



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

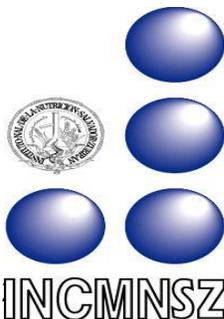
**LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL  
FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE  
PLAQUETAS INDUCE PROLIFERACIÓN,  
MIGRACIÓN, TUMORIGÉNESIS Y  
QUIMIOSENSIBILIDAD EM CULTIVOS  
PRIMARIOS DE CÁNCER DE MAMA**

PRESENTA:  
DR. ABDEL KARIM DIP BORUNDA

TESIS  
PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE:  
ONCOLOGIA MEDICA

TUTOR  
DR. EUCARIO LEON RODRIGUEZ

ASESOR DE TESIS:  
DRA. MARÍA DE JESUS IBARRA SANCHEZ



México, DF.

Agosto 2012



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. LUIS F. USCANGA DOMINGUEZ

DIRECTOR DE ENSEÑANZA

---

Dr. EUCARIO LEON RODRIGUEZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO Y JEFE DEL DEPARTAMENTO DE  
ONCOLOGIA MEDICA Y TUTOR DE TESIS

---

Dra. MARIA DE JESUS IBARRA SANCHEZ

COORDINADORA DEL LABORATORIO DE BIOQUIMICA INNSZ  
ASESOR DE TESIS

## DEDICATORIAS

Gracias al Doctor Eucario León Rodríguez, por su apoyo incondicional en todas las etapas de la subespecialidad, por sus consejos y participación en la toma de decisiones

Gracias al Dr. Saúl Campos Gómez, por apoyarme en los momentos difíciles del desarrollo de la especialidad

Gracias a mis compañeros que me apoyaron y de quienes recibí muchas enseñanzas

Gracias a mis padres, Salvador Dip T. y Marieliena Borunda M. por su apoyo incondicional.

Gracias a Nayeli Martínez Cruz por estar todos y cada uno de los días de la residencia a mi lado apoyándome en mis decisiones.

## ÍNDICE

	Pag.
MARCO TEÓRICO.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	12
OBJETIVO.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIÓN.....	30
BIBLIOGRAFÍA.....	31

**Introducción:** El cáncer de mama es el tumor diagnosticado con mayor frecuencia y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Las mayores tasas de incidencia se presentan en Norte América, Australia, norte de Europa y la región sur de Asia y África sub – Sahariana. El reporte por grupos de edad, muestra que este tumor corresponde al primer lugar de mortalidad por cáncer entre 40 y 59 años. Las probabilidades para el desarrollo tumoral son de un caso por cada seis mujeres en general y uno por cada 8 mujeres en el caso de tumores invasores <sup>[1]</sup>.

En México se presentaron 86,469 muertes por cáncer de mama en el periodo comprendido entre 1980 y 2009, con diferencias importantes entre ambos periodos. Se documentaron 1,206 defunciones en 1980 en comparación con 4,897 decesos en el 2009, estas cifras presentaron un incremento significativo en la tasa de mortalidad por este tumor, la cual pasó de 11.7 a 17 decesos por 100,000 muertes en mujeres en el año 2009 (Fig. 1)<sup>[7]</sup>

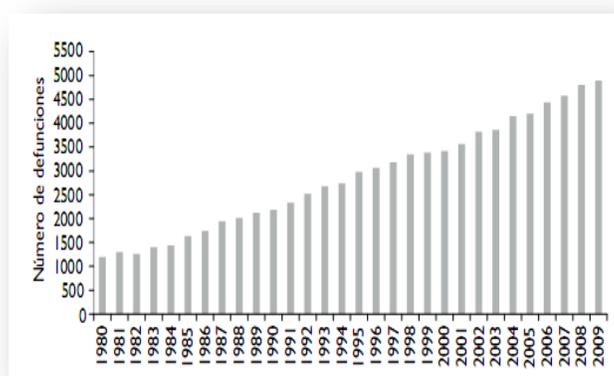


Fig. 1. Mortalidad por cáncer de mama en México

Este incremento en la mortalidad hace prioritario el desarrollo de estrategias eficaces en el tratamiento de este tumor. Un mejor entendimiento de la biología tumoral permitirá dirigir y optimizar su manejo, que se traducirá en mejores resultados en el control de la enfermedad y en supervivencia. En la actualidad, las investigaciones en esta área han aportado información sobre la presencia de factores pronósticos evaluables en tejido tumoral. Estos factores son reproducibles, accesibles, de fácil interpretación y no requieren un gran volumen de tejido. Dentro de los principales factores pronósticos que han sido reportados se encuentran: los receptores hormonales, los marcadores de proliferación, marcadores de invasividad y de potencial metastásico, así como receptores de factores de crecimiento, principalmente el receptor de factor de crecimiento epidérmico-2 (HER2)<sup>[9]</sup>.

La búsqueda constante de estos factores, ha dado pie al desarrollo de nuevas líneas de investigación en este campo. En nuestro centro, se ha profundizado la investigación del factor de crecimiento derivado de plaquetas y sus receptores en años recientes.

#### ***Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)***

El PDGF pertenece a la familia PDGF/VEGF que se caracteriza por tener 8 residuos de cisteína, y consta de 4 cadenas (A, B, C y D), que se codifican en los cromosomas 7p22, 22q13, 4q31 y 11q22 respectivamente.

Existen dos cadenas principales del PDGF: A y B. La cadena A presenta 2 isoformas, conteniendo 196 y 211 aminoácidos resultantes de un splicing diferencial del producto de la transcripción. Estas cadenas son sintetizadas, dimerizadas y procesadas

proteolíticamente a nivel de su N – terminal secretadas como un dímero de 30kDa. Por otro lado, la cadena B se conforma por 241 residuos de aminoácidos, es dimerizada y procesada por proteólisis adicional y finalmente secretada como un dímero de 24kDa<sup>[3]</sup>.

La conformación de las cadenas del PDGF puede presentarse como homodímeros (AA, BB) o heterodímero (AB). En todos los casos se conforman por tres puentes disulfuro ente los residuos 1-6, 3-7 y 5-8, los residuos 2 y 4 se conectan asimétricamente por 2 puentes disulfuro.

El papel del PDGF en el ciclo celular es el de un regulador “competente” durante la transición de la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Las células estimuladas con este factor progresan de la fase tardía de G<sub>1</sub> hacia la conclusión del ciclo celular lo que conlleva a su división. Las funciones biológicas del PDGF son variadas y se han documentado en todos los niveles del desarrollo embrionario; desarrollo alveolar, cutáneo y de oligodendrocitos en sistema nervioso central<sup>[4]</sup>.

### ***Receptores del PDGF***

Los efectos de las isoformas del PDGF son ejercidos mediante la activación de dos receptores de superficie con actividad de tirosina cinasa (PDGFR $\alpha$  y PDGFR $\beta$ ). Los genes de los receptores se localizan en los cromosomas 4q12 y 5q33 respectivamente. Ambos receptores constan de: un dominio extracelular que contiene cinco dominios tipo inmunoglobulinas, un dominio transmembranal, un domino yuxtamembranal, un dominio de cinasa, y un dominio de inserto. Estos receptores comparten 31% de homología en el dominio de unión a ligando, 27% en el del inserto de cinasas y 28% en el del C-terminal.

Los tres receptores diméricos de PDGF ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$ ,  $\beta\beta$ ) median señales de transducción específica de la isoforma del factor. El homodímero PDGF AA activa sólo PDGFR $\alpha\alpha$ , mientras que el heterodímero PDGF AB puede activar PDGFR $\alpha\alpha$  ó PDGFR $\alpha\beta$ , el homodímero PDGF BB activa los tres receptores diméricos, el homodímero PDGF CC activa PDGFR $\alpha\alpha$ , PDGFR $\alpha\beta$  y finalmente el homodímero PDGF DD activa únicamente al receptor PDGFR $\beta\beta$  (Fig 2)<sup>[5]</sup>

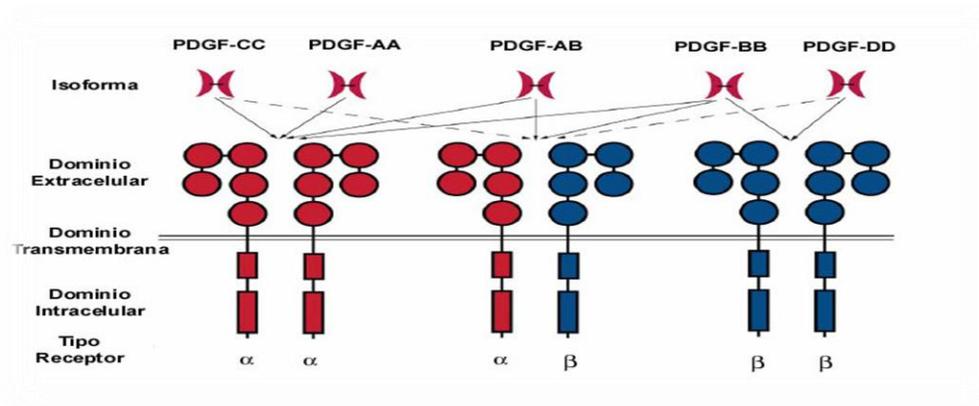


Fig 2; Interacción de los insertos de PDGF con sus receptores

### ***Vías de Señalización:***

La unión del ligando induce la dimerización del receptor, condicionando un cambio conformacional que permite la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en el dominio intracelular del receptor. La unión específica de moléculas de señalización intracelular a las tirosinas fosforiladas se lleva a cabo a través de los dominios SH2 y PTB, que unen fosfo-tirosinas, resultando en la activación de la cascada de señalización.<sup>[6]</sup>

Existen más de 10 moléculas con dominios SH2 con capacidad de unión a distintos sitios de fosforilación del PDGFR $\beta$ . Las moléculas con actividad enzimática incluyen al fosfatidilinositol 3' cinasa (PI3-K), fosfolipasa C- $\gamma$ (PLC $\gamma$ ), la familia Src de tirosina cinasas, la tirosin fosfatasa SHP2 y la proteína activadora de RAS por GTP (GAP). Las moléculas adaptadoras que unen al receptor activado con otros componentes de la señalización incluyen Grb2, Sjc, Grb7 y Crk. Los transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) son reclutados y fosforilados por receptores PDGFR $\beta$  activos y subsecuentemente presentan una migración nuclear como dímeros, activando directamente la transcripción de los genes diana. El reclutamiento y fosforilación puede ser directo como en el caso de STAT1 o indirecto como STAT3 (Fig 3).

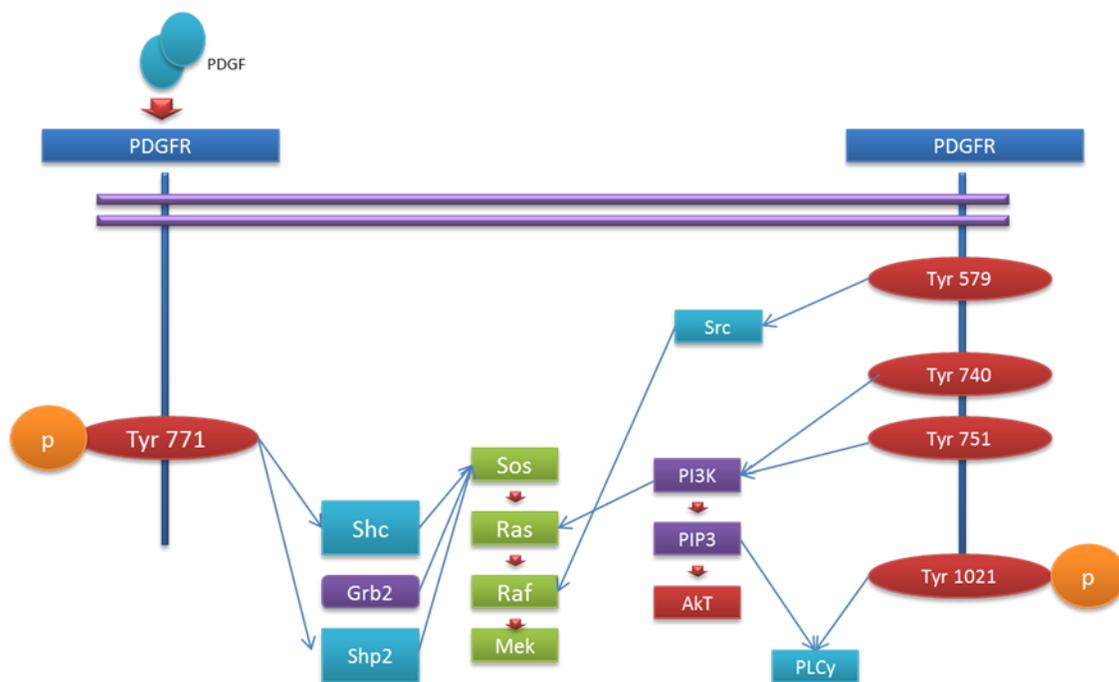


Fig 3; Vías de señalización del PDGFR $\beta$

Debido a que la señalización descontrolada puede tener consecuencias fatales, varios mecanismos permiten limitar la transducción de señal mediante tirosina cinasas: internalización y degradación del complejo ligando – receptor en el endosoma, ubiquitinización de los receptores los receptores activados e inhibición mediante regulación negativa a través de proteínas como las fosfatasas de tirosina (PTP's) y la familia de citocinas supresoras (SOCS).

### ***PDGFR y Cáncer***

En neoplasias mesenquimatosas, como glioblastoma, dermatofibrosarcoma protuberans y neoplasias del estroma gastrointestinal (GIST), se han demostrado alteraciones (mutaciones y sobreexpresión) del PDGFR $\beta$ , que condicionan una señalización autócrina, que favorece la capacidad de crecimiento tumoral e incrementa la supervivencia celular y parácrina, que involucran el desarrollo estromal y vascular. Adicionalmente, el PDGF secretado por células tumorales tiene un comportamiento quimioatrayente y mitógeno para las células mesenquimatosas y tumorales. <sup>[2]</sup>

### ***PDGFR en cáncer de mama***

Existe poca información sobre el PDGFR $\beta$  en cáncer de mama, sin embargo, estudios retrospectivos han demostrando su expresión hasta en el 35% de los tumores estudiados, asociándose con volúmenes tumorales mayores, alto grado histológico, negatividad para receptores hormonales, altos índices de proliferación y coexpresión de HER2, lo que se traduce en un pobre pronóstico <sup>[2][10]</sup>. La información desarrollada en nuestro centro, ha

confirmado la presencia de PDGFR $\beta$  en cultivos primarios de cáncer de mama. Los estudios preliminares mostraron que estas líneas celulares presentan un comportamiento más agresivo y paradójicamente, una mayor sensibilidad a los inhibidores de tirosina cinasa, y el

silenciamiento del receptor PDGFR $\beta$  a través de la inserción de un RNA de interferencia (*shRNA*), condicionó una mayor viabilidad celular con incremento de la resistencia a inhibidores de tirosina cinasa.

### ***Quimiosensibilidad mediada por PDGFR $\beta$***

Estudios previos en distintos tumores sólidos con expresión de PDGFR han sido evaluados en cuestión de quimiosensibilidad con terapia blanco, particularmente el mesilato de Imatinib. Este fármaco fue originalmente desarrollado para inhibir la oncoproteína bcr-abl en la leucemia mieloide crónica. Existe evidencia de la eficacia en la inhibición del crecimiento tanto in vivo como in vitro en tumores de pulmón y colon con Imatinib, el cual, posee un efecto antiangiogénico, que conlleva a apoptosis en células tumorales y endoteliales mediante el bloqueo de de la señalización de PDGFR $\beta$ .<sup>[14]</sup>

Por otro lado, el mesilato de Sunitinib (SU11248) es un inhibidor oral multikinasa que fue aprobado originalmente en el tratamiento de carcinoma renal avanzado, así como en tumores del estroma gastrointestinal resistentes a imatinib. El efecto de inhibición sobre PDGFR  $\alpha$  y  $\beta$  es reversible. Estudios preclínicos han demostrado una fuerte actividad antitumoral, no sólo en la inhibición del crecimiento, sino que presentan regresión de las lesiones en modelos de cáncer de colon, carcinoma pulmonar de células no pequeñas,

melanoma, carcinoma renal y carcinomas de células escamosas, fenómenos asociados directamente con la fosforilación de PDGFR, lo que demuestra de forma indirecta el papel de la inhibición del receptor <sup>[15,16]</sup>.

### ***Justificación:***

Por lo tanto, basándonos en los antecedentes mencionados previamente, consideramos necesario describir de forma específica el papel del receptor del factor derivado de plaquetas beta en las funciones de las células de cáncer de mama, incluyendo además la sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos.

### ***Objetivos***

Objetivo general: demostrar en cultivos primarios de cáncer de mama PDGFR $\beta$ +, la disminución del grado de agresividad celular dependiente de PDGFR $\beta$  silenciando este receptor a través de un RNA de interferencia (*shRNA*).

Objetivos específicos: evaluar y comparar la tasa de proliferación y la capacidad migratoria así como la capacidad tumorigénica, en un modelo murino, de células de cultivos primarios de cáncer de mama PDGFR $\beta$ R+ y PDGFR $\beta$  silenciado. De forma secundaria, se determinó y se comparó la velocidad de crecimiento tumoral, así como los volúmenes y pesos tumorales, en un modelo murino, en diferentes líneas celulares parentales y silenciadas, asimismo, como objetivo secundario, se evaluó la viabilidad celular mediada por PDGFRb, al exponer las líneas celulares parentales y silenciadas a inhibidores de

cinastas (ITK's) (imatinib y sunitinib) así como a la combinación de los ITK's con quimioterapia (Doxorrubicina)

### **Métodos**

**Cultivo celular.** Los cultivos primarios de células de cáncer de mama fueron previamente establecidas en el laboratorio, al igual que las células silenciadas para PDGFR $\beta$ . Las células fueron mantenidas en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina y estreptomicina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Los patrones de expresión de receptores de factores de crecimiento de las siete líneas celulares utilizadas (5 líneas primarias: 2 líneas parentales; MBCDF y MBCD25 y 3 silenciadas MBCDF-cg11, MBCD-hc5, MBCD-hc6) y dos comerciales (T47D, T47Dsh) son:

Línea	PDGFR $\beta$	HER2	-RH
MBCDF	+++	+++	-Neg
MBCDF - cg11	-Silenciado	+++	Neg
MBCD25	+++	+++	-Neg
MBCD-hc5	+++	+++	-Neg
MBCD - hc6	-Silenciado	+++	-Neg
T47D	+++	+	-Neg
T47Dsh	-Silenciado	+	-Neg

Tabla 1. Características de los cultivos primarios utilizados, nótese el mantenimiento de la características inmunofenotípicas a excepción del PDGFR $\beta$

**Inmunoblott:** Las células de cáncer de mama PDGFR $\beta$ + y las silenciadas con el shRNA fueron lisadas en un buffer de lisis que contiene 50mM de HEPES pH 7.4, 250nM NaCl, 5mM de EDTA, 0.1% NP – 40, 10mM NaF, 50mM Beta glicerol – fosfato (B6P), 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e inhibidores de proteasas (1X de complete libre de EDTA). Se determinó la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford (Bio – rad, Hercules, CA, USA). 20  $\mu$ g de proteína total fueron separadas en un gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Posteriormente, se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore). La membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% e PBS-Tween 0.05%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron policlonales de conejo anti-PDGFR $\beta$  (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) anti pPDGFR $\beta$  Y751 (Cell Signling Technology), y el anticuerpo monoclonal anti-  $\beta$  tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) toda la noche a 4 °C. A continuación se incubó con los correspondientes anticuerpos secundarios, los blots fueron revelados mediante el sistema ECL-plus.

**Ensayos de Proliferación.** Para los ensayos de proliferación se sembraron 3,000 células por cm<sup>2</sup> en placas de 24 pozos en RPMI con 10% SFB. Las células fueron fijadas a los días 0, 1, 3, 5 con glutaraldherido al 1.1% en PBS. La placa fue evaluada por técnica de cristal violeta, la prueba se realizó por triplicado. El análisis se realizó mediante prueba “t” de student.

**Pruebas de Migración:** Para las pruebas de migración se cultivaron 8,000 células por cm<sup>2</sup> con medio RPMI con 10% SFB, las células fueron incubadas durante 24 horas. Posteriormente, se realizó una lesión de monocapa con un objeto romo, realizándose un

cambio de medio. La evaluación objetiva se llevó en un microscopio Olympus ZG2144 (Olympus, Japón), documentándose a las horas 0, 12 y 24. El experimento se realizó por triplicado.

Como prueba adicional de migración, las líneas celulares MBCDF y MBCDF-cg11 en una concentración de 20,000 células en 600 $\mu$ L, fueron sembradas en cámaras de Boyden, mantenidas en RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina y estreptomicina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 8 horas. Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% en PBS y se tiñeron con cristal violeta, fueron lavadas y posteriormente evaluadas al microscopio Olympus ZG2144 (Olympus, Japón).

***Análisis de tumorigénesis*** Los estudios en animales fueron realizados bajo el protocolo aprobado por el comité de ética de ensayos en animales del Instituto, con número de aprobación CINVA-13. Las células MBCDF y MBCDF-cg11 ( $1 \times 10^6$  en volumen de 0.1ml) fueron inyectadas en forma subcutánea en el costado de ratones desnudos de 8 semanas de edad. Se realizó evaluación visual, peso y medición de las lesiones tumorales cada 48 horas, finalmente y posterior a la aplicación de eutanasia a los animales, se realizó la resección de la lesión, se llevaron a cabo: medición y peso de los tumores. El análisis de los datos se hizo mediante una prueba “t” de student.

***Análisis de Viabilidad:*** Las líneas de cáncer de mama fueron sembradas en placas de 48 pozos en una concentración de 7,500 células por cm<sup>2</sup> con RPMI con SFB 10%. Se dejaron adherir toda la noche y después fueron adicionadas concentraciones crecientes de

imatinib 1 $\mu$ M, 5mM y 10mM; Sunitinib 0.01mM, .1mM y 1M, y Sorafenib (0.01, 0.1, 0.5). Para sunitinib las células fueron sembradas en RMPI libre de rojo fenol con 0.5% de SFB. Los fármacos se incubaron por 48 h. Para la combinación con Doxorubicina , primero se adicionó el inhibidor de cinasa y después de 1h se agregó 0.1  $\mu$ g/ml de Doxorubicina. Los ensayos se realizaron por triplicado

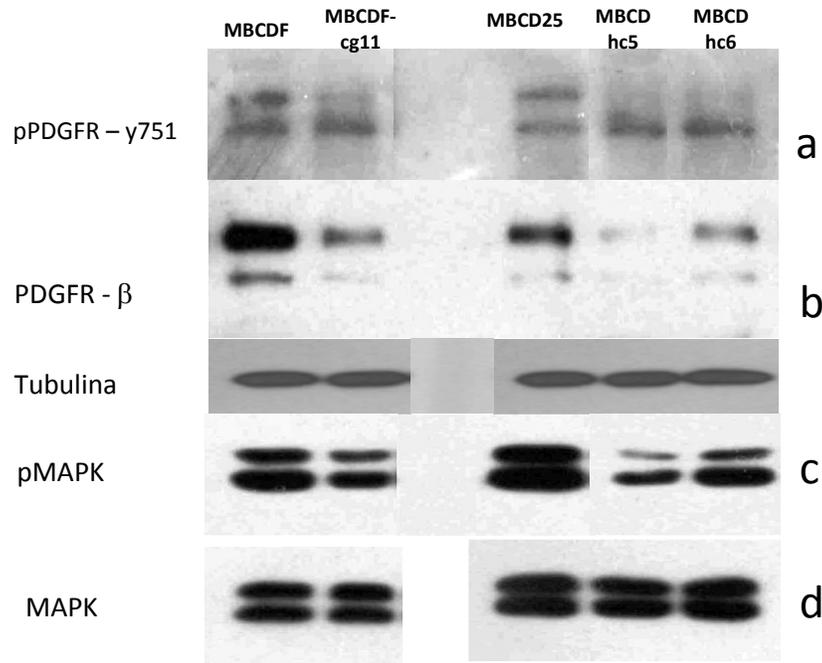
### **Resultados:**

#### ***Silenciamiento de PDGFR $\beta$ en cultivos primarios de cáncer de mama:***

Mediante la realización de WB se determinó la expresión de PDGFR $\beta$  en las líneas parentales (MBCDF y MBCD25), así como el descenso de la expresión del mismo en las líneas silenciadas con shRNA (MBCDF-cg11, MBCD-hc5, MBCD-hc6) (fig 4b).

Posteriormente, se realizó el análisis del estado de activación del receptor evaluando el grado de fosforilación de la tirosina 751 ( $\gamma$ 751). Se observó un descenso en el grado de fosforilación en los cultivos donde el receptor fue silenciado (fig 4 a).

En la evaluación de las vías de señalización de las MAPK's, se observó que no hubo modificación en las totales de las mismas, sin embargo, en la determinación de la porción fosforilada, se observó una disminución secundaria al silenciar el PDGFR $\beta$ , lo que evidencia que el silenciamiento de PDGFR condiciona una disminución en el grado de actividad de las vías de señalización. (fig 4c y 4d).



**Fig 4a** . WB de la forma fosforilada del PDGFR $\beta$  en la  $\gamma$ 751 de las líneas celulares. Se observa una disminución en la fosforilación en las líneas celulares silenciadas (MBCDF-cg11, MBCD-hc5 y MBCD-hc6) **Fig 4b** PDGFR $\beta$  total que muestra el apagamiento en las líneas silenciadas, la porción inferior muestra la expresión de tubulina como control de carga. **Fig4c** porción fosforilada de las MAPK. Se demuestra una disminución de su fosforilación en las líneas celulares silenciadas.. **Fig 4d**, MAPK totales, no se observa diferencias entre líneas celulares parentales y silenciadas.

**Proliferación Celular:** Mediante el ensayo de proliferación se encontró que las líneas con PDGFR $\beta$ + presentaron una tasa superior a las líneas silenciadas, de forma particular, la línea MBCD25 mostró un incremento proliferativo de 1, 2.4, 14.9 y 29.8 veces, mientras que su shRNA, la MBCDhc6, presentó una tasa de 1, 1.4, 2.3 y 19 veces a los días 0, 1, 3 y 5 respectivamente ( $p=0.089$ ).

Por su parte, la línea MBCDF, mostró una tasa proliferativa de 1, 1.7, 12.8 y 43.8 veces, mientras que su parte silenciada, la MBCDF-cg11, presentó una tasa de 1, 1.4, 9.6 y 22.7 veces en los días, 0, 1, 3 y 5 respectivamente ( $p=0.008$ ).

Finalmente, la línea comercial T47D mostró una tasa de 1, 1.5, 4.5 y 84.4 veces, comparativamente con la silenciada, T47sh, en la que se observó una tasa proliferativa de 1, 1.6, 1.9 y 54, en los días 0, 1, 3 y 5 respectivamente ( $p < 0.001$ ) (Fig 5).

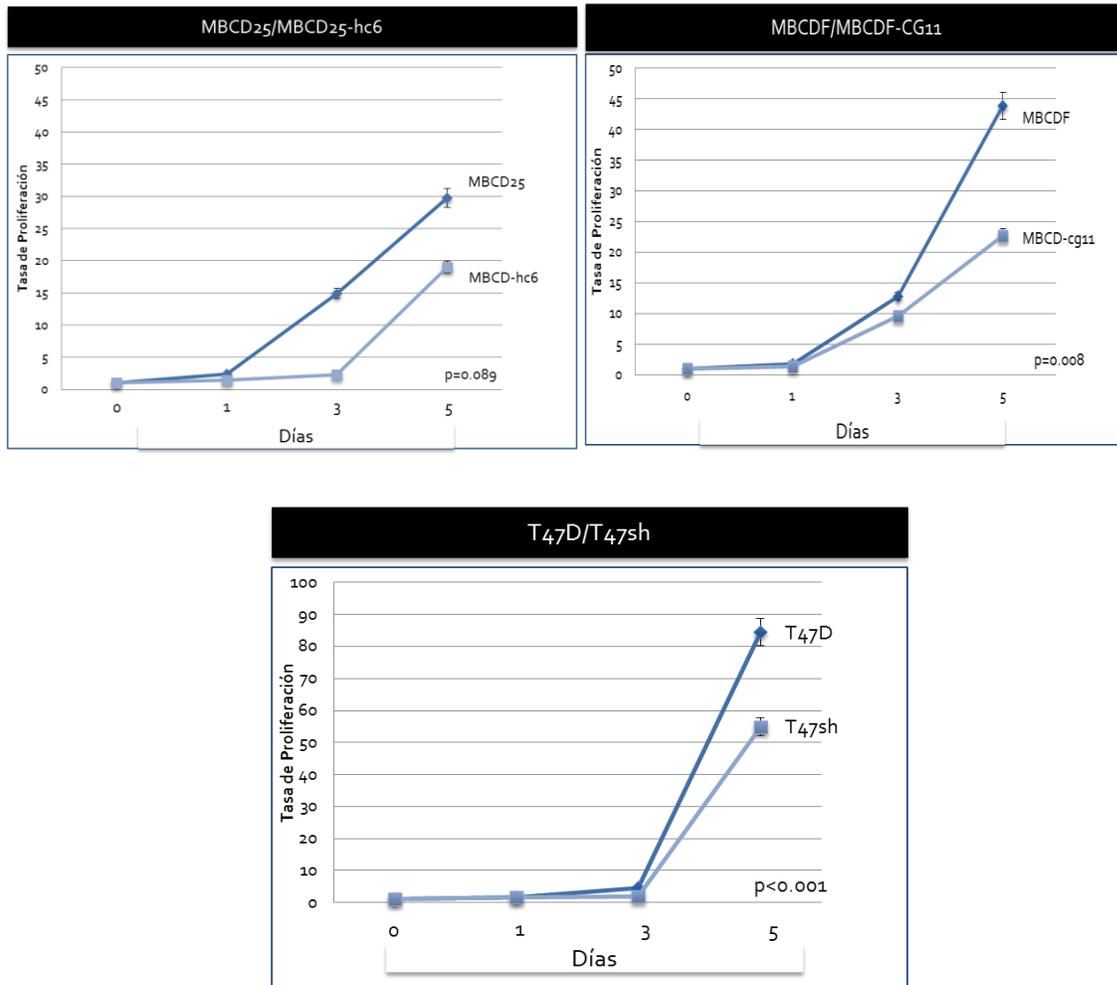
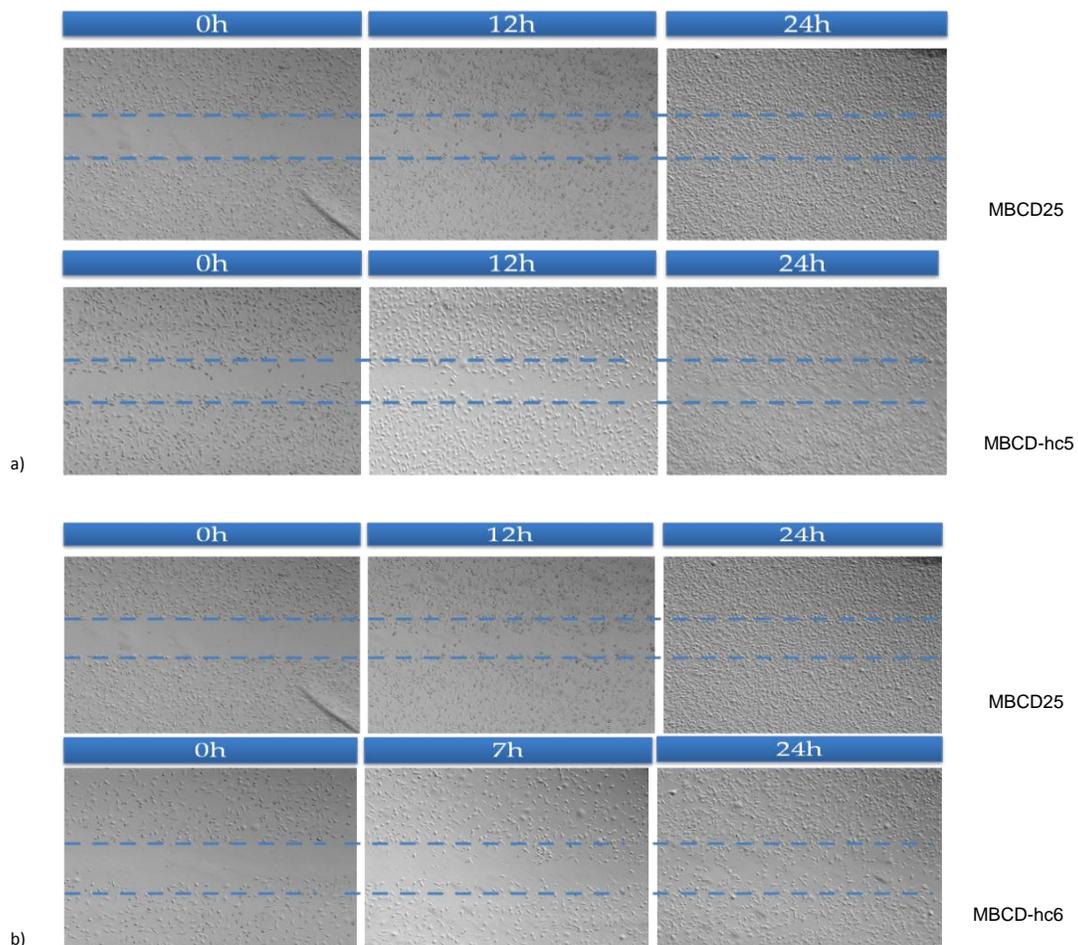


Fig 5. Tasas de proliferación de las líneas parentales en comparación con sus shRNA's, debido a que el resultado expresado en las gráficas es producto de varios experimentos independientes, se expresa como error estándar.

**Motilidad Celular** La motilidad celular evaluada mediante los ensayos de lesión en monocapa demostraron una mayor capacidad migratoria para las líneas MBCDF y MBCD25 en comparación con las líneas silenciadas: MBCDF-cg11 y MBCD-hc6, estas

diferencias fueron notorias desde las 12 horas y el cierre de la herida de la monocapa a las 24 horas fue evidente en el caso de las líneas parentales, no así en las líneas con silenciamiento de PDGFR $\beta$  (fig 6a,b, c).

Como prueba de motilidad adicional, evaluamos a través de ensayo en cámara de Boyden la capacidad migratoria en una membrana semisintética. Posterior a las horas de incubación, se observó un incremento sustancial de la invasión celular a la membrana semisintética por parte de la línea MBCDF en comparación con la línea silenciada MBCDF-cg11, lo cual se documentó de forma visual (Fig 7 a y b).



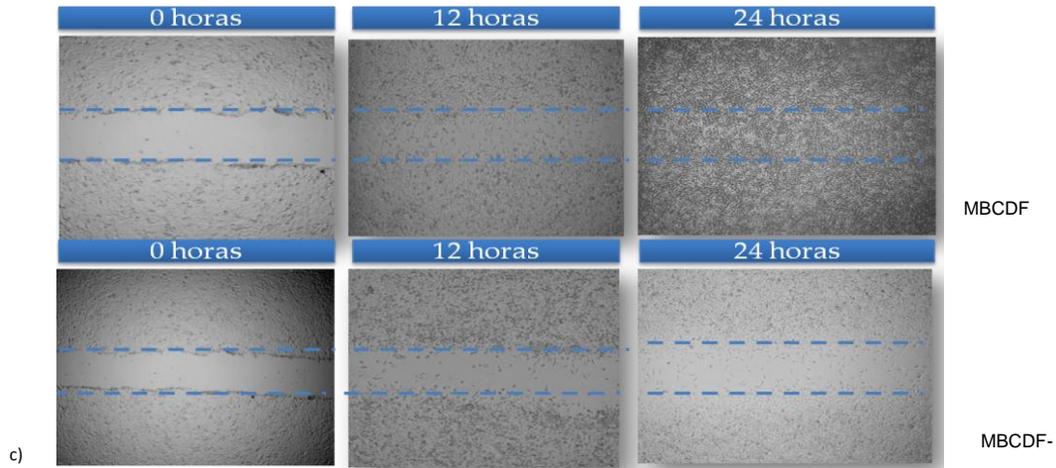


Fig. 6 a) Migración celular en líneas MBCD25/MBCD-hc5, b) Migración celular en líneas MBCD25/MBCD-hc6 y c) Migración celular en líneas MBCDF/MCDF-cg11

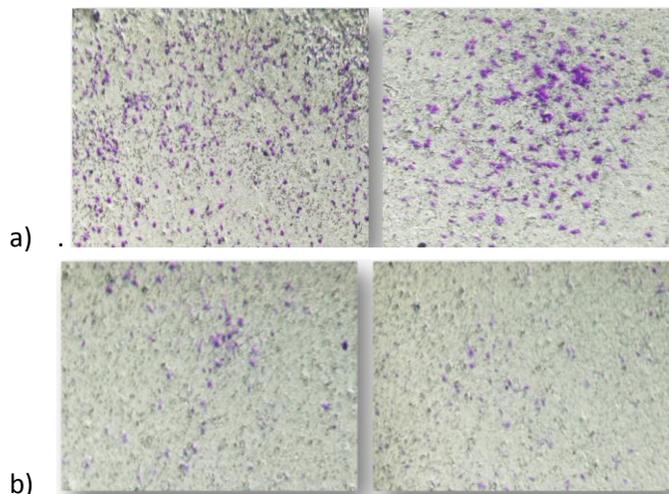
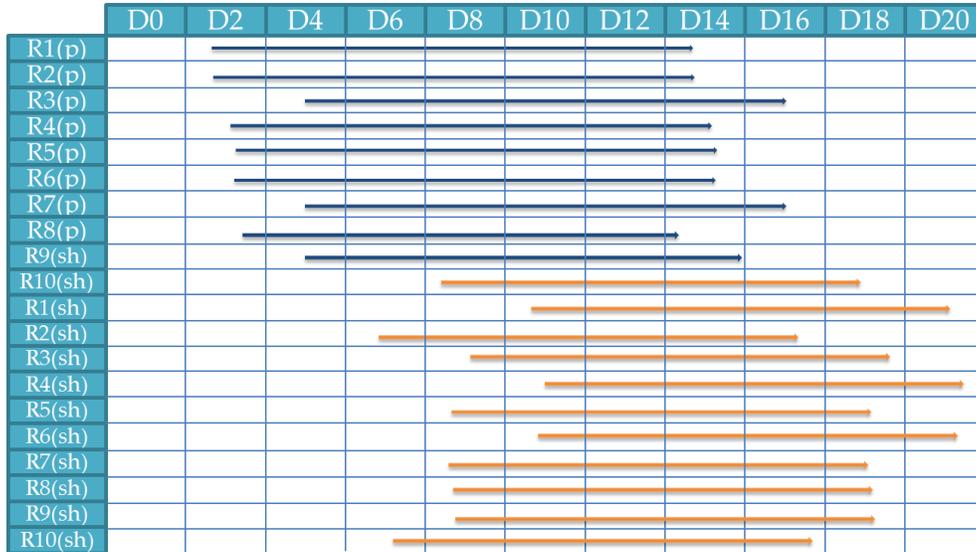


Fig 7. Capacidad migratoria en cámara de Boyden a las 8 horas de las líneas MBCDF/MBCDF-cg11 (a/b respectivamente)

**Capacidad Tumorigénica:** Se determinó la capacidad tumorigénica en el modelo murino, evaluando distintas características de los tumores inducidos experimentalmente. En primer lugar, se documentó el tiempo de desarrollo tumoral. Se observó un tiempo de aparición temprano con las células parentales MBCDF (p) en comparación con la línea celular silenciada MBCDF-cg11 (sh).



**Tabla 2:** Tiempo de aparición tumoral (>2 mm), en días: línea parental MBCDF (líneas azules) y línea silenciada MBCDF-cg11 (líneas anaranjadas)

**Determinación del diámetro mayor tumoral:** La evaluación mostró un incremento del diámetro mayor tumoral superior en la línea parental (MBCDF), en comparación con la línea silenciada (MBCDF-cg11) a lo largo del período de observación. Las diferencias fueron evidentes a partir del tercer día, siendo consistentes al día 7, manteniendo un crecimiento sostenido hasta el día 11. Los tumores desarrollados a partir de la línea MBCDF mostraron una mediana de diámetro mayor de 0.960cm en comparación con la línea MBCDF-cg11, que presentó una mediana de diámetro mayor de .340cm ( $p=0.004$ ) (Fig. 8).

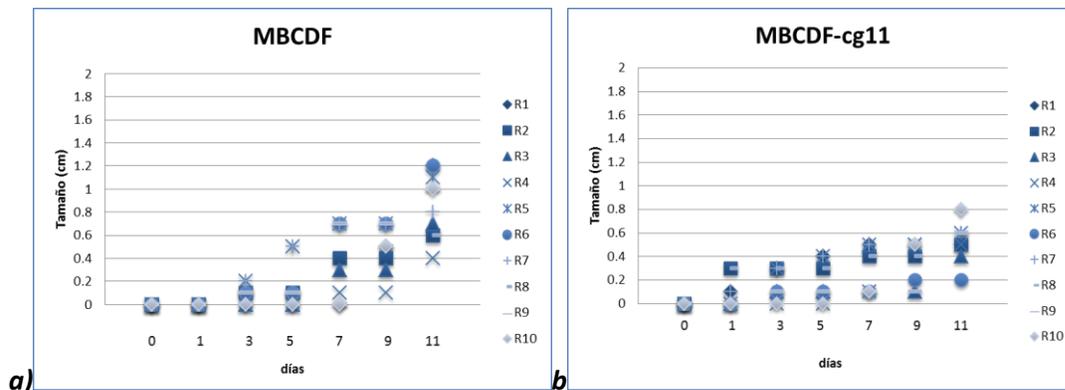


Fig 8. Diferencias de volumen tumoral. La figura a muestra el diámetro mayor tumoral en los ratones inyectados con células de la línea celular MBCDF, mientras que la figura b muestra el diámetro mayor tumoral dependiente de la línea celular MCDF-cg11

**Determinación de volumen post mortem:** posterior a la aplicación de eutanasia, se realizó una evaluación morfológica tumoral en el cadáver y fue realizada la disección y documentación del peso del tumor con el fin de obtener una medición cuantitativa de las neoplasias.

El volumen fue evidentemente superior para los tumores desarrollados a partir de la línea MBCDF en comparación con los de la línea MBCDF-cg11 (Fig 9 a y b).

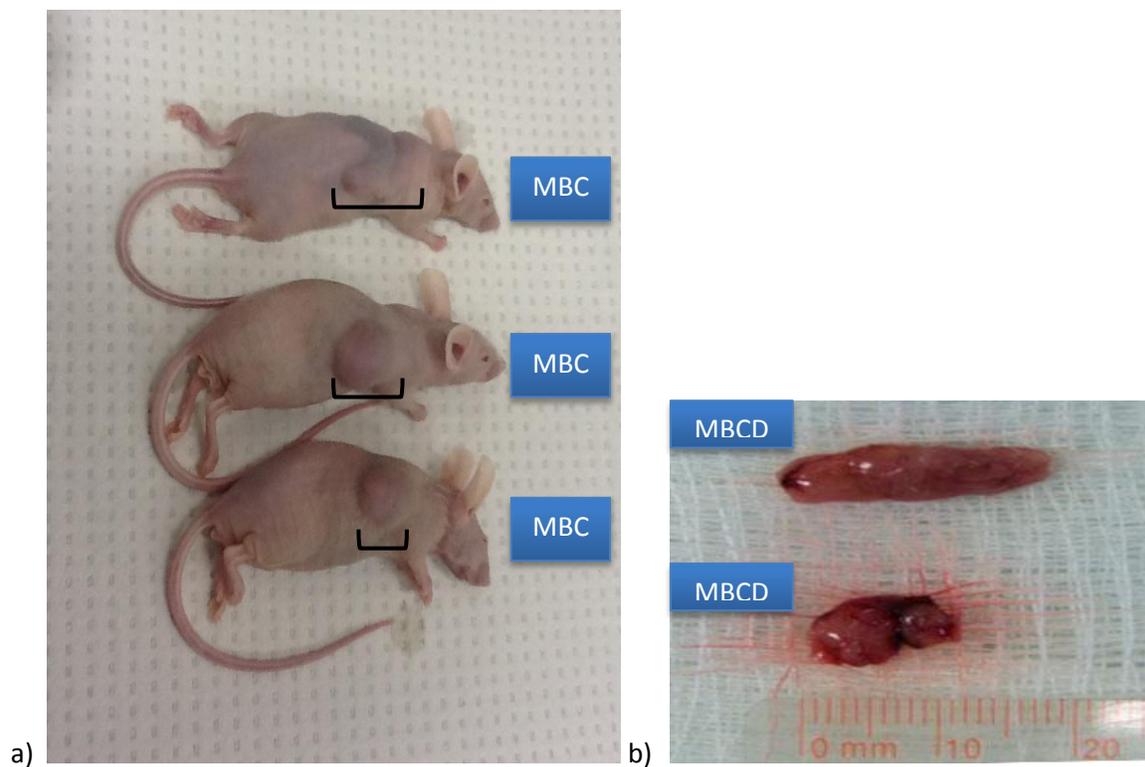


Fig 9: Diferencias de tamaño tumoral en modelos murinos; a) tamaño tumoral previo a la resección, b) tamaño tumoral post resección.

**Pesos Tumorales;** Dentro de la determinación del volumen y tasa de crecimiento objetiva postmortem, posterior a la disección tumoral, se cuantificaron los pesos obteniendo como resultado para la línea MBCDF un promedio de peso de 0.389g (0.199 - 0.597g), mientras que para la línea MBCDF-cg11, se encontró un promedio de 0.107g (0.063 – 0.132) ( $p=0.029$ ) (Fig 10 a y b).

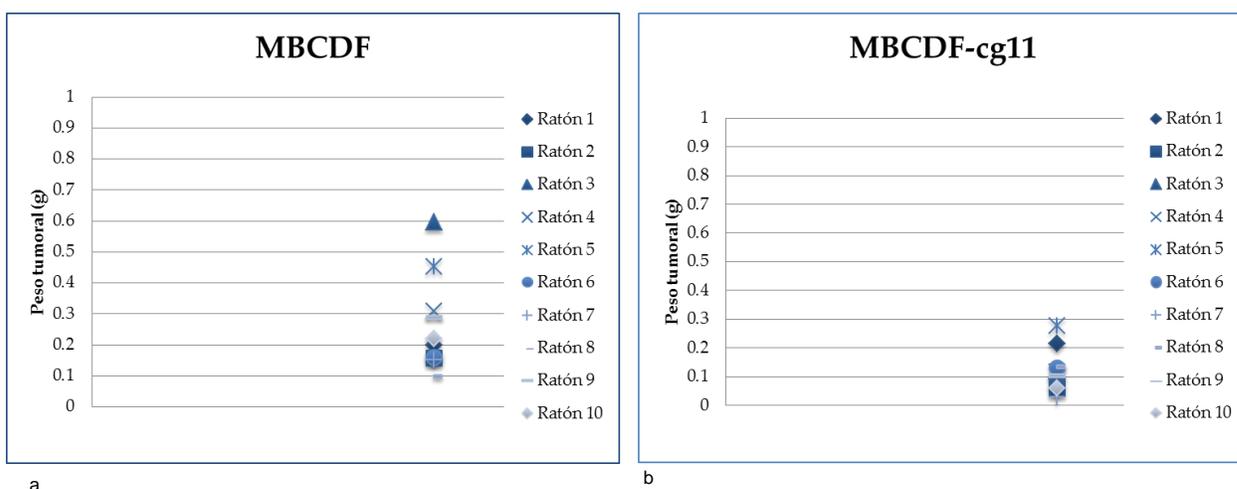


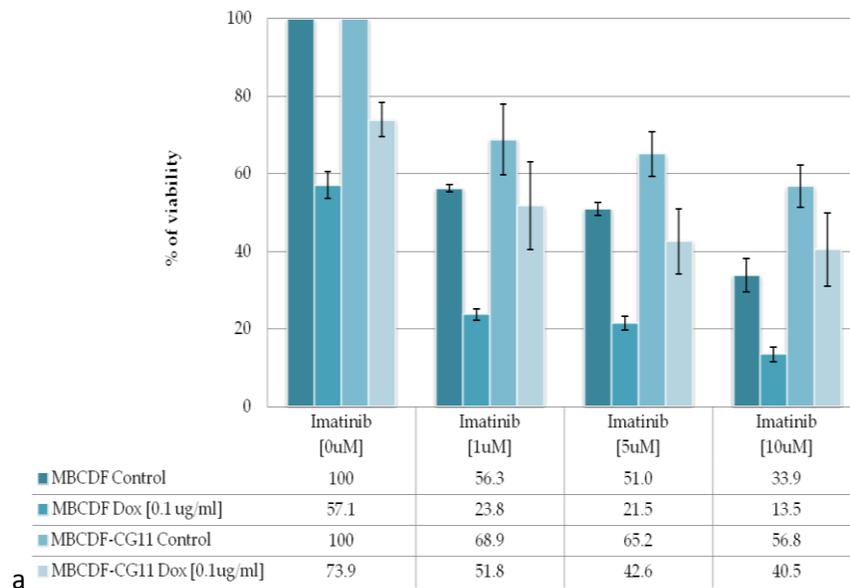
Fig 10: Diferencias de pesos tumorales, a)Peso tumoral en la línea MBCDF b)Peso tumoral de la línea MBCDF - cg11

**Curvas de viabilidad;** posterior a las 48 horas de incubación con inhibidores de cinasas y doxorubicina se documentó un efecto disminución de la viabilidad celular superior en las líneas con expresión de PDGFR en presencia de imatinib desde las concentraciones mínimas. De forma cuantitativa se observó un descenso en la viabilidad del 40.3% vs el 26% a una concentración de 1 $\mu$ M en las líneas MBCDF vs MBCDF-cg11. Igualmente, en la línea MBCD25, observamos un descenso de la viabilidad cuantificado en 36% comparado con la MBCD-hc6, donde el descenso a una concentración de imatinib de 1mM fue de 26%(Fig. 11).

En los ensayos de combinación con doxorubicina, se documentó una quimiosensibilidad en las líneas parentales superior a las líneas con silenciamiento, la línea MBCDF presentó un descenso en la viabilidad del 45% contra el 37% observado por la línea MBCDF-cg11. La línea MBCD25 mostró

un descenso en la viabilidad celular del 43%, en comparación a la línea MBCD25-hc6 donde se documentó un descenso del 38%(Fig.11).

Al realizar la combinación de ambos fármacos, se observó un descenso considerable en la viabilidad de las células con expresión de PDGFR mostrando la combinación Doxorubicina – imatinib a concentración de 1µM mostró un descenso del 77% en la MBCDF, mientras que la línea silenciada (MBCDF-cg11) mostró un descenso del 68%. Igualmente, la línea MBCD25 presentó un descenso de la viabilidad del 72% con la combinación Doxorubicina – Imatinib frente el 61% de la línea MBCD-hc6.



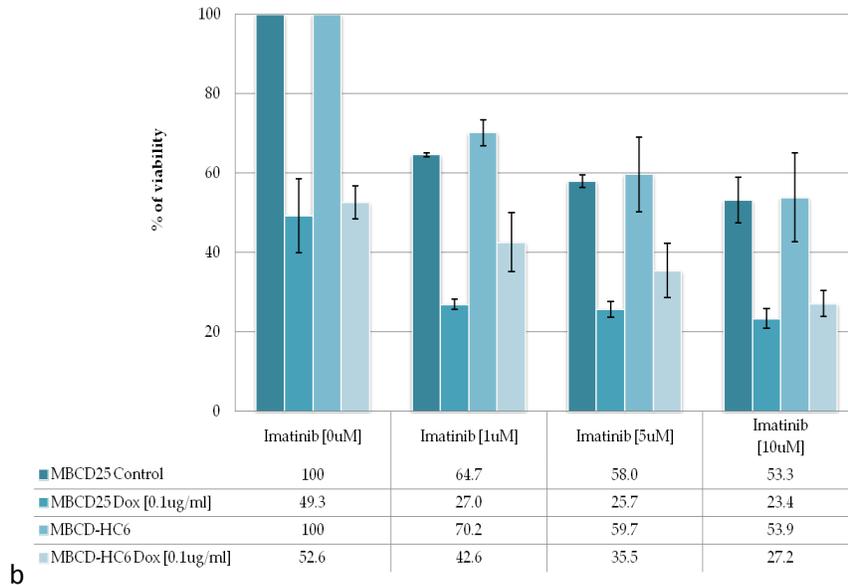


Fig 11 Se evidencia la diferencia de la viabilidad celular en las líneas parentales en comparación con los shRNA, la figura a muestra la diferencia de la línea MBCDF vs MBCDF-cg11, nótese la sensibilidad de la línea frente a doxorubicina y el efecto aditivo que presenta con imatinib. La gráfica B presenta las diferencias de viabilidad celular de la línea MBCD25 frente MBCD-hc6, nótese la misma sensibilidad frente a doxorubicina de la línea parental en relación a la shRNA

Resultados similares fueron observados al exponer los mismos cultivos primarios a Sunitinib , donde la exposición a la concentración mínima del inhibidor de cinasas (0.001 $\mu$ M) dio como consecuencia un descenso del 24% en la viabilidad celular de la línea parental MBCDF, mientras que en la línea con silenciamiento de PDGFR (MBCDF-cg11), el descenso fue únicamente del 13%. Los resultados observados en la línea MBCD25 demuestran un descenso a la exposición de la misma dosis de Sunitinib del 30%, mientras que el silenciamiento del PDGFR de la misma línea (MBCD-hc6) mostró un descenso de apenas el 19.1%(Fig 12).

La exposición de las líneas celulares a Doxorubicina en concentración de 0.1 $\mu$ g/ml confirma lo observado en los ensayos con Imatinib, se confirma una quimiosensibilidad de las líneas parentales (MBCDF/MBCD25) con un descenso del 30 y 38% respectivamente, comparado con el 17 y 33% de las líneas MBCDF-cg11 y MBCD-hc6 respectivamente. La combinación de ambos fármacos demostró una tasa de inhibición superior para las líneas parentales, con un descenso del

49.5% y 61.6% para las líneas MBCDF y MBCD25 respectivamente, frente al 33 y 50% de las líneas MBCDF-cg11 y MBCD-hc6 respectivamente (Fig. 12).

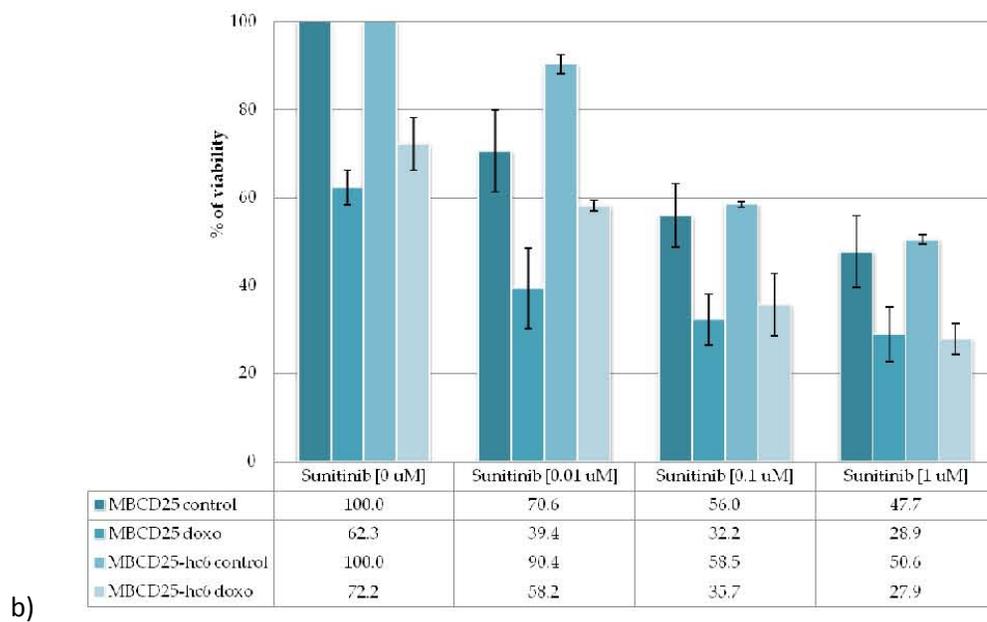
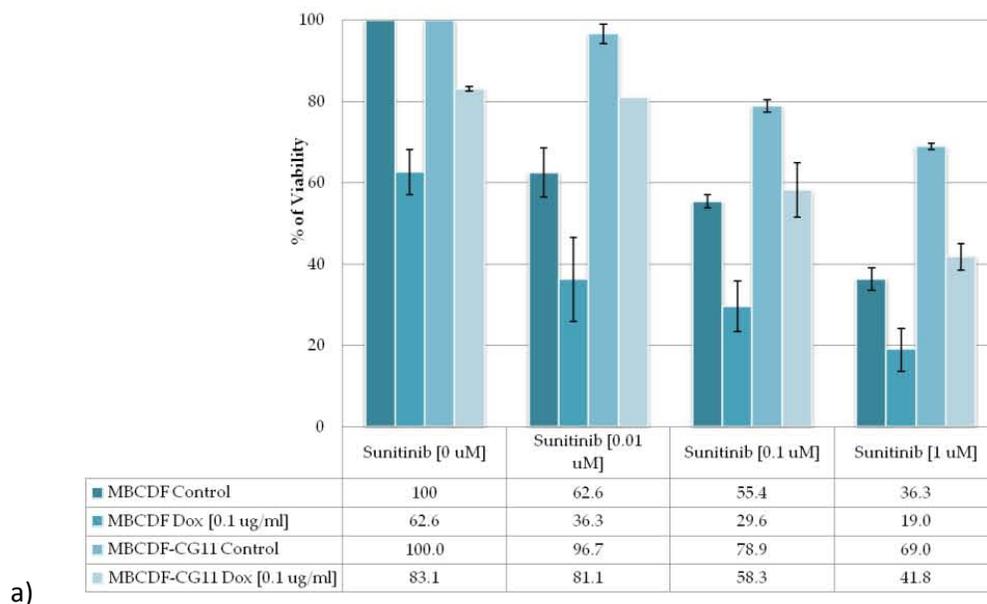


Fig. 12. Evidencia de la sensibilidad a doxorubicina en líneas con expresión de PDGFR frente a las líneas con silenciamiento del mismo, se observa igualmente un efecto sensibilizador con Sunitinib, la gráfica a corresponde a la comparación de las líneas MBCDF y MBCDF-cg11, mientras que la gráfica b muestra la comparación entre las líneas MBCD25 y MBCD-hc6

### ***Discusión:***

La historia del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) se asoció inicialmente al desarrollo de tejido muscular a nivel vascular. Sin embargo, los avances en el estudio de la biología molecular, particularmente en lo que se refiere a neoplasias malignas, ha dejado al descubierto este receptor como un elemento importante de conocer, entender y con un probable papel en la carcinogénesis.

La información publicada, demuestra que la presencia de PDGFR en tejido tumoral condiciona un comportamiento agresivo que se traduce en un peor pronóstico, sin embargo, esta evidencia parte de tumores no mamarios, particularmente de origen mesenquimatoso.

Los experimentos previamente realizados por nuestro grupo, demostraron la presencia de PDGFR $\beta$  en tumores mamarios, correlacionado con un comportamiento tumoral agresivo, sin embargo los estudios fueron comparados contra clonas células con diferentes fenotipos, quedando en duda si la biología tumoral descrita estaba asociada con este receptor. También nuestro grupo demostró que el silenciamiento del PDGFR $\beta$  mediante el uso de un shRNA, permite mantener las características generales de la célula exceptuando únicamente al receptor en cuestión, por lo que la evaluación del comportamiento asociado a este receptor es inmejorable.

La realización de este proyecto responde al esfuerzo de tres años de trabajo sobre cultivos primarios de cáncer de mama, con la conformación de nuevas clonas estables a partir de los mismos, con lo que fue posible la caracterización del comportamiento de estas líneas

celulares con expresión de PDGFR $\beta$  y aquellas con el receptor silenciado: migración celular, tasa de proliferación, capacidad de invasividad y capacidad tumorigénica, entendida esta última como el comportamiento en un organismo vivo, bajo condiciones no controladas.

Se demostró mediante evaluación por inmuno – blott, de las células parentales y las silenciadas mediante el shRNA, una diferencia marcada en el grado de actividad del receptor (PDGFR $\beta$ ), con un descenso en la expresión del mismo en las células silenciadas y un consecuente descenso en el grado de actividad de las MAPK's mediante la evaluación de la porción fosforilada, evidenciado al PDGFR $\beta$  como un mediador de las funciones biológicas tumorales.

Las tasas proliferativas, mostraron que las células con PDGFR $\beta$  tienen una velocidad de crecimiento mayor, casi duplicada, en relación con aquellas con silenciamiento de este receptor.

De llamar la atención es la capacidad migratoria asociada con este receptor. Así se observó una resolución de la herida de la monocapa a las 24 horas, precedida por la evidente migración celular sobre la misma en las horas previas, fenómeno no documentado en las líneas celulares en las que se silenció el receptor.

Por último, el modelo murino, demostró que las observaciones in vitro se reprodujeron in vivo, con un tiempo de aparición tumoral precoz, una velocidad de crecimiento tumoral y lesiones de volumen superior en presencia de PDGFR $\beta$ .

En conjunto, esta evidencia relaciona directamente lo presentado por Paulsson y colaboradores, así como Coltrera y colaboradores<sup>[2][10]</sup>, donde, mediante mediciones en piezas patológicas de cáncer de mama en mujeres mostraron mayores volúmenes y alto grado histológico, sin embargo, este grupo de investigadores refiere la presencia de PDGFR $\beta$  como un hallazgo y la información de la biología tumoral es extrapolada de la expresión del receptor en otros tumores, particularmente, mesenquimatosos, por lo que no se logra demostrar el papel del mismo. Por lo tanto, la información que arroja esta investigación muestra al receptor como un factor pronóstico independiente y relevante en los tumores malignos de glándula mamaria.

En cuanto a las sensibilidad a terapia blanco, se confirma lo desarrollado en estudios previos de nuestro grupo, es evidente la sensibilidad de las líneas con expresión de PDGFR $\beta$  a la exposición con terapia blanco. Sin embargo, el trabajo actual demuestra una mayor sensibilidad a la quimioterapia, específicamente a Doxorubicina mediada por PDGFR $\beta$ . La información encontrada en nuestra investigación coincide con los datos mostrados por el grupo de Weigel y colaboradores, donde se documentó un efecto aditivo de la combinación de imatinib a doxorubicina en líneas comerciales de cáncer de mama<sup>[11]</sup>, sin embargo, el estudio no demuestra el grado de participación del PDGFR $\beta$  en estos fenómenos, únicamente logran identificar un descenso en el grado de expresión del receptor al exponer la línea celular a terapia blanco, situación que deja en duda el papel puro del receptor. A diferencia de los trabajos publicados, hemos podido cuantificar de forma objetiva el porcentaje de participación en la viabilidad celular del receptor, con el grado de descenso de la viabilidad celular dependiente del mismo.

El papel del sunitinib no contradice lo demostrado en los experimentos con imatinib, la evidencia demostrada en los trabajos de Abrams y Murray<sup>[12, 13]</sup>, sugieren un papel aditivo de la terapia blanco, sunitinib en combinación con quimioterapia, particularmente taxanos. A diferencia de la información presentada, nuevamente, estos autores no establecen la inhibición del PDGFR- $\beta$  como punto de partida en la disminución de la viabilidad celular. A diferencia de la información publicada, el efecto del Sunitinib sobre líneas celulares PDGFR $\beta$  positivo condiciona un descenso de la viabilidad celular mayor en relación a las líneas silenciadas, igualmente, se encuentra un efecto aditivo con doxorubicina mediado por el receptor.

***Conclusión:***

El receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGFR $\beta$ ) en cultivos primarios de cáncer de mama incrementa la tasa de proliferación, la capacidad migratoria, y la tumorigénesis. Incrementa la tasa de crecimiento tumoral, acorta el tiempo de aparición de los tumores e incrementa también los diámetros y pesos tumorales en un modelo murino. La viabilidad celular al exponer líneas celulares a inhibidores de cinasas disminuye en líneas parentales, observando una resistencia en las líneas silenciadas. La viabilidad celular con doxorubicina es menor en líneas parentales y condiciona un efecto aditivo en combinación con ITK's.

Esto plantea la posibilidad que el PDGFR $\beta$  pueda ser considerado en un futuro como un factor pronóstico independiente y blanco terapéutico en cáncer de mama.

## **Bibliografía**

- 1.- Siegel R, Naishadham D, Jemal A Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2012;62(1):10.
- 2.- Paulsson J, Sjöblom T, Micke P, Pontén F, Landberg G, Heldin CH, Bergh J, Brennan DJ, Jirström K, Ostman A. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor beta-receptor expression in human breast cancer. Am J Pathol 2009,175:334–341
- 3.- Fredriksson L, Li H, Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms Cytokine Growth Factor Rev. 2004 Aug;15(4):197-204
- 4.- Stiles, C. D. (1983) The molecular biology of platelet-derived growth factor. Cell 33, 653-655.
- 5.- Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J. and Aaronson, S. (1989) Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. Science 243, 800-804.
- 6.- Heidaran, M. A., Beeler, J. F., Yu, J. C., Ishibashi, T., LaRochelle, W. J., Pierce, J. H. and Aaronson, S. A. (1993) Differences in substrate specificities of alpha and beta platelet-

derived growth factor (PDGF) receptors. Correlation with their ability to mediate PDGF transforming functions. *J. Biol. Chem.* 268, 9287-9295.

7.- de la Vara-Salazar E, Suárez-López L, Angeles-Llerenas A, Torres-Mejía G, Lazcano-Ponce E. Breast cancer mortality trends in Mexico, 1980-2009 *Salud Publica Mex* 2011;53:385-393

8.- A.V. Jones (2004); Oncogenic derivatives of platelet – derived growth factor receptors CMLS, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 2912 - 2923

9.- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5287.

10.- Marc D. Coltrera , Jian Wang, Peggy L. Porter, and Allen M. Gown Expression of Platelet-derived Growth Factor B-Chain and the Platelet-derived Growth Factor Receptor  $\beta$  Subunit in Human Breast Tissue and Breast Carcinoma. *CANCER RESEARCH* (55). 27113-2708. 1995

11.- Marion T Weigel, Linda Dahmke, Christian Schem, Dirk O Bauerschlag, Katrin Weber, Peter Niehoff, Maret Bauer, Alexander Strauss, Walter Jonat, Nicolai Maass, Christoph Mundhenke. In vitro effects of imatinib mesylate on radiosensitivity and chemosensitivity of breast cancer cells. *BMC Cancer* 2010, 10:412

12.- Abrams TJ, Murray LJ, Pesenti E, et al: Preclinical evaluation of the tyrosine kinase inhibitor SU11248 as a single agent and in combination with “standard of care” therapeutic agents for the treatment of breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2:1011-1021, 2003

13.- Murray LJ, Abrams TJ, Long KR, et al: SU11248 inhibits tumor growth and CSF-1R dependent osteolysis in an experimental breast cancer bone metastasis model. *Clin Exp Metastasis* 20:757-766, 2003

14.- A.V. Jones (2004); Oncogenic derivatives of platelet – derived growth factor receptors CMLs, *Cell. Mol. Life Sci.* 61 2912 - 2923

15.- Fratto ME, Imperatori M, Vincenzi B, Tomao F, Santini D, Tonini G. New perspectives: role of sunitinib in breast cancer. *Clin Ter.* 2010;161(5):475-82.

16.- Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol.* 2007 Mar 1;25(7):884-96.