



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

**PAPEL DE PDGFR EN LA SENSIBILIDAD A INHIBIDORES
DE TIROSINA CINASA DE USO CLÍNICO EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE CÁNCER DE MAMA**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
SUB-ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA

ELIZABETH ESCOBAR ARRIAGA

TUTOR:

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

ASESORES DE TESIS:

DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ

DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA



MÉXICO, D. F. AGOSTO 2011



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.

Dr. Eucario León Rodríguez
Coordinador y Profesor Titular de Oncología Médica
Tutor de Tesis

Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez
Investigadora en Ciencias Médicas
Cotutora de Tesis

Dr. Luis F. Uscanga Domínguez
Director de Enseñanza

DEDICATORIAS

A mi madre por su apoyo durante todo este tiempo, por su fe en mí, por su fuerza y por el amor incondicional que en ella encuentro.

A mi hermano Moisés Escobar Arriaga por que su presencia en mi vida, significa fuerza y fidelidad a mis principios.

A Santos Soto por su paciencia, cuidados, comprensión y respeto; pero sobre todo por enseñarme todos los días lo que es el verdadero amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María de Jesús Ibarra y el Dr. José Esparza por su imponderable eficiencia en transformar y hacerme fácil aquello que parece inteligible. Gracias por su amistad, paciencia y enorme humanidad.

Al Dr. Eucario León Rodríguez, maestro y amigo que me introdujo en el estudio de la oncología, que me enseñó que la perseverancia, la dedicación y la disciplina permiten fortalecer las aptitudes y dones que cada uno posee.

A mis compañeros y amigos, Alejandra Zavala, Jorge Arturo e Iván González por su amistad, estímulo y su incondicional apoyo durante estos tres años.

Mi agradecimiento a todos mis compañeros, amigos, y a cada una de las personas que de alguna forma ayudó a la realización de esta tesis.

Este trabajo se realizó en la unidad de Bioquímica del INCMNSZ y contó con el apoyo económico del proyecto de CONACYT 102825.

INDICE

Marco teórico

1. Epidemiología del cáncer de mama.....	6
2. Factores de crecimiento y cáncer de mama.....	8
2.1 El oncogén HER2/NEU.....	8
2.2 HER1/Receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGFR).....	9
2.3 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR).....	10
2.4 El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y sus receptores (PDGFRs).....	10
3. Inhibidores de tirosina cinasa que bloquean PDGFR.....	13
3.1 Imatinib.....	13
3.2 Sorafenib.....	14
3.3 Sunitinib.....	14
4. Inhibidores de tirosina cinasa que bloquean PDGFR y el cáncer de mama.....	14
5. Acción de los ITK's en cultivos primarios de cáncer de mama.....	16
Planteamiento del problema y Justificación.....	18
Objetivos.....	19
Hipótesis.....	20
Metodología.....	21
1) Cultivos celulares primarios de cáncer de mama.....	21
2) Evaluación de la expresión de PDGFR β en cultivos primarios de cáncer de mama (Western blot y RT-PCR)	21
3) Infección con partículas lentivirales (PDGFR β shRNA) de las células de cultivos primarios de cáncer de mama.....	23
4) Ensayos de Citotoxicidad.....	24
Resultados.....	25
Discusión y Conclusiones	31
Bibliografía.....	35

MARCO TEÓRICO

1. Epidemiología del cáncer de mama.

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en las mujeres de los países industrializados y representa la primera causa de muerte a nivel mundial (Figura 1). En México, es un problema de salud pública importante, ya que a partir del 2006, el cáncer de mama es la segunda causa de muerte en el grupo de edad de 30 a 54 años, y se ubica como la primera causa de mortalidad por tumores malignos entre las mujeres (Figura 2). En países desarrollados es frecuente diagnosticar esta enfermedad en etapas tempranas, caso contrario ocurre en nuestro país, donde el diagnóstico se realiza en etapas avanzadas en la mayoría de los casos (1).

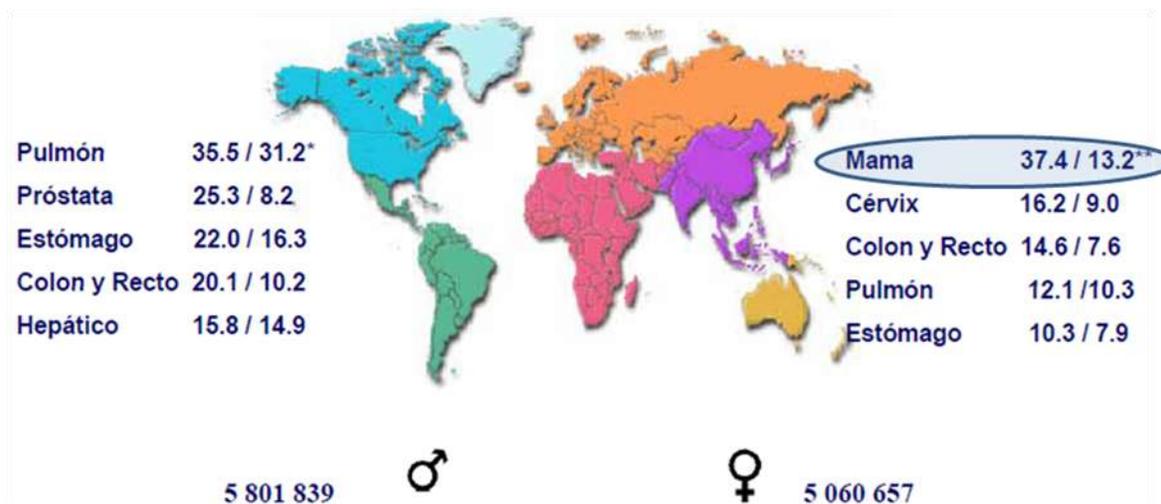


Figura 1. Incidencia y mortalidad (I/M) por cáncer de mama a nivel mundial.

Durante la última década, la tasa de mortalidad por cáncer de mama aumentó casi un 11%. El incremento real en el número de defunciones fue de 56.1% (de 2,214 muertes en 1990 a 3,455 en el año 2000 por cada 100 mil mujeres de 25 años y más). Para el período 1993-1999 se reportó una cifra acumulada de 57,509 casos nuevos de este tipo de cáncer. De acuerdo con la Secretaría de Salud, en el año 2000 sólo se diagnosticaron entre 5 -10% de los casos en estadios tempranos (0 y I), mientras que el 40 a 50% de los casos fueron diagnosticados en etapas avanzadas (estadio III) o metastásicos (IV). Siendo el costo del tratamiento del cáncer avanzado es más elevado y sus posibilidades de curación son mucho más bajas (2-3).

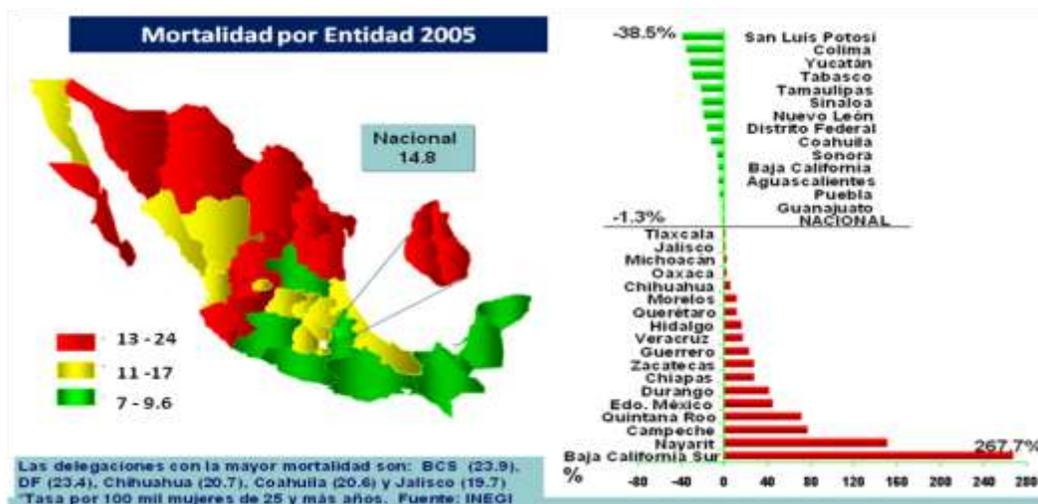


Figura 2. Índice de Mortalidad por cáncer de mama en México y distribución de la misma por entidad federativa.

2. Factores de crecimiento y cáncer de mama.

El avance de la biología molecular ha llevado a una mejor comprensión de la biología básica del cáncer de mama. Actualmente se ha demostrado la importancia de algunos factores de crecimiento y sus receptores en el cáncer de mama. Entre los más estudiados se encuentra el HER2, EGFR, VEGFR y PDGFR (4).

Como preámbulo al desarrollo de la quimioterapia personalizada, hay que recordar que el concepto de individualizar el tratamiento sistémico no es nuevo, ya que en los años 70 se comenzó a tratar el cáncer de mama con hormonoterapia en aquellas pacientes que sobre expresaban receptores hormonales. Actualmente, se están empleando inhibidores de blancos moleculares que se sobreexpresan en células cancerosas, como es el caso de los anticuerpos monoclonales (trastuzumab) que actúa contra una proteína de membrana plasmática (Her-2/neu).

2.1 El oncogén HER2/NEU

El her2 es un proto-oncogén que codifica una glicoproteína transmembranal con actividad tirosina-cinasa. La amplificación del gen 17q da como resultado la sobre-expresión de la proteína p180 HER-2, que se relaciona con un pronóstico desfavorable; así como, la presencia de ganglios positivos, expresión alterada de p53 y aumento de la proliferación celular (figura 3) (5,6). La amplificación de Her2

es una de las alteraciones genéticas más comunes asociadas con el cáncer de mama dando lugar a la aparición de resistencia a drogas de quimioterapia y a conductas clínico-patológicas más agresivas (7).

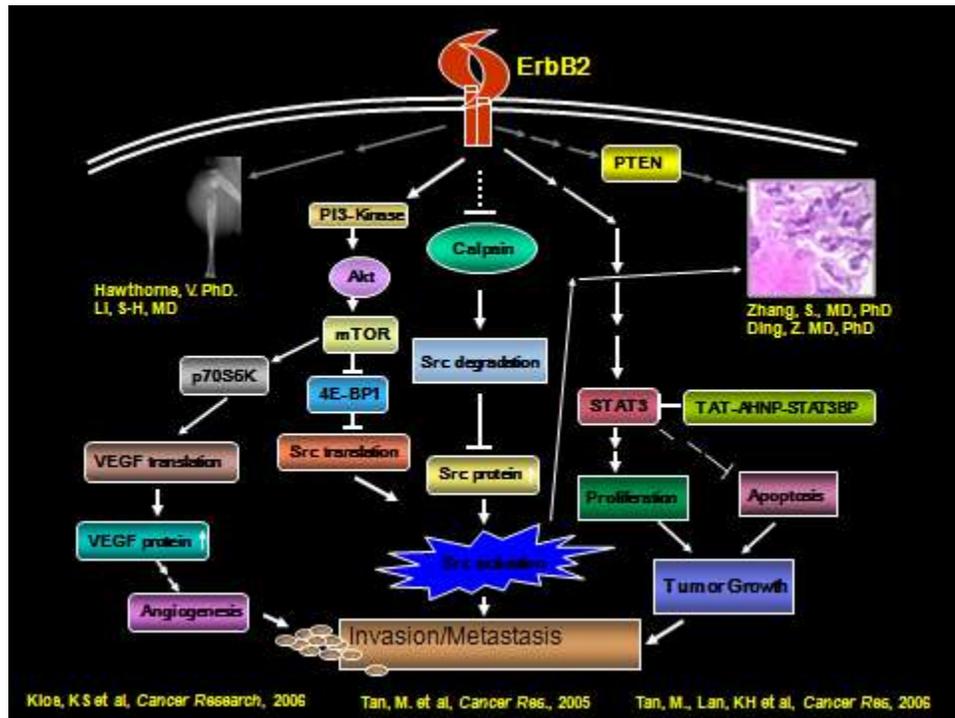


Figura 3. Expresión de HER2 y las vías de señalización que contribuyen a la carcinogénesis en cáncer de mama.

2.2 HER1 / Receptor para factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

El receptor para factor de crecimiento epidérmico posee actividad de tirosina-quinasa interviniendo en la división de células epiteliales inducida por EGF. Se encuentra sobre-expresado en el 30% de los cánceres de mama. Está asociado a un período libre de enfermedad más corto y a disminución de la supervivencia,

mostrando una relación inversa altamente significativa con la presencia de receptores de estrógenos. Por lo tanto, en presencia de EGFR la respuesta a la terapia hormonal se ve reducida (8).

2.3 Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR).

El factor de crecimiento del endotelio vascular es un regulador importante de la angiogénesis, de la permeabilidad vascular, y es considerado el mitógeno más potente de las células endoteliales. En el cáncer de mama se utiliza como indicador de pronóstico desfavorable. Dado que la angiogénesis es esencial para el crecimiento y progresión tumoral, se está prestando gran atención al uso de inhibidores de la misma como coadyuvante de otras terapias. Se ha observado que las pacientes con metástasis presentan títulos elevados del VEGF en plasma y podrían beneficiarse con el tratamiento con anti-VEGF (9,10).

2.4 El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y sus receptores (PDGFRs)

El factor de crecimiento derivado de plaquetas es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas, unidas por puentes disulfuro (11). El PDGF es el producto de cuatro diferentes genes que son ensamblados en cinco isoformas distintas conocidas como: AA, AB, BB, CC y DD, siendo las cadenas CC y DD las identificadas más recientemente (12). Dependiendo del tipo de dímero de que se trate se va a presentar una actividad biológica diferente. El PDGF participa en la

progresión del cáncer a través de la señalización inducida por sus receptores (PDGFR α y PDGFR β), éstos modulan la proliferación y la diferenciación de diversas células tumorales. Los receptores son estimulados selectivamente por los diferentes dímeros PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y-DD (Figura 4) (13).

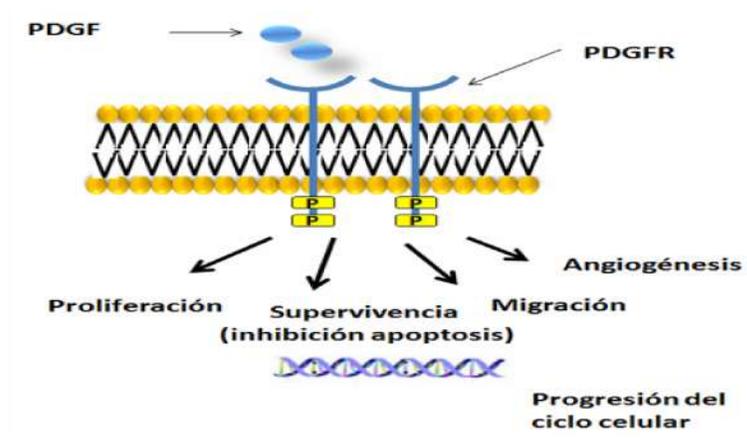


Figura 4. El PDGF y la unión a su receptor transmembranal en la participación de diferentes vías de proliferación y supervivencia celular.

Los receptores de PDGF se encuentran asociados a la activación de varias vías de señalización como Ras-MAPK, PI3K-AKT/PKB y PKC. Estas vías conllevan a la modulación de procesos biológicos como la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular (Figura 5) (14,16).

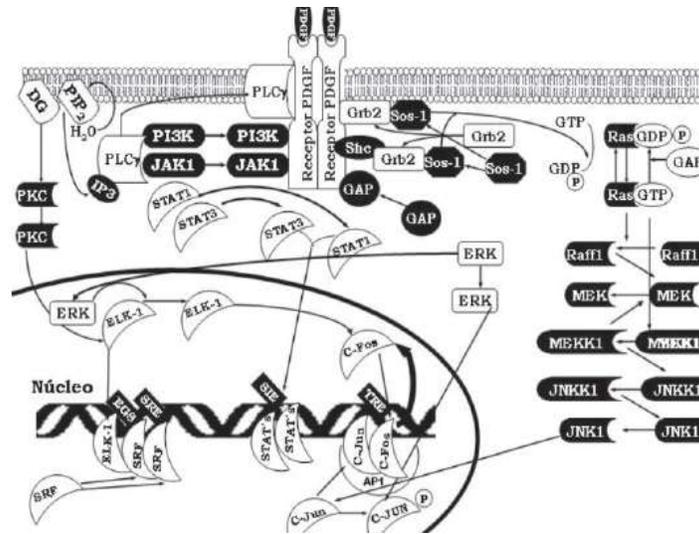


Figura 5. Vías de señalización activadas por el receptor del PDGF.

De los dos receptores de PDGF, el PDGFR β se ha asociado más con el cáncer de mama, ya que se reportado se expresa hasta en un 70% de los casos, tanto en las células de cancerosas, como en las células endoteliales asociadas al tumor. Esta expresión es comparativamente mayor en el cáncer invasor, que en el tejido normal y en condiciones pre-malignas (ver figura 6). Además, su expresión se correlaciona con parámetros de mal pronóstico clínico (ganglios positivos, expresión de HER2 y un comportamiento más invasivo del tumor) (17).

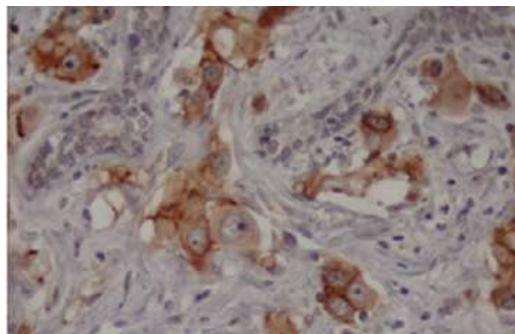


Figura 6. Expresión de PDGFR β en células endoteliales de tumores de mama.

Paulsson *et al*, caracterizó la expresión de PDGFR β en el estroma de diversos tumores, incluyendo el cáncer de mama. Observó una expresión de este receptor en el estroma adyacente al tumor sugiriendo una estimulación parácrina del tejido estromal (figura 7). Además, la expresión PDGFR β en el estroma de pacientes pre-menopáusicas con cáncer de mama se correlacionaron con un mal pronóstico. Estos datos revelan la importancia de examinar la expresión receptores de PDGFR β en células malignas, así como del estroma, para obtener información pronóstica en pacientes con cáncer de mama (18-20).

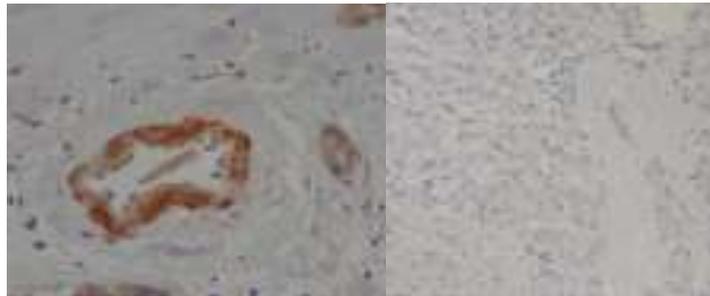


Figura 7. Expresión de PDGFR β en el estroma del tejido adyacente de tumores de mama.

Esta asociación entre la expresión del PDGFR β y el potencial metastático, han permitido el desarrollo de estudios *in vitro* que han demostrado que la inhibición de la vía de PDGFR β con el fármaco STI571 (Imatinib), conduce a la reducción de la formación de metástasis (20). Estos hallazgos nos permiten clasificarlo entre el grupo de moduladores potencialmente útiles en el tratamiento de la progresión del cáncer de mama y apoyan la teoría de una posible terapia anti-angiogénica, anti-PDGFR β , en los casos de cáncer de mama que expresen este receptor.

3. Inhibidores de tirosina cinasa que bloquean PDGFR

Los inhibidores de tirosina-cinasa (ITK's) son fármacos dirigidos a impedir la reacción de fosforilación de múltiples blancos moleculares; por lo que, resultan útiles en algunos tumores que expresan proteínas cinasas constitutivamente activas. Se han desarrollado diversos inhibidores que pueden bloquear la actividad de PDGFR, los mayormente utilizados en la clínica son: Imatinib, Sunitinib y Sorafenib.

3.1 Imatinib

. El Imatinib es una molécula pequeña parecida a ATP que actúa inhibiendo la actividad tirosina cinasa de tres tipos de proteínas cinasas: BCR-Abl, c-Kit y PDGFR. El Imatinib es exitosamente utilizado en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, inhibiendo a la proteína de fusión BCR-Abl, producto de la traslocación t9:22, conocido como cromosoma filadelfia. También es utilizado en el tratamiento de tumores del estroma gastrointestinal (GIST), que presentan mutaciones en el receptor c-Kit. En ambas condiciones patológicas este medicamento ha demostrado ser muy efectivo y posiblemente junto con el Trastuzumab, han resultado ser los de mayor revolución terapéutica en los últimos años en el uso de tratamientos dirigidos (21).

3.2 Sorafenib

El Sorafenib es una nueva generación de moléculas pequeñas que tienen la capacidad de inhibir múltiples cinasas. Este actúa sobre RAF, c-KIT, VEGFR-2, VEGFR-3 y PDGFR- β (22). Al igual que el Sunitinib tiene actividad antiproliferativa y disminución de la neoangiogénesis. Está aprobado su uso para cáncer de riñón en estadios avanzados en el que ha demostrado mejorar la supervivencia (21, 22).

3.3 Sunitinib

El Sunitinib es una molécula pequeña con capacidad de inhibir la actividad tirosina cinasa de tres tipos de receptores de membrana: PDGFR , c-kit y VEGFR (20). Este inhibidor tiene una doble acción al poder bloquear la proliferación de las células tumorales y la neoangiogénesis. Actualmente, el Sunitinib tiene dos indicaciones aprobadas, basado en la inhibición de c-kit y VEGFR (22,23). Uno es el tratamiento del carcinoma renal de células claras no operable o metastásico. En GIST, se utiliza en pacientes que presentan resistencia al tratamiento con Imatinib.

4. Inhibidores de tirosina cinasa que bloquean PDGFR y el cáncer de mama.

Actualmente, existen varios estudios fase I y fase II que investigan la utilidad de los inhibidores de tirosina-cinasa en cáncer de mama. La mayoría han demostrado

utilidad, principalmente al combinarse con quimioterapia citotóxica. Las tasas de respuesta son muy variables que van desde 10 hasta el 75% (tabla 1). Cabe mencionar que en estos estudios no se analizaron los niveles de expresión de las moléculas blanco en las líneas celulares o en los tumores (22-24).

ITK's	Fase	Pacientes	ITKs/Qtx	Respuesta %
Imatinib	II	CMM	Imatinib	Ninguna
Imatinib	II	CMM 1 ^a y 2 ^a	Imatinib/ capecitabina	11%
Sunitinib	II	CMM her2 2 y 3a	Sunitinib	15%
	II	CMM 1a	Sunitinib/ Paclitaxel	40%
	II	CMM 1a	Sunitinib/ Docetaxel	72%
Pazopanib	II	CMM her2 1a	Pazopanib + lapatinib/ lapatinib	30 vs 40%

Tabla 1. Estudios que existen con ITK's con actividad en PDGFR en cáncer de mama. Abreviaciones: CMM (cáncer de mama metastásico).

A pesar de los hallazgos antes descritos del papel de PDGFR β en el cáncer de mama realmente ha sido poco estudiada como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de este tipo de tumor. Lo anterior permite abrir líneas de investigación sobre el papel de este receptor como utilizando ITK's en cáncer de

mama; así como, la combinación de estos con quimioterapia citotóxica para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama que expresen PDGFR β .

ACCIÓN DE LOS ITK'S EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE MAMA.

En la Unidad de bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) se realizaron cultivos primarios mediante explantes de varias muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama tratadas en el instituto (Protocolo aprobado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” Ref: 159).

En estos cultivos primarios denominados MBCD25, MBCDF, MBCD17, MBCD5, fueron caracterizadas según la expresión de receptores hormonales; receptores de estrógeno (RE), receptores de progesterona (RP) y receptores de factores de crecimiento (PDGFR y HER2) como se demuestra en la tabla 2.

	Her2	PDGFRβ	ER	PRA	PRB
T47D	++	+++	-	+	+
MBCD25	+++	+++	-	+++	+
MBCD17	++	+++	-	+++	+
MBCDF	+++	+++	-	++	+
MBCD5	++	-	-	-	-

Tabla 2. Expresión de receptores hormonales y factores de crecimiento en células de cáncer de mama.

Posteriormente, se realizaron ensayos de citotoxicidad con ITK's (Imatinib, Sunitinib y Sorafenib). Se observó una disminución del porcentaje de viabilidad celular en todos los cultivos primarios con los tres inhibidores. Esta disminución de la viabilidad no se observó tan marcada en el cultivo MCB5, que carece de PDGFR β . Interesantemente, se observaron variaciones en la sensibilidad a estos tres inhibidores en los diferentes cultivos celulares de cáncer de mama. También se observó la disminución de la fosforilación de PDGFR β en la línea celular T47D y en los cultivos celulares primarios de cáncer de mama MCB25 , MCB17, MCBDF y MCB5 que fueron tratados con estos ITK's (Imatinib [10 mM], Sunitinib [1mM] and Sorafenib [0.5 mM]). (Esparza-López, J. et al. Resultados no publicados).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La expresión de PDGFR β en cáncer de mama y su relación con la proliferación celular y la progresión ha sido anteriormente estudiada. Actualmente sabemos que aproximadamente 70% de los tumores malignos de mama expresan este receptor. Sin embargo, existen pocos estudios que fundamente el posible uso de este receptor como blanco terapéutico. Por lo que sería importante investigar el papel de PDGFR β en respuesta a ITKs. Esto nos permitirá tener un terreno más explorado sobre su potencial como blanco terapéutico, ya que actualmente vivimos la era de terapia blanco en donde la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento asociadas a vías de proliferación y progresión tumoral apoyan la utilidad de fármacos que mejoran la supervivencia de los pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de PDGFR β en la sensibilidad a inhibidores de tirosina cinasa en células de cultivos primarios de cáncer de mama.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Medir la expresión de PDGFR β a nivel de RNA y proteína en cultivos primarios de cáncer de mama.
- 2) Inhibir la expresión de PDGFR β con shRNA en cultivos primarios de cáncer de mama.
- 3) Obtener cultivos estables de células que se silenció el PDGFR β mediante shRNA.
- 4) Evaluar el efecto del silenciamiento de PDGFR β en la sensibilidad a inhibidores de tirosina-cinasa (Imatinib, Sunitinib y Sorafenib) en estos cultivos celulares.

HIPÓTESIS

La inhibición de PDGFR β en células de cultivos primarios de cáncer de mama promoverá resistencia a inhibidores de tirosina cinasa con actividad sobre este receptor.

HIPÓTESIS NULA

La inhibición de PDGFR β en células de cultivos primarios de cáncer de mama no promoverá resistencia a inhibidores de tirosina cinasa con actividad sobre este receptor.

MATERIAL Y MÉTODOS

1) Cultivos celulares primarios de cáncer de mama.

Los cultivos primarios denominados MBCD25, MBCDF, MBCD17, MBCD5 fueron obtenidos por explantes de varias muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama tratadas en el instituto (Protocolo aprobado por el comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” Ref: 159), en la Unidad de Bioquímica del Instituto. La inmortalidad se asumió después de mantenerse en crecimiento continuo *in vitro* por más de dos meses. Los cultivos celulares fueron mantenidos en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y mantenidos a 37 °C en una atmosfera humedificada que contiene 5% de CO₂.

2) Evaluación de la expresión de PDGFR β en cultivos primarios de cáncer de mama.

La expresión de PDGFR β en los cultivos primarios de cáncer de mama MBCD25, MBCD17, MBCDF, MBCD5 fue analizado por medio de la técnica de western blot y por RT-PCR.

Ensayo de Western Blot: Las células fueron sembradas en cajas de petri se dejaron a que tuvieran una confluencia del 80-90% y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS. 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 ortovanadato 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 inmobilon-P PVDF (Millipore Corp Bedford, MA). La membrana se bloqueo 1hr con leche 5% en PBS Tween. Posteriormente se incubó con los anticuerpos primarios contra el receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas beta (PDGFR β), toda la noche a 4 °C. Se incubó con el anticuerpo secundario de ratón por 45 min. La señal fue visualizada por quimioluminiscencia y se expuso a una película radiográfica (Kodak). La detección de alfa-tubulina se utilizó como control de cargado de proteína.

La extracción de RNA y la Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción

Reversa: El RNA celular total fue aislado con el reactivo GeneAmp RNA PCR (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., Cat No. M5904) de acuerdo a las instrucciones. El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total utilizando el oligo d(T)₁₆ como primer. Las muestras preparadas de cDNA fueron amplificadas y analizadas utilizando la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos para amplificar PDGFR β fueron: 2395F (5' CAGTGAGAAGCAAGCCCTTATG 3') y 2692R (5' ACTCGTCCTTGCTCATGTCC 3'). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y visualizados mediante fluorescencia ultravioleta tras tinción con bromuro de etidio.

3) Infección con partículas lentivirales (PDGFR β shRNA) de las células de cultivos primarios de cáncer de mama.

Se seleccionaron dos cultivos primarios de cáncer de mama que expresan PDGFR β : Las MCBDF y MCBD25 para la infección con partículas lentivirales utilizando partículas lentivirales con shRNA (Del inglés: small hairpin) para PDGFR- β humano: sc-29442-V (Santa Cruz Biotechnology, Inc), bajo el siguiente protocolo.

Las células se colocaron en placas de 12 pozos y se añadió medio óptimo con suero y antibiótico, estas se incubaron durante toda la noche, calculando que las células estuvieran aproximadamente al 50% de confluencia el día de la infección. El día de la infección (día 2) se preparó medio completo con polibreno [] y se reemplazo por el medio que tenían las células colocándolo en cada pozo. Se descongelaron las partículas lentivirales a temperatura ambiente y se mezclaron suavemente antes de utilizarlo, posteriormente se procedió a infectar las células mediante la adición de las partículas lentivirales de PDGFR β shRNA al cultivo y se agitó suavemente la placa para mezclar e incubar las células. El día 3 se retiró el medio de cultivo y se reemplazo con 1ml de medio completo sin polibreno y las células se incubaron durante toda la noche. Para seleccionar las clonas estables de shRNA, se diluyeron 1:3 y se continuaron incubando toda la noche.

Para seleccionar las clonas estables que expresaron el shRNA se utilizó dihidrocloruro de puomicina a una concentración suficiente para matar a las

células no transducidas. El medio con puromicina se agregó cada 3 a 4 días, con el fin de identificar a las colonias resistentes. Se realizaron 3 infecciones seriadas cada 7 días de las dos líneas celulares. El silenciamiento de PDGFR se analizó mediante ensayos de Western Blot como se describió arriba.

4) Ensayos de Citotoxicidad

Se realizaron tres experimentos de citotoxicidad con cada inhibidor de tirosina-cinasa: Imatinib, sorafenib, y sunitinib para los dos cultivos celulares primarios; MCBDF y MCBDF25 sin y con shRNA PDGFR β . Para cada experimento se sembraron un número de 7,500 células/cm² (por pozo) de clones seleccionadas de cada una de las 3 infecciones, identificadas como; MCBDF-1, MCBDF-2, MCBDF-3 y MCBDF25-1, MCBDF25-2, MCBDF25-3, respectivamente, cada ensayo se realizó por triplicado. 24 hrs después se agregó el inhibidor de tirosina-cinasa a diferentes concentraciones: para Imatinib de 0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10 y 50 μ M; para sunitinib de 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 μ M, para sorafenib de 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μ M. El fármaco se dejó actuar por 48 hrs. Posteriormente, se detuvo el experimento fijando las células con glutaraldehído al 1.1% en PBS por 20 minutos. Después se tiñeron con la técnica de cristal violeta, se lavaron con agua para eliminar el exceso de colorante. Se les colocó ácido acético al 10% para disolver el colorante y posteriormente a 15 min se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de ELISA.

RESULTADOS

1. Expresión de PDGFR β en cultivos primarios de cáncer de mama.

Se evaluó la expresión de PDGFR β a nivel de RNA y proteína en la línea celular T47D y en los cultivos primarios de cáncer de mama MBCD25, MBCD17, MBCDF, MBCD5. Se encontró que PDGFR β se expresa a nivel de RNA y proteína en la línea celular T47D y en los cultivos primarios MBCD25, MBCD17, MBCDF; mientras que el cultivo primario MBCD5 no expresa PDGFR β a nivel de RNA y proteína (Fig 1A,B).

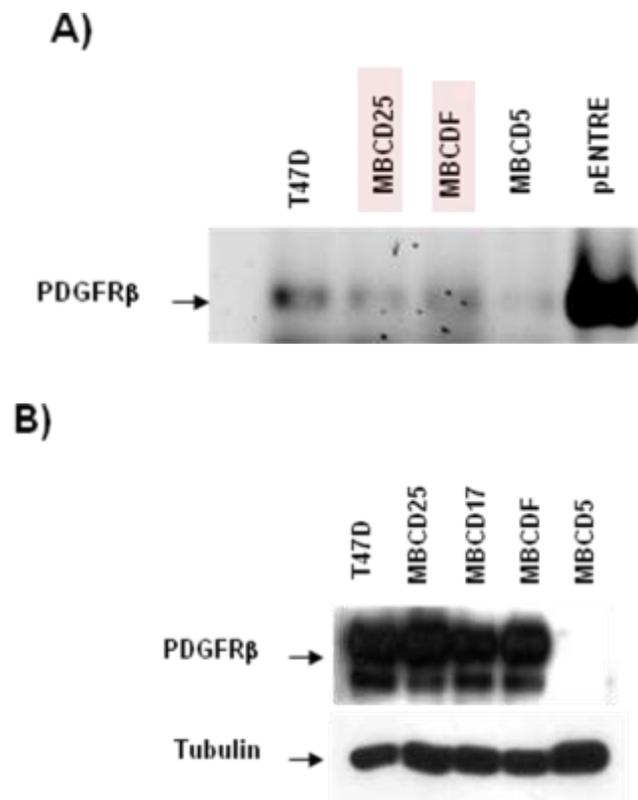


Figura 1. Expresión de PDGFR β en cultivos primarios de cáncer de mama. A) RT-PCR de PDGFR β , B) Western blot de PDGFR β .

2. Inhibición de expresión de PDGFR β con shRNA en cultivos primarios de cáncer de mama.

En estudios previos se había encontrado que un cultivo primario que no expresa PDGFR β mostraba una mayor resistencia a los ITKs, lo cual sugería un papel relevante de este receptor en la sensibilidad a ITKs en célula de cáncer de mama. Para evaluar el papel de PDGFR β en respuesta a los ITK's, se silenció el gen de este receptor con shRNA en dos cultivos celulares primarios MBCDF y MBCD25. La disminución de la expresión de PDGFR β se evaluó mediante Western Blot. En las células MBCDF se demostró una disminución de la expresión de PDGFR β , del 20% en la primera infección y del 50% con la segunda y tercera infección. En las células MBCD25 se obtuvo una disminución del 30%, 20% y 50% con la 1^a, 2^a y 3^a infección respectivamente (Figura 2, panel superior). Se muestra la tubulina como control de carga interna de proteína equivalente (Figura 2, panel inferior).

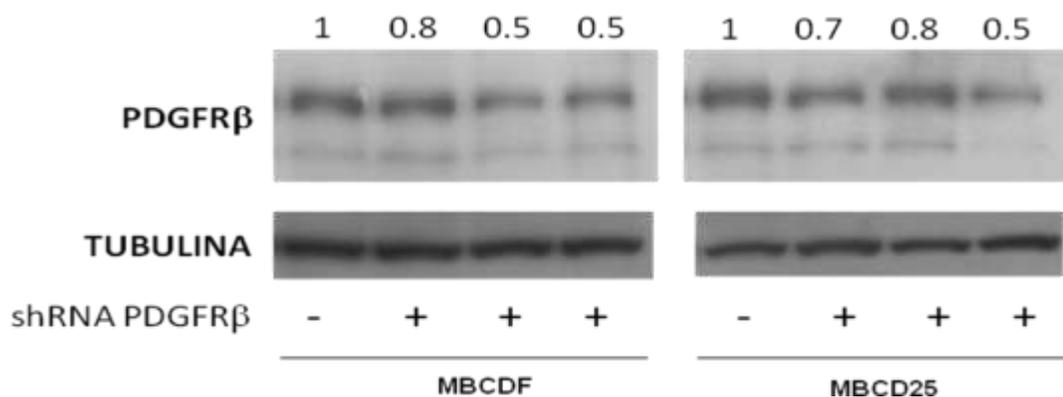


Figura 2. Silenciamiento de la expresión de PDGFR β en los cultivos primarios de cáncer de mama MBCDF y MBCD25 mediante shRNA.

3. Ensayos de Citotoxicidad.

a) Cinética de viabilidad celular en cultivos primarios de cáncer de mama con silenciamiento de PDGFR β tratadas con Imatinib.

Se realizaron cinéticas de viabilidad celular en los cultivos MBCDF y MBCD25 parentales y las silenciadas en la expresión de PDGFR β con shRNA. En las curvas de viabilidad celular con Imatinib a diferentes concentraciones, se observó que en las células MBCDF con shRNA 1, 2 y 3 existe mayor resistencia al Imatinib comparado con las que no tienen shRNA (Figura 5).

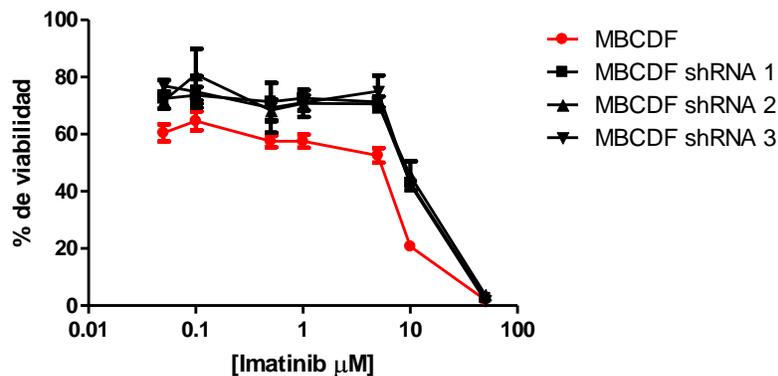


Figura 5. Curva de viabilidad celular con Imatinib en cultivos primarios de cáncer de mama MBCDF con disminución de la expresión de PDGFR β con shRNA. Se muestra las curvas de las células no infectadas y las células con las tres infecciones (1,2 y 3).

Cuando se realizaron las curvas de sensibilidad a Imatinib de los dos cultivos primarios MBCDF y MCD25. Se observó que en las MBCDF y en las MBCD25 de las células con disminución de la expresión de PDGFR β con shRNA de las tres infecciones requieren menos concentración de Imatinib para alcanzar su concentración inhibitoria máxima media (IC50), a diferencia de las que no tienen shRNA (Figura 6).

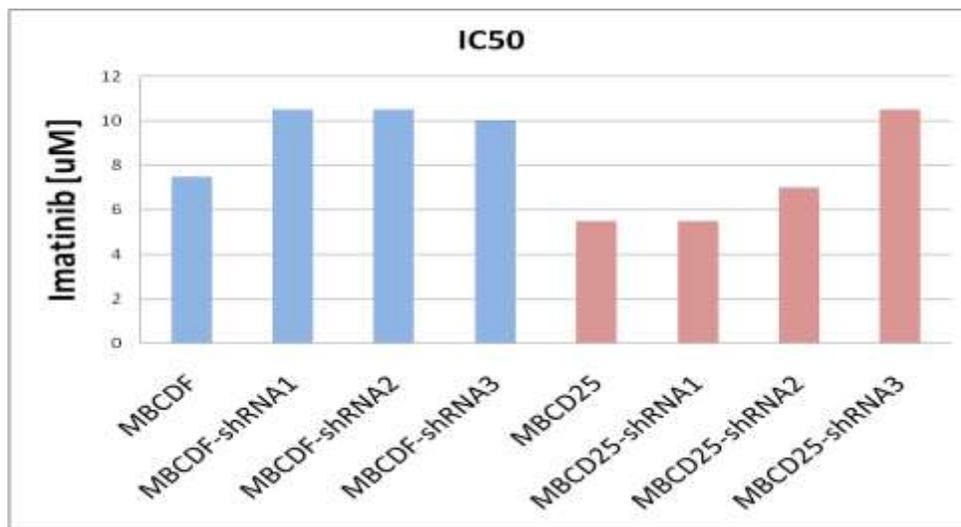


Figura 6. Concentración inhibitoria máxima media (IC50) de Imatinib de los cultivos primarios MBCDF Y MBCD25 sin y con disminución de la expresión de PDGFR β con shRNA.

b) Cinética de viabilidad celular en cultivos primarios de cáncer de mama con silenciamiento de PDGFR β tratadas con Sorafenib.

Cuando se realizaron las curvas de viabilidad celular con Sorafenib en las mismas condiciones que con Sunitinib, pero ha diferentes concentraciones. Se encontró una mayor resistencia al fármaco en las células con disminución de la expresión de PDGFR β , aunque de manera menos clara que lo observado con Sunitinib, esta diferencia se presentó a concentraciones de 0.1 a 1 μ M para los cultivos MBCDF (Figura 4, panel de arriba). En tanto que para los cultivos MBCD25 aunque si existe mayor porcentaje de viabilidad celular en células con las células silenciadas con PDGFR β no es significativo (Figura 4, panel de abajo).

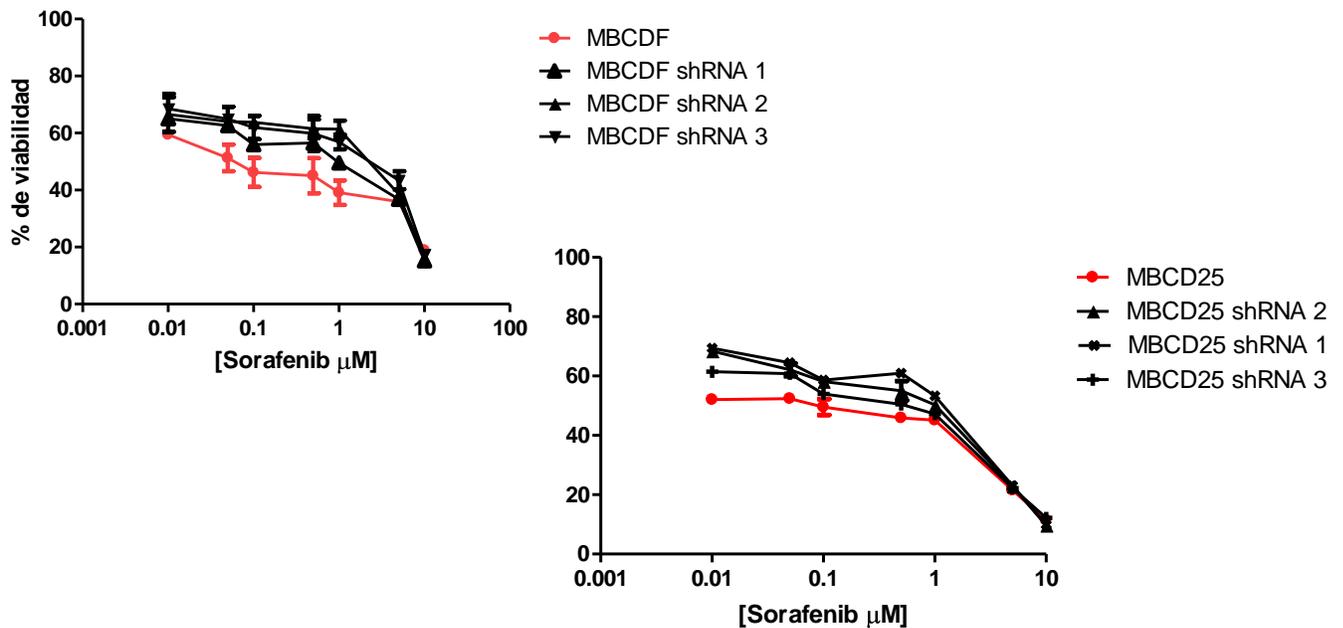


Figura 4. Curvas de viabilidad celular con Sorafenib en cultivos primarios de cáncer de mama MBCDF y MBCD25 con silenciamiento de PDGFR β con shRNA. Se muestra las curvas de las células no infectadas y las células con las tres infecciones (1,2 y 3)

c) Cinética de viabilidad celular en cultivos primarios de cáncer de mama con silenciamiento de PDGFR β tratadas con Sunitinib.

Se realizaron cinéticas de viabilidad celular en los cultivos MBCDF y MBCD25 parentales y las silenciadas en la expresión de PDGFR β con shRNA. Se encontró que ha distintas concentraciones de Sunitinib las células que tienen disminuida la expresión de PDGFR β con el shRNA (1,2 y 3) son más resistentes que las que no tienen shRNA, de forma significativa. Este efecto se observó en las células de los dos cultivos primarios MBCDF (Figura 3, panel de arriba) y MBCD25 (Figura 3, panel de abajo).

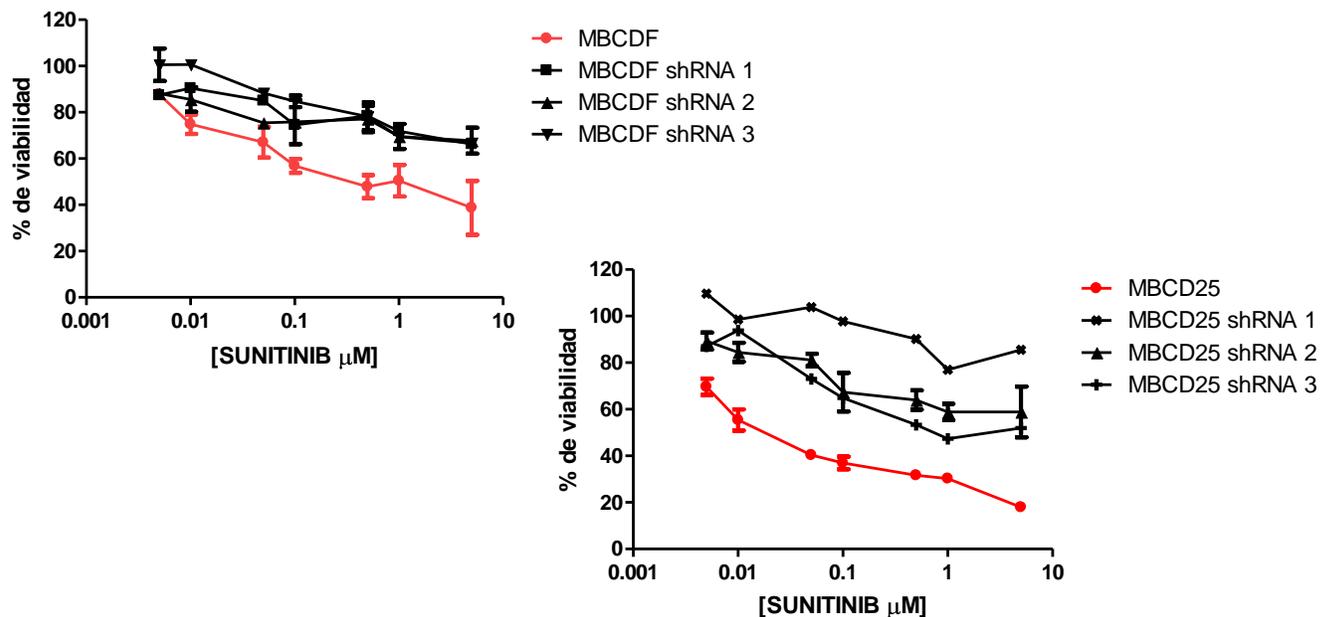


Figura 3. Curvas de viabilidad celular con Sunitinib en cultivos primarios de cáncer de mama MBCDF y MBCD25 con silenciamiento de PDGFR β con shRNA. Se muestra las curvas de las células no infectadas y las células con las tres infecciones (1,2 y 3).

DISCUSIÓN

En la actualidad se buscan nuevos marcadores pronósticos y blancos terapéuticos en el tratamiento del cáncer. En el cáncer se cuenta con marcadores como los receptores hormonales y el Her2. Sin embargo, a pesar de estos marcadores, este tipo de cáncer sigue siendo un problema de salud pública. Por lo cual, todavía existe la necesidad de buscar nuevos marcadores y blancos en el tratamiento de este cáncer. Se ha descrito que el PDGFR β juega un papel fundamental en la progresión y agresividad de tumores que lo expresan (25). Especialmente en el cáncer de mama, donde la expresión de este receptor se correlaciona con un comportamiento más agresivo (20).

De hecho existen estudios con inhibidores de tirosina cinasa fase II en pacientes con cáncer de mama metastásico; sin embargo, ninguno de estos estudios ha evaluado la expresión de PDGFR β como factor predictivo de respuesta a estos inhibidores (22-24). Por lo tanto, el papel de la expresión de PDGFR β en cáncer de mama, como potencial predictor de respuesta a los inhibidores de tirosina cinasa aún no ha sido completamente esclarecido.

En este trabajo se investigó el papel de PDGFR β como predictor de respuesta a ITK's, mostrando que la disminución de la expresión de PDGFR β en cultivos primarios de cáncer de mama promueve resistencia a sunitinib, sorafenib e imatinib. El silenciamiento de PDGFR β con el shRNA se midió en una población muy heterogénea, no seleccionada; donde probablemente se encuentren células

que no lo expresen, y células que aún lo expresan en diferente proporción. En este grupo heterogéneo se logró una disminución de la expresión de este receptor de hasta el 50% para la tercera infección en las células de los dos cultivos primarios de cáncer de mama. Por lo que los resultados obtenidos en las cinéticas de los inhibidores de tirosina cinasa con estas células nos indican que el PDGFR β juega un papel importante en la respuesta a los ITKs. Es necesario clonar las poblaciones que no expresen o expresen una mínima cantidad de este receptor para evaluar la posible participación de otros receptores, dado que estos inhibidores nos son exclusivos de PDGFR β .

En las cinéticas de viabilidad celular con sunitinib, interesantemente observamos una mayor resistencia al medicamento en las células con disminución de la expresión de PDGFR β , comparadas con las que expresan de forma íntegra este receptor (sin shRNA), tanto para los cultivos celulares MBCDF como para las MBCD25. Información que complementa lo encontrado antes en el laboratorio, donde estas células sin inhibición de PDGFR β fueron más sensibles a este inhibidor. Con este resultado podríamos inferir que pacientes que expresen PDGFR β podrían ser tratadas con Sunitinib dado que la presencia de este receptor les proporcionar una mayor sensibilidad a este fármaco.

Sin embargo en las cinéticas con sorafenib aunque se observa una tendencia de mayor porcentaje de viabilidad celular, el efecto no es tan evidente como en el caso del sunitinib. En este sentido se ha reportado que la afinidad de estos dos inhibidores por PDGFR β es diferente. La IC₅₀ de Sorafenib (60 nM) es seis veces

mayor que la IC50 de Sunitinib (10 nM) (22), lo que aunado a la heterogeneidad de las poblaciones silenciadas de PDGFR β , puede explicar que no se observe un mayor efecto de resistencia a los ITKs.

Adicionalmente, los resultados con imatinib mostraron que las células con disminución de la expresión de PDGFR β tienen una tendencia a resistir este fármaco, comparadas con las células que expresan sus niveles normales de PDGFR β . De hecho podemos observar, que la concentración inhibitoria máxima media (IC50) de Imatinib es mayor de 20 a 50% en células que tienen disminución de la expresión de PDGFR β comparadas con las que lo expresan de forma íntegra, tanto para los cultivos celulares MBCDF como MCD25.

Los resultados evidencian la importancia de este receptor como predictor de respuesta a ITK's en especial a sunitinib. Aún así se espera que este efecto se vuelva mucho más significativo y claro al poder seleccionar las clonas que tengan silenciamiento del gen de PDGFR β y realizar las cinéticas en una población más homogénea. Finalmente, no hay que olvidar que existen estudios clínicos ya corriendo con inhibidores de tirosina cinasa con actividad sobre este receptor en cáncer de mama (22-24), y que hasta un 30-35% de los cánceres de mama no expresan este receptor, por lo tanto este grupo de pacientes no se beneficiaría de este tratamiento. Por lo que encontrar evidencia que sustente que la expresión de PDGFR β puede ser un potencial marcador predictivo de respuesta a ITKs, puede ser de utilidad en la práctica clínica, lo cual tendría un impacto en la supervivencia en los pacientes.

CONCLUSIONES

En conclusión, demostramos que PDGFR β juega un papel importante en la sensibilidad a ITKs y podría utilizarse como marcador predictivo de respuesta a estos fármacos. Encontramos que al inhibir la expresión de este receptor con shRNA en células de cultivos primarios de cáncer de mama que expresaban PDGFR β presentaron una mayor resistencia a inhibidores de tirosina cinasa. Por lo tanto, pacientes con cáncer de mama que presenten una mayor expresión PDGFR β implicaría que se pueden beneficiar de una mejor respuesta al tratamiento de ITKs, específicamente al sunitinib.

BIBLIOGRAFIA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J et al. Global Cancer Statistics, 2005. *Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.
2. Secretaría de Salud. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. 2007.
3. Lopez-Carrillo L, Torres-Sanchez L, López-Cervantes M. Identificación de lesiones mamarias malignas en México. *Salud Pública México* 2001; 43:199-202.
4. Tallquist M, Kazlauskas A. Signaling in cells breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15:205-213.
5. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1673-1684.
6. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:1659-1672.

7. Nahta R, Esteva F. HER2 therapy: Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.* 2006;8(6):215.
8. F . Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt. Overexpression of EGFR in breast cancer is associated with tumor progression. *Breast Cancer Res.* 2005; 7:R788-R795
9. Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H, Grünert nS. Autocrine EGFR signaling promotes mammary breast trials *Eur J Cancer* 2003; 39: 2439-2449
10. Boucher, P.; Liu, P.; Gotthardt, M.; Hiesberger, T.; Anderson, R.; Herz, J. 2002. Platelet-derived Growth Factor Mediates Tyrosine Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in Caveolae. *J Biol Chem*, 277: 15507-15513.
11. Cao, R.; Brakenhielm, E.; Xurili, M.; Pietras, K.; Widenfalk, J.; ostman, A.; Eriksson, U.; Cao Y. 2002. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR α and β receptors. *The FASEB Journal*, 16: 1575-1583.

12. Dhillon, S.; Meikle, S.; Yazici, M.; Eulitz, M.; Kolch, W. 2002. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *The EMBO Journal*, 21 (1-2): 64-71.
13. Karlsson, L.; Bondjers, C.; Betsholtz, C. 1999. Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development*, 126: 2611-2621.
14. Karlsson, L.; Lindahl, P.; Heath, J.; Betsholtz, C. 2000. Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR- α deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development*, 127: 3457-3466.
15. Heldin, C.; Ernlund, A.; Rorsman, C.; Rönstrand, L. 1989a. Dimerization of B type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation. *J Biol Chem*, 264: 8905-8912.
16. Heldin, C.; Östman, A.; Eriksson, U. 2002. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 398: 284-290.
17. Coltrera MD, Wang J, Porter PL, Gown AM. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor β

- subunit in human breast tissue and breast carcinoma. *Cancer Research* 1995; 55:2703-2708.
18. Seymour L, Dajee D, Bezwoda WR. Tissue platelet derived-growth factor (PDGF) predicts for shortened survival and treatment failure in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1993; 26:247-252
19. Bhardwaj B, Klassen J, Cossette N, Sterns E, Tuck A, Deeley R, Sengupta S, Elliott B. Localization of platelet-Derived growth factor β receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma. *Clinical Cancer Res.* 1996; 2:773-782.
20. Carvalho I, Milanezi F, Martins A, Reis RM, Schmitt, F. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor β in breast cancer is associated with tumor progression. *Breast Cancer Res.* 2005; 7:R788-R795.
21. Kvasnicka HM, Thiele J, Staib P, et al. Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia following imatinib mesylate (STI571) therapy. *Blood.* 2004;103:3549-3551.
22. Yujia Dai. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a review of the recent patent literature. *Expert Opin. Ther. Patents* (2010) 20(7):885-907.

23. Kristina M. Cook and William D. Figg. Angiogenesis Inhibitors: Current Strategies and Future Prospects. *CA Cancer J Clin* 2010;60;222-243.
24. Helen K. Chew,¹ William E. Barlow,² Kathy Albain A Phase II Study of Imatinib Mesylate and Capecitabine in Metastatic Breast Cancer: Southwest Oncology Group Study 0338 *Clinical Breast Cancer*, Vol. 8, No. 6, 511-515, 2008
25. Yu J, Ustach C and Kim HR: Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol* 36: 49-59, 2003.