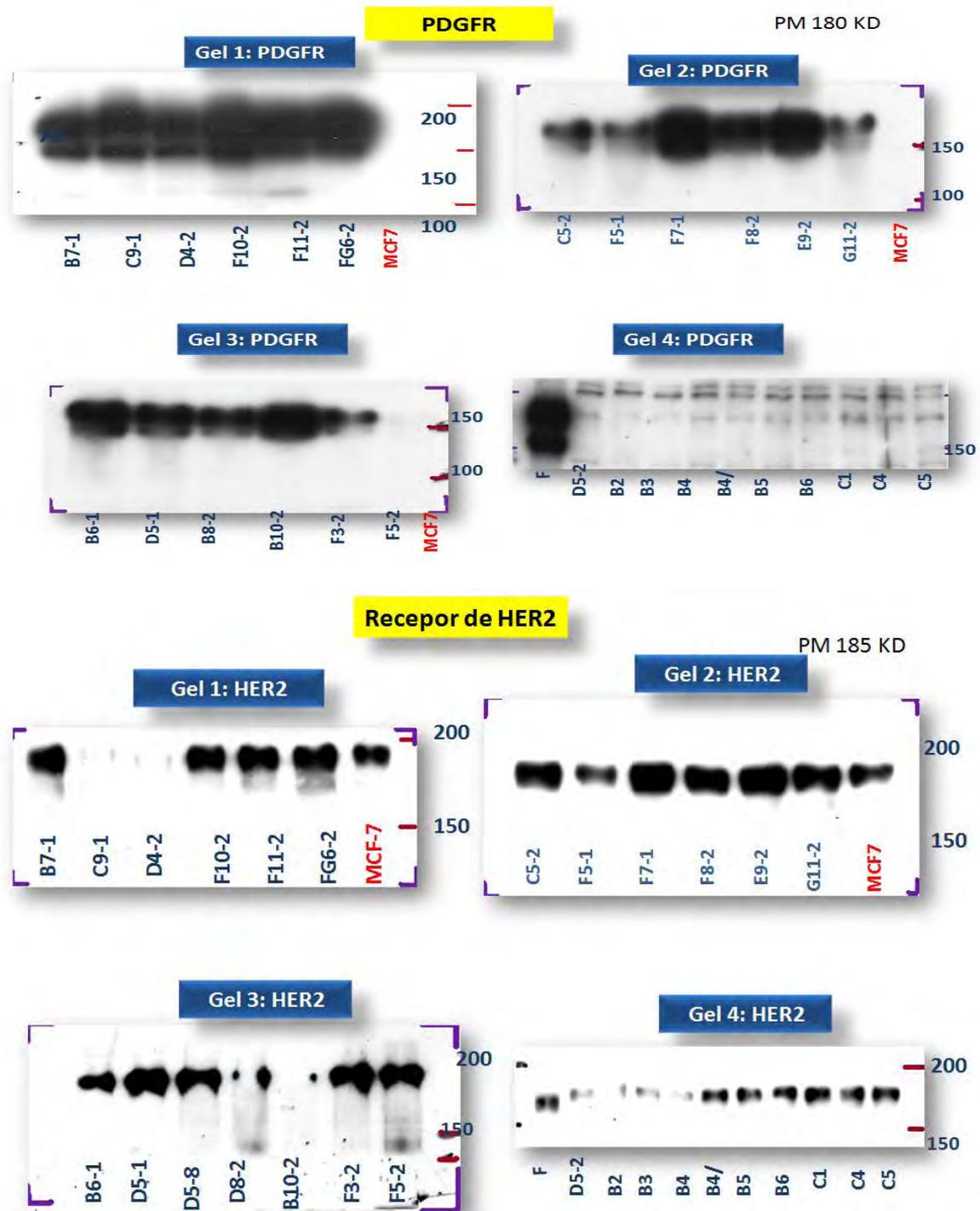


Fig 12. Expresión de Receptores de Factores de Crecimiento (PDGFR y HER2) por Western Blot de las 29 subpoblaciones. Existió variabilidad entre las subpoblaciones..

FENOTIPOS IDENTIFICADOS DE ACUERDO A LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES (HER2 Y PDGFR)

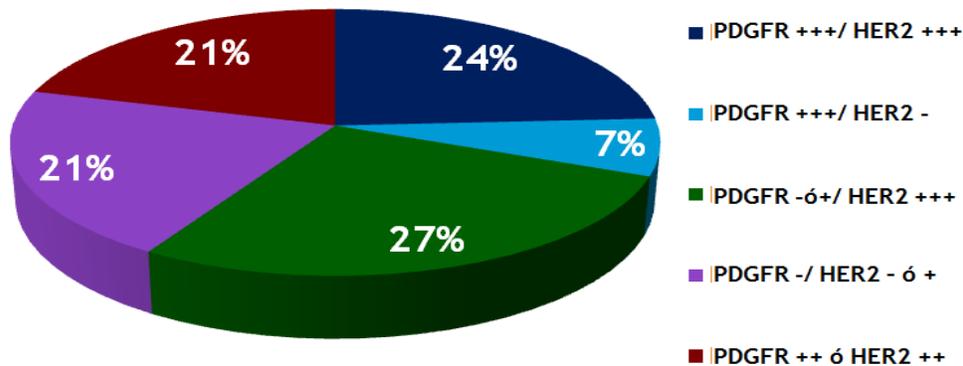


Fig 13. Total de subpoblaciones con relación a la expresión nula, baja, moderada o alta de receptores de factores de crecimiento.

Selección de subpoblaciones por fenotipo

Se seleccionaron 4 diferentes fenotipos de las subpoblaciones en base a la expresión de los receptores de factores de crecimiento. El número de subpoblaciones fueron 2 para el fenotipo con alta expresión tanto de PDGFR como de HER2 (poblaciones F y F7); 2 para el de alta expresión de PDGFR pero con HER2 negativa (poblaciones C9 y D4), 2 para el fenotipo de PDGFR negativas o con muy baja expresión pero con alta expresión de HER2 (F3-2 y F5-2), y 3 para ambos fenotipos negativos o con muy baja expresión de ambos (D5-, B2, y B3).

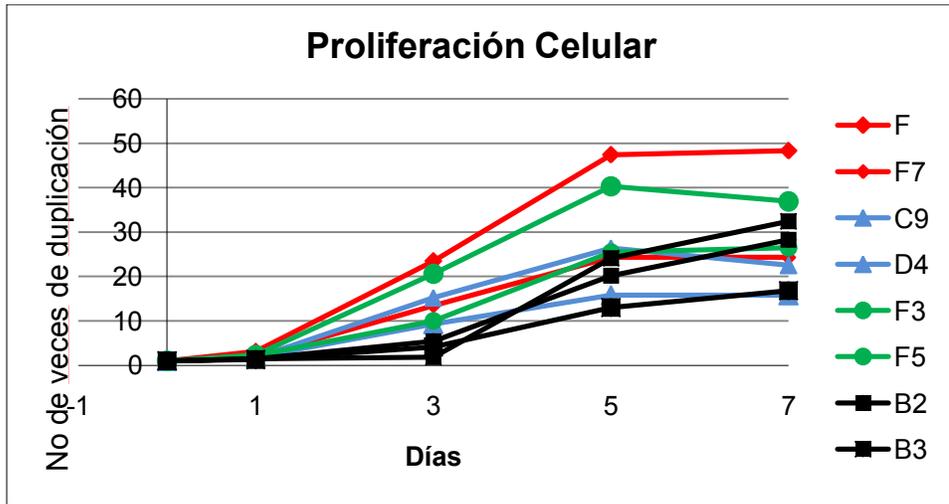
Selección de Subpoblaciones con 4 distintos fenotipos:

- PDGFR +++ / Her2Neu +++ (F, F7,)
- PDGFR / Her2Neu + ó - (B2, B3, D5-)
- PDGFR +++ / Her2Neu - (C9, D4)
- PDGFR - + / Her2Neu +++ (F3-2, F5-2)

Para simplificar los nombres de las subpoblaciones, de aquí en adelante se denominaran como se indica. C9-1 C9, D4-2: D4, F5-2; F5, F7-1 : F7, F3-2: F3, B2: B2, B3: B3, F+:F D5- D5

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

Al realizar los ensayos de proliferación de las subpoblaciones de células se observó que son heterogéneas en su potencial de crecimiento *in vitro*. Existió una diferencia entre la clona parental con alta expresión de ambos receptores (F: PDGFR y HER2 +++), y las que tenían baja o nula expresión de ambos receptores (B2,B3,D5). La mayoría de las subpoblaciones comenzaron a proliferar desde el primer día después de sembradas alcanzando su confluencia alrededor del 5º día, y por lo tanto dejaron de proliferar. El fenotipo de las células con baja o nula expresión de ambos receptores inició su proliferación más tardía y continuó proliferando al día 7. (Fig14)



- PDGFR +++/HER2 +++
- PDGFR- ó + /HER2 +++
- PDGFR +++/HER2 -
- PDGFR- /HER2 +

Ejemplo. Subpoblación F5

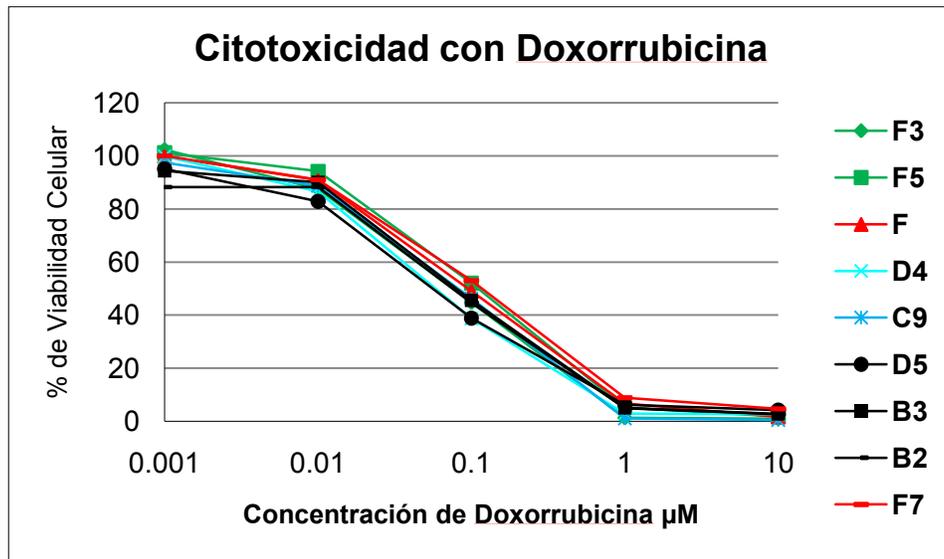


Fig. 14 Curvas de proliferación celular

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Citotoxicidad con Doxorrubicina

La sensibilidad a la doxorrubicina, a distintas concentraciones, fue la misma para todos los subgrupos de células y la IC50 (Concentración Inhibitoria Máxima media) observada fue de 0.1 microMolar (μM). (Fig 15)



- PDGFR +++/HER2 +++
- PDGFR- ó + /HER2 +++
- PDGFR +++/HER2 -
- PDGFR- /HER2 +

Fig 15. Curvas de citotoxicidad con Doxorrubicina

Citotoxicidad con Lapatinib

La sensibilidad a la lapatinib fue similar en las distintas subpoblaciones estudiadas, y no hubo diferencias aún en aquellas con HER2 positivas. El IC50 se encontró en 0.5 μM . (Fig 16)

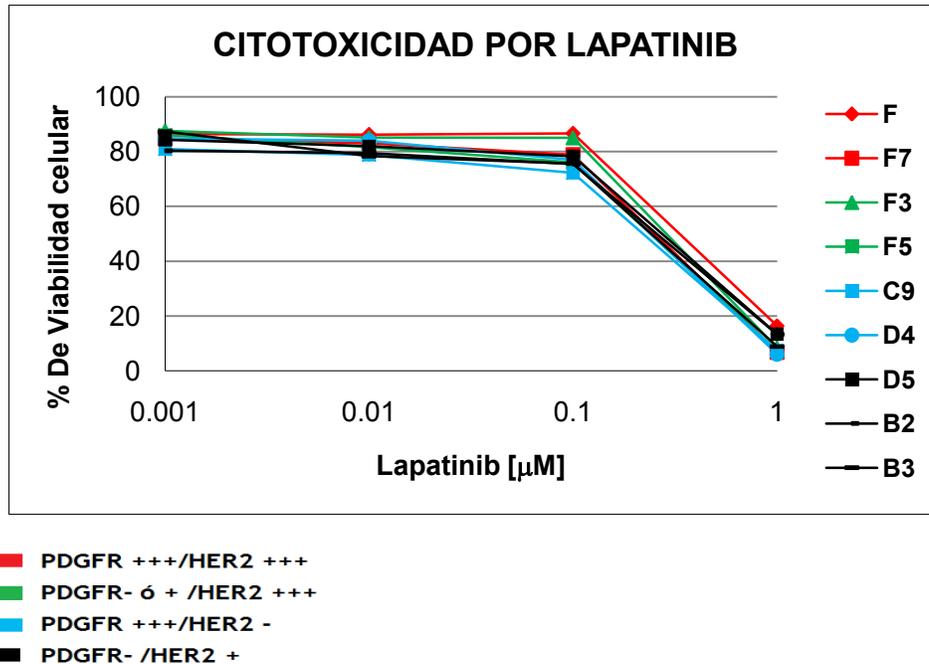


Fig 16. Curva de citotoxicidad con lapatinib

Citotoxicidad con Imatinib.

Cuando se realizaron las curvas de sensibilidad a Imatinib de las distintas subpoblaciones que se estudiaron se observó que las células que expresaban cualquier grado de expresión de PDGFR requerían menos concentración de imatinib para alcanzar su concentración inhibitoria máxima media (IC50), a diferencia de las subpoblaciones negativas para este receptor (B2, B3, D5 y F5), las cuales presentaron pobre respuesta al imatinib. (fig 17)

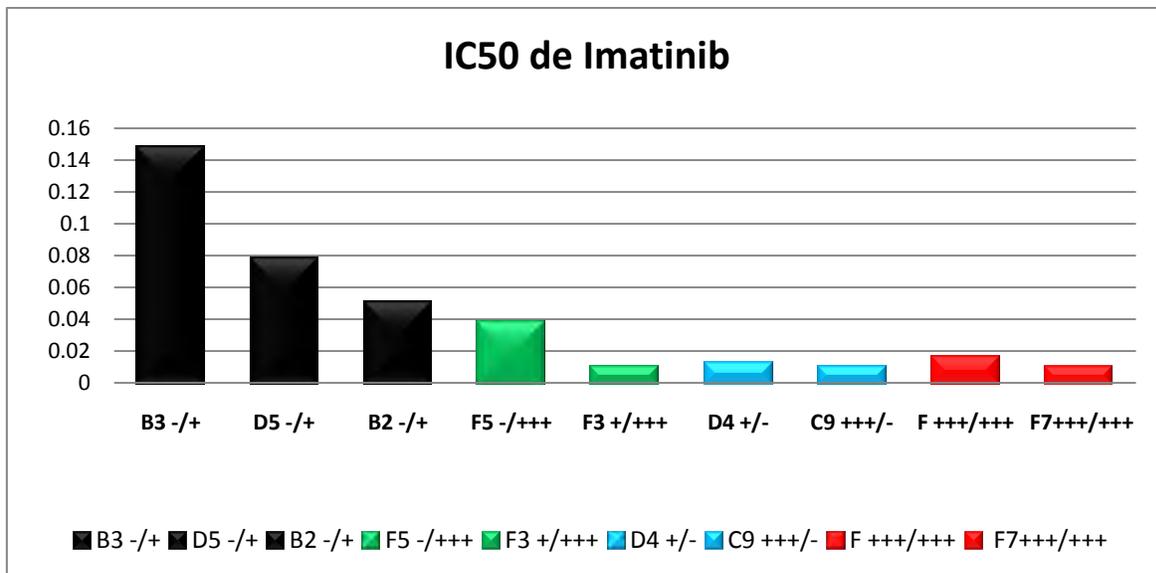


Fig. 17 Citotoxicidad a Imatinib

Citotoxicidad combinación Imatinib-Doxorrubicina.

Al evaluar distintas concentraciones de imatinib (0.1, 1 y 10 μ M) a la dosis de doxorrubicina a 0.1 μ M, (la IC50 observada previamente) pudimos constatar que existía un efecto aditivo creciente en la inhibición celular al añadir el imatinib en todas las subpoblaciones, lo cual fue estadísticamente significativo, a excepción en el fenotipo con nula expresión de ambos receptores (subpoblaciones B2, B3, y D5), en donde sólo existió una inhibición añadiendo imatinib a doxorrubicina en la concentración más alta (10 micromolar). (fig 18, 19, 20, 21).

Fig 18. Fenotipo PDGFR +++/ HER2 +++

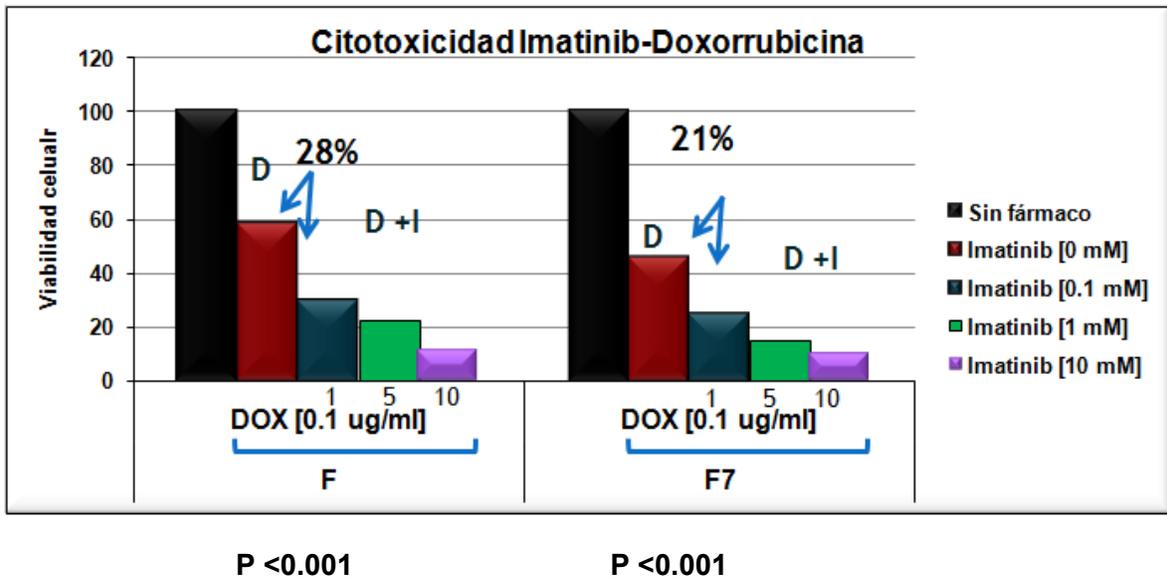


Fig 19. Fenotipo PDGFR +++/ HER2 -

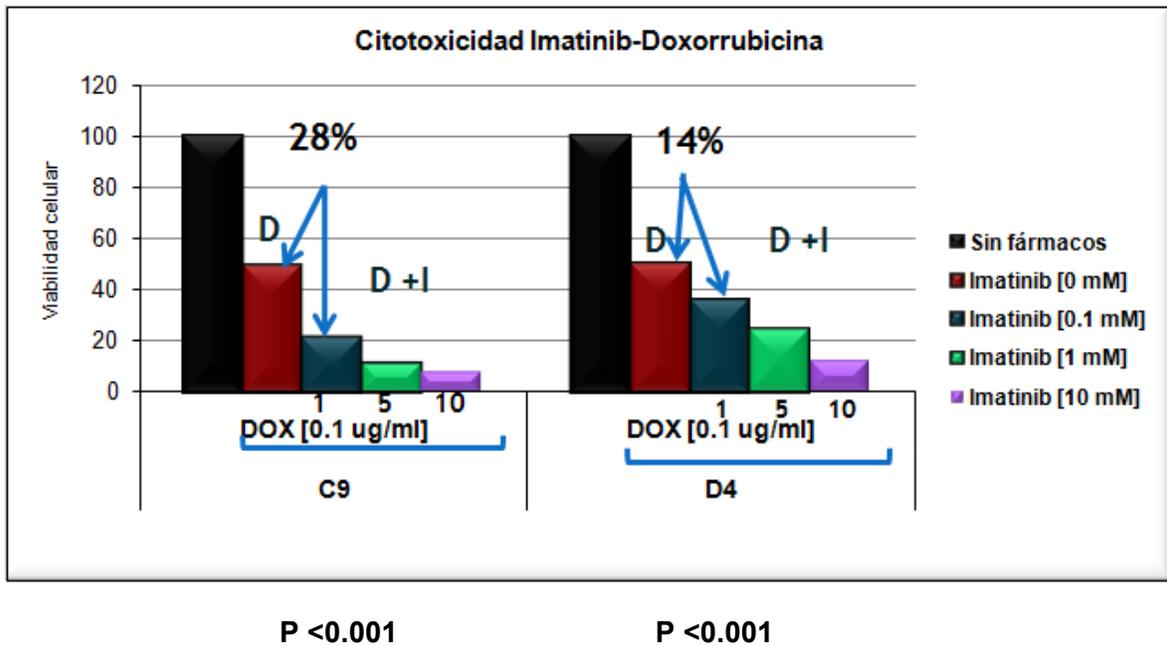


Fig 20 Fenotipo PDGFR – ó +/- HER2 +++

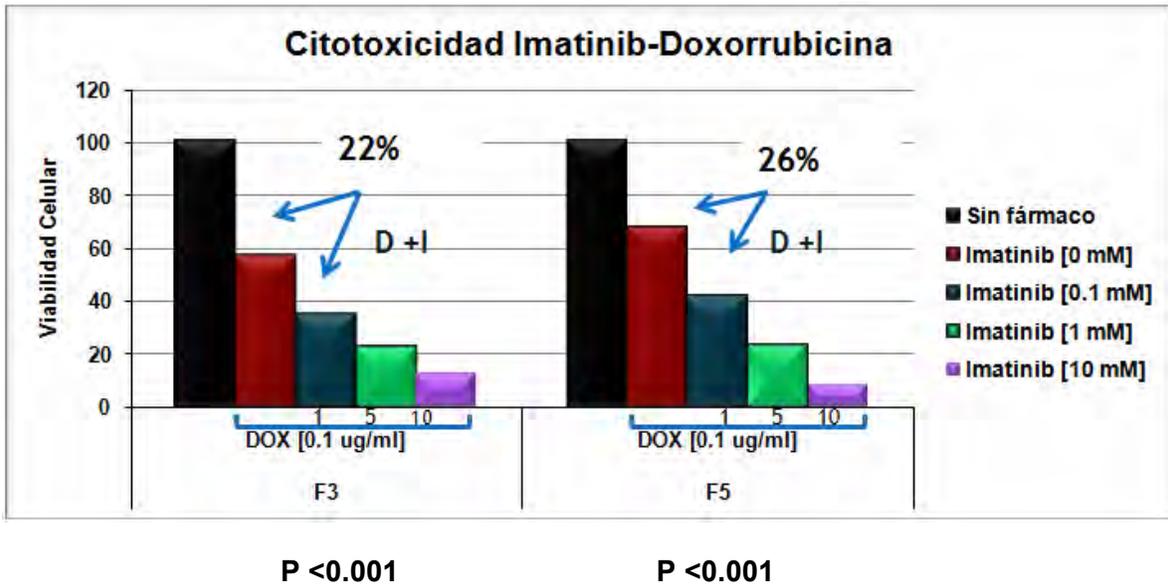
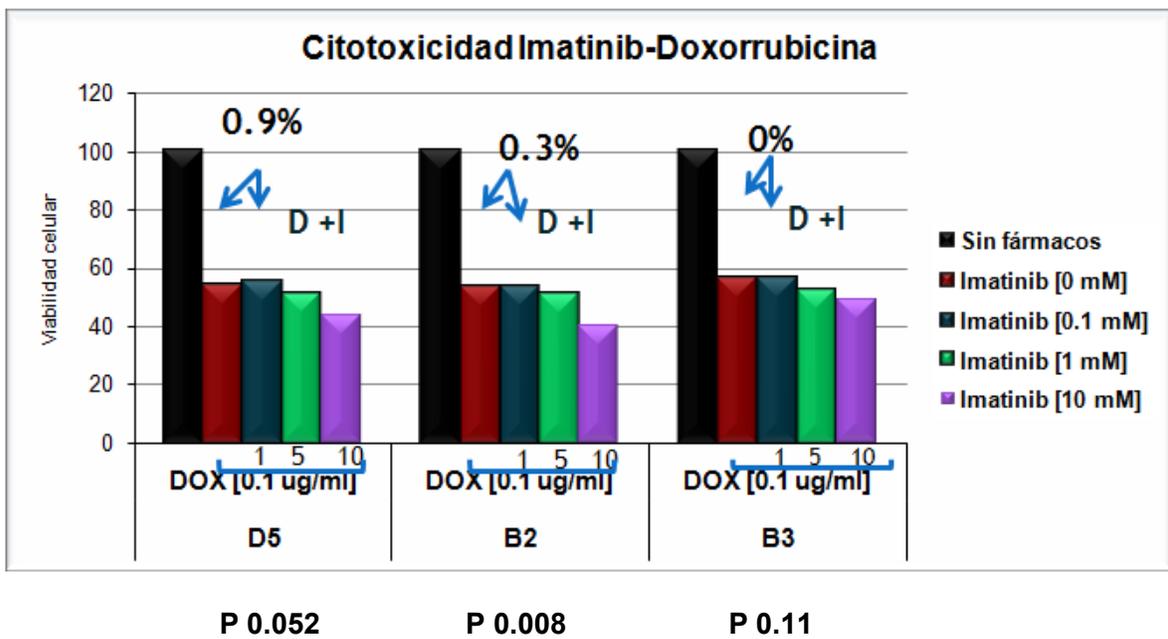


Fig 21 Fenotipo PDGFR-/HER2 +



CAPACIDAD TUMORIGÉNICA DE LAS SUBPOBLACIONES

Cuando se evaluó la capacidad tumorigénica de las subpoblaciones en los ratones desnudos pudimos observar que todas las subpoblaciones tuvieron la capacidad de producir tumor, y el inicio de aparición del mismo fue más rápido en las que expresaban el fenotipo con alta expresión de ambos receptores. En contraste, las de baja o nula expresión de ambos receptores tuvieron un tiempo de aparición y para la medición de 1 cm mas tardío. Pudimos observar que la presencia de PDGFR por si sola fue importante para el inicio y desarrollo tumoral, ya que el 100% de los ratones con subpoblaciones celulares que expresaban el receptor (8 ratones) desarrollo tumor a diferencia de un 62% de los de baja o nula expresión de este mismo receptor (5 ratones) (fig 22 y 23)

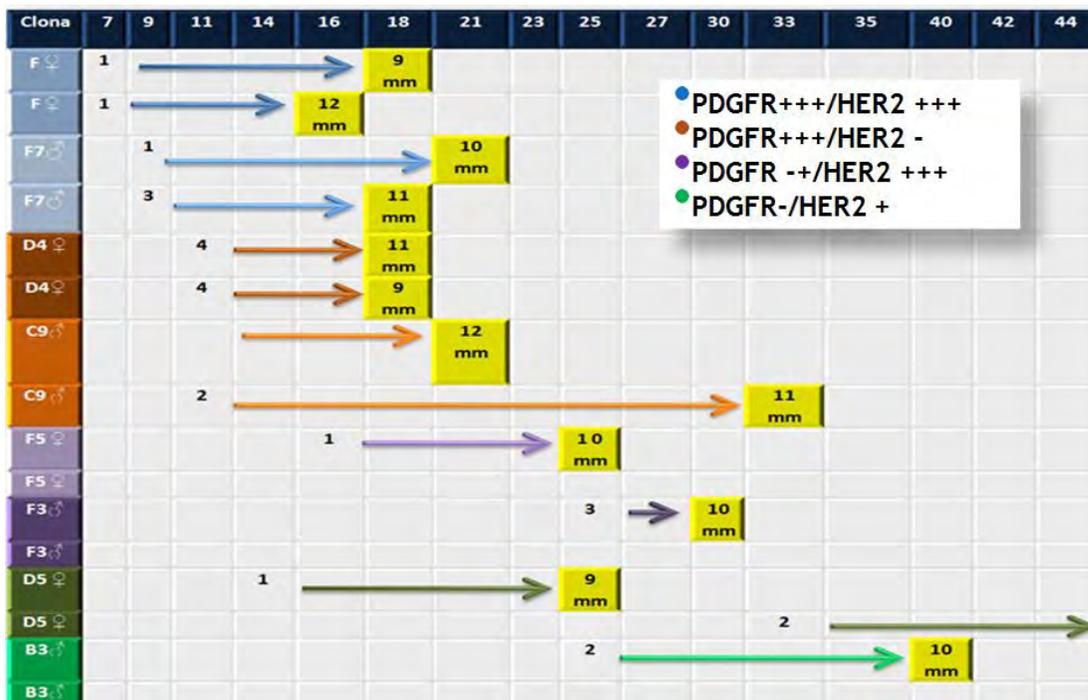


Fig 22 . Evaluación del crecimiento tumoral en los ratones. (Los números al inicio de las flechas representan los milímetros al momento de la detección del tumor y los números superiores los días posteriores a la inoculación de las células).



Población F
(PDGFR⁺⁺⁺/HER2⁺⁺⁺)



Población C9
(PDGFR⁺⁺⁺/HER2⁻)



Población F7
(PDGFR⁺⁺⁺/HER2⁺⁺⁺)



Población D4
(PDGFR⁺⁺⁺/HER2⁻)



Población F5
(PDGFR⁻/HER2⁺⁺⁺)



Población F3
(PDGFR⁺/HER2⁺⁺⁺)



Población D5
(PDGFR⁻/HER2⁺)



Población B3
(PDGFR⁻/HER2⁺)

Fig 23. Establecimiento de tumores en ratones

DISCUSIÓN

Como pudimos observar las células del tumor primario explantado, se comportaron de manera heterogénea en todos los aspectos estudiados.

Se demostró que existió una amplia variabilidad de expresión de los receptores de factores de crecimiento, tanto de HER2 como de PDGFR. Esto nos permitió reconocer 4 fenotipos diferentes de las subpoblaciones encontradas, las que a su vez demostraron diferentes patrones de crecimiento, sensibilidad a citotóxicos y capacidad tumorigénica,

A diferencia del tumor primario, todas las subpoblaciones fueron negativas para receptores hormonales, y esto ha sido explicado por la falta de factores hormonales *in vitro* necesarios para su expresión. Esto también explica el hecho de que pocas líneas celulares de cáncer de mama expresen estos receptores. Aun está pendiente el análisis histopatológico de los tumores en nuestros ratones, aunque se sabe que los ratones desnudos tienen bajas concentraciones de estrógenos que en ocasiones no permiten un adecuado desarrollo tumoral, lo que ha llevado a utilizar inoculación de estrógenos para la adecuación del medio en algunos reportes ⁽²⁰⁾. Hay que señalar que la paciente de donde se originaron las células del cultivo primario recibió quimioterapia neoadyuvante lo que se ha observado que también puede seleccionar tipos celulares aptos para crecer en medios más hostiles perdiendo las características iniciales y dando lugar a subpoblaciones más agresivas, lo que se observa durante la progresión o la recurrencia. Esta variabilidad de las características del tumor original en la progresión o recurrencia no sólo se observa en los receptores hormonales, sino también en la expresión de HER2, con discordancia para los primeros de un 20% aproximadamente, y de un 2 al 15% para HER2. ^(28,29, 33,34).

En otro aspecto pudimos observar el papel importante que juega no sólo HER2 en el comportamiento de las subpoblaciones celulares sino también el de PDGFR, ya que las poblaciones con fenotipo negativo o baja expresión de ambos tuvieron una tasa proliferativa menor. Esta diferencia no solo se observó *in vitro*, sino también en el desarrollo tumoral en los modelos murinos ya que como pudimos ver, aunque todos los fenotipos tuvieron capacidad tumorigénica, el tumor desarrollo en el 100% de los

ratones con expresión alta de PDGFR vs en el 62% en los ratones con nula o baja expresión de este receptor. La expresión de PDGFR además, se relacionó con la respuesta al inhibidor de tirosina cinasa (ITK) Imatinib, ya que observamos que la concentración necesaria para llegar a la inhibición media de las subpoblaciones con la presencia de este receptor fue mucho menor que en las subpoblaciones con fenotipo de baja o nula expresión.

Con la combinación de imatinib y doxorrubicina se observó algo similar, ya que hubo un efecto sinérgico inhibitorio cuando se expresaba alguno de los dos receptores, mientras que no existió este efecto cuando ambos receptores fueron negativos o con una baja expresión. El que exista un efecto sinérgico a pesar de la negatividad del PDGFR, probablemente se deba a inhibición de otras vías de señalización río abajo de HER2 ó por inhibición de otros receptores como c-kit. La ausencia de este mayor efecto inhibitorio en ausencia de ambos receptores, permitiría eventualmente identificar subgrupos de pacientes que no responderían a esta combinación.

Existen trabajos publicados sobre el efecto de imatinib en cáncer de mama no observándose respuesta cuando se administra a mujeres con enfermedad metastásica ⁽¹⁶⁾ Tampoco, la combinación de imatinib con capecitabina ha mostrado beneficio en cuanto a tasa de respuesta en este mismo tipo de pacientes ⁽¹⁷⁾. Sin embargo, el efecto sinérgico de la combinación de imatinib con doxorrubicina ha sido recientemente demostrado en ensayos *in vitro* con líneas celulares de cáncer de mama ⁽¹⁸⁾, observando un efecto similar al encontrado por este trabajo en células de un cultivo primario de cáncer de mama. Se espera estudiar en breve el efecto de estos resultados *in vivo* con modelos murinos.

Por otro lado, en cuanto a la capacidad tumorigénica de todas las subpoblaciones estudiadas observamos que todos los fenotipos fueron tumorigénicos, esto contrasta con las tasas de éxito reportadas menores al 20% sin factores o medios añadidos ⁽³⁰⁾. De acuerdo con la teoría de la heterogeneidad tumoral de células madre, podríamos decir que en todas nuestras subpoblaciones seleccionadas existe un subgrupo de células iniciadoras de tumor y esperaríamos encontrar en ellas patrones de expresión de marcadores de células madre como CD44+/CD24-+ ó CD44+/CD44+/ESA+ ó

ADH+ como se ha reportado en trabajos previos ^(23,35), la cual es una perspectiva en este trabajo. Sería interesante además, observar la correlación de dicha expresión de marcadores con el fenotipo de los tumores inducidos en los ratones

Por otro lado, la teoría de la evolución clonal podría explicar que diferentes células del tumor inicial se adaptaron a vivir en el medio de cultivo y posteriormente originaron subpoblaciones seleccionadas por condiciones del medio, cambios genéticos y epigenéticos, todas con capacidad tumorigénica aunque no son representativas del tumor original.

Aun así, podemos decir que las células de los cultivos primarios del cáncer pueden tener mayor utilidad en la investigación que las líneas comerciales por el sitio de origen (tumor primario vs metastásico), por el tiempo de preservación y por la disponibilidad de observar el comportamiento tanto en su tumor original como in vitro o en modelos murinos. Además, es necesario estudiar más este tipo de células con respecto a los nuevos marcadores moleculares que nos proporcionen evidencias más cercanas a la carcinogénesis, al comportamiento de la señalización y a la respuesta a nuevas terapias blanco.

REFERENCIAS

1. CA Cancer J Clin. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49. Epub 2009 May 27
2. SEER.cancer.gov/csr/1975_2000/results_merged/topic_lifetime_risk.pdf..
3. Knaul, Felicia Marie Cáncer de mama en México:una prioridad apremiante *Salud Publica Mex* 2009; 51 suppl 2:S335-S344
4. Li CI; Uribe DJ; Daling JR Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005 Oct 31;93(9):1046-52.
5. Woodward, WA, Strom, EA, Tucker, SL, et al. Changes in the 2003 American Joint Committee on Cancer Staging for breast cancer dramatically affect stage-specific survival. *J Clin Oncol* 2003; 21:3244
6. Li CI; Uribe DJ; Daling JR Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005 Oct 31;93(9):1046-52.
7. Hayes DF; Trock B; Harris AL Assessing the clinical impact of prognostic factors: when is "statistically significant" clinically useful? *Breast Cancer Res Treat* 1998;52(1-3):305-19.
8. D'Eredita' G; Giardina C; Martellotta M; Natale T; Ferrarese F Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution *Eur J Cancer*. 2001 Mar;37(5):591-6.
9. Cluze C; Colonna M; Remontet L; Poncet F; Sellier E; Seigneurin A; Delafosse P; Bossard N Analysis of the effect of age on the prognosis of breast cancer *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Sep;117(1):121-9.
10. Mansell J; Monypenny IJ; Skene AI; Abram P; Carpenter R; Gattuso JM; Wilson CR; Angerson WJ; Doughty JC. Patterns and predictors of early recurrence in postmenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Sep;117(1):91-8.
11. Goldhirsch A; Ingle JN; Gelber RD; Coates AS; Thurlimann B; Senn HJ Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009 Aug;20(8):1319-29. Epub 2009 Jun 17.
12. Roussidis AE, Theocharis AD, Tzanakakis GN, Karamanos NK. The importance of c-Kit and PDGF receptors as potential targets for molecular therapy in breast cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, 14, 735-743 . Review
13. Voduc KD; Cheang MC; Tyldesley S; Gelmon K; Nielsen TO; Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1684-91.
14. Raica M, Cimpean A Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy *Pharmaceuticals* 2010, 3, 572-599 Review
15. Yu I, Ustach C, Platelet-derived Growth Factor Signaling and Human Cancer *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 36, No. 1, January 2003, pp. 49-59

16. Cristofanilli M, Morandi P, Krishnamurthy S, Reuben JM, Lee BN, Francis D, Booser DJ, Green MC, Arun BK, Puzstai L, Lopez A, Islam R, Valero V, Hortobagyi GN. Imatinib mesylate (Gleevec) in advanced breast cancer-expressing C-Kit or PDGFR-beta: clinical activity and biological correlations. *Ann Oncol*. 2008 Oct;19(10):1713-9. Epub 2008 May 29.
17. Chew HK, Barlow WE, Albain K, Lew D, Gown A, Hayes DF, Gralow J, Hortobagyi GN, Livingston R. A phase II study of imatinib mesylate and capecitabine in metastatic breast cancer: Southwest Oncology Group Study 0338. *Clin Breast Cancer*. 2008 Dec;8(6):511-5.ff
18. Weigel MT, Meinhold-Heerlein I, Bauerschlag DO, Schem C, Bauer M, Jonat W, Maass N, Mundhenke C Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR beta signaling *Cancer Lett*. 2009 Jan 8;273(1):70-9. Epub 2008 Sep 21.
19. L. Dahmke, M. T. Weigel, M. Bauer, C. Schem, I. Alkatout, W. Jonat, C. Mundhenke; Obstetrics/Gynecology, University of Kiel, Kiel, Germany Effect of a combination of tyrosine kinase inhibitor imatinib with doxorubicin shows in breast cancer cell lines Meeting: 2010 ASCO Annual Meeting *J Clin Oncol* 28, 2010 (suppl; abstr e13657)
20. Heppner G. Tumor Heterogeneity *Cancer Research* 44, 2259-2265, June 1984]
21. Leith JT, Bliven SF, Lee ES, Glicksman AS, Dexter DL. Intrinsic and extrinsic heterogeneity in the responses of parent and clonal human colon carcinoma xenografts to photon irradiation *Cancer Res*. 1984 Sep;44(9):3757-62.
22. Campbell L, Polyak K, Breast Tumor Heterogeneity ,Cancer Stem Cells or Clonal Evolution? *Cell Cycle* 6:19, 2332-2338, 1 October 2007
23. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8.
24. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347:1593-603.
25. Boyle P. Breast cancer control: Signs of progress, but more work required. *Breast* 2005 : 14:429-38.
26. Fillmore C, Kuperwasser C Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Research* 2007, 9:303
27. Thornton AA, Madlensky L, Flatt SW, Kaplan RM, Pierce JP. The impact of a second breast cancer diagnosis on health related quality of life. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92:25-33.
28. Lacroix M, Leclercq G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Feb;83(3):249-89. Review.
29. Burdall S, Hanby A, Lansdown M, Speirs V Breast cancer cell lines: friend or foe? *Breast Cancer Res* 2003
30. Kim J, O'Hare M, Stein R. Models of breast cancer: is merging human and animals models the future? *Breast Cancer Res* 2004, 6;22-30
31. Langdony S. *Cancer Cell Culture Methods in Molecular Medicine™* 1940-6037 vol 88 2004

32. Sierra A. Animal models of breast cancer for the study of pathogenesis and therapeutic insights *Clin Transl Oncol* (2009) 11:721-726
33. Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, Rouas G. Comparison of HER2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites *Annals of Oncology* 13: 1036-1043, 2002
34. Guarneri V, Giovannelli S, Ficarra G, Bettell S, Majorana A, Comparison of HER-2 and Hormone Receptor Expression in Primary Breast Cancers and Asynchronous Paired Metastases: Impact on Patient Management *The Oncologist* 2008;13:838–844
35. Nakshatri H, Srour EF, Badve S. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009 Jan;4(1):50-60.