



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRÁN"**

**"PATRÓN DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y  
MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA EN SUBPOBLACIONES  
DERIVADAS DE UN TUMOR PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA, Y SU RELACIÓN CON  
DIVERSAS FUNCIONES BIOLÓGICAS Y RESPUESTA A FÁRMACOS"**

**TESIS DE POSGRADO  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN ONCOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA**

**PIER ANYELO RAMOS ELIAS**

**TUTOR**

**DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ**

**CO-TUTORES**

**DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ  
DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ**



México, D.F.

NOVIEMBRE, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



Facultad de Medicina



INSTITUTO NACIONAL DE  
CIENCIAS MÉDICAS  
Y NUTRICIÓN  
SALVADOR ZUBIRÁN

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN**

**AUTORIZACIÓN DE TESIS:  
PATRÓN DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y  
MARCADORES DE TRANSICIÓN EPITELIO MESÉNQUIMA EN SUBPOBLACIONES  
DERIVADAS DE UN TUMOR PRIMARIO DE CÁNCER DE MAMA, Y SU RELACIÓN CON  
DIVERSAS FUNCIONES BIOLÓGICAS Y RESPUESTA A FÁRMACOS**

---

**DRA. MARÍA DE JESÚS IBARRA SÁNCHEZ**  
Investigadora En Ciencias Médicas  
Tutora De Tesis

Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

---

**DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ**  
Profesor Titular Del Curso De Especialización En Oncología Médica  
Co-Tutor De Tesis  
Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

---

**DR. JOSÉ ESPARZA LÓPEZ**  
Investigador En Ciencias Médicas  
Co-Tutor De Tesis  
Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

---

**DR. SERGIO PONCE DE LEÓN ROSALES**  
Director De Enseñanza  
Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán

## **Dedicatoria**

A tu paciencia y comprensión, preferiste sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con mi sueño. Por tu bondad y sacrificio me has inspirado a ser mejor. Ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de vos.

Gracias por estar siempre a mi lado, Patty.

## **Agradecimientos**

Al finalizar un trabajo arduo y lleno de dificultades, es inevitable que surja un humano egocentrismo que te lleva a concentrar gran parte del mérito en el aporte has hecho. Sin embargo, la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

A Dios y mis padres, mis ejemplos, y a quienes debo todo lo que soy y puedo llegar a ser.

A mi amada esposa Sandra Patricia, por ser mi apoyo incondicional en todo momento y ser parte de cada uno de los sueños de mi vida.

Al Ingeniero José Luis Rivera, José Luis hijo, Patty, Nancy y Connie por ser parte de mi familia y apoyarme en todo momento.

A todos los médicos adscritos al Departamento de Oncología Médica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en especial al Dr. Eucario León, nuestros guías en el proceso de formación en oncología médica.

A todos los amigos que conocí durante mi estancia en México, sin excluir a ninguno, pero en especial Andrea, Enrique, Paco, Paola, Maite y Julio.

A Mary y Pepe, más que tutores, amigos que me han orientado en todo el desarrollo de esta tesis.

A los Dres. Issam Aziz y César Hernández, amigos que han sido un apoyo durante mi formación.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” por la oportunidad de formarme en tan prestigiosa Institución.

A la Dirección de Intercambio Académico de la Secretaría de Relaciones Exteriores de México por el apoyo para alcanzar esta meta.

## Índice

1. Introducción	7
2. Planteamiento del problema	11
3. Justificación	11
4. Hipótesis	12
4.1 Hipótesis nula	12
4.2 Hipótesis alternativa	12
5. Objetivos	12
5.1 General	12
5.2 Específicos	12
6. Material y métodos	13
6.1 Reactivos	13
6.2 Cultivo de líneas celulares	13
6.3 Obtención de subpoblaciones de cultivo primario MBCDF por el método de dilución limitante	13
6.4 Ensayo de inmunoblot (Western blot)	14
6.5 Ensayos de proliferación celular	14
6.6 Ensayos de migración celular	14
6.7 Ensayos de citotoxicidad	15
6.8 Formación de colonias en agar suave	15
6.9 Método estadístico	16
7. Resultados	17
7.1 Caracterización de subpoblaciones según apariencia morfológica y fenotipo	17
7.1.1 Obtención de subpoblaciones de tumor primario de mama	17
7.1.2 Expresión de receptores de factores de crecimiento y PTP1B	18
7.1.3 Expresión de receptores para estrógenos y progesterona	18
7.1.4 Expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima	20
7.1.5 Fenotipos celulares obtenidos	20
7.2 Funciones biológicas y respuesta a fármacos	21
7.2.1 Funciones biológicas	21
7.2.1.1 Proliferación celular de los grupos fenotípicos 1A, 1B y 2	21
7.2.1.2 Migración celular de los grupos fenotípicos 1A, 1B y 2	22
7.2.1.3 Tumorigenicidad de los grupos fenotípicos 1A, 1B y 2	24
7.2.2 Ensayos de viabilidad celular ante concentraciones farmacológicas crecientes	24
7.2.2.1 Viabilidad celular ante concentraciones crecientes de doxorubicina, lapatinib, crizotinib y capecitabina	25
7.2.2.2 Expresión de PDGFR y aumento en la susceptibilidad al imatinib	26
7.2.2.3 Viabilidad celular ante concentraciones crecientes de paclitaxel	27
8. Discusión y conclusiones	28
9. Bibliografía	32

## Abreviaturas

<b>RFC</b>	Receptores de factores de crecimiento
<b>TEM</b>	Transición epitelio – mesénquima
<b>TME</b>	Transición mesénquima – epitelial
<b>RE</b>	Receptor de estrógenos
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>HER</b>	Del inglés “Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano”
<b>MET</b>	También llamado HGFR del inglés “Receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos”
<b>VEGFR</b>	Del inglés “Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular”
<b>PTP1B</b>	Del inglés “Proteína fosfatasa de tirosina 1B”
<b>IGF-1R</b>	Del inglés “Receptor de crecimiento insulínico tipo 1”
<b>PDGFR</b>	Del inglés “Receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas”
<b>HGF</b>	Del inglés “Factor de crecimiento de los hepatocitos”
<b>PI3K</b>	Del inglés “Fosfatidilinositol 3 cinasa”
<b>MAPK</b>	Del inglés “Cinasas activadas por mitógenos”
<b>TGF <math>\beta</math></b>	Del inglés “Factor transformador del crecimiento beta”
<b>PDGF</b>	Del inglés “Factor de crecimiento derivado de las plaquetas”

## 1. Introducción

El cáncer de mama es la neoplasia más frecuente en el género femenino, habiéndose reportado para el año 2008, 1.38 millones de nuevos casos a nivel mundial que corresponde al 22.9% del total de neoplasias reportadas y 458,000 muertes (10.9% de las muertes por cáncer), que lo ubica como la segunda causa de mortalidad por cáncer en el género femenino <sup>1</sup>. En México, se ha observado un aumento tanto en la incidencia como en la mortalidad de esta enfermedad durante las últimas décadas, superando al cáncer cérvico uterino como la principal causa de muerte por neoplasias malignas entre las mujeres <sup>2</sup> (figura 1). En las últimas décadas, los avances en el estudio de esta enfermedad han permitido la caracterización de marcadores que permiten dividir a las pacientes en cuatro grupos terapéuticos principales (tabla 1), basados en patrones de expresión de marcadores moleculares <sup>3-5</sup>, lo cual demuestra una “heterogeneidad intertumoral”, que se ha asociado además al pronóstico <sup>5</sup>.

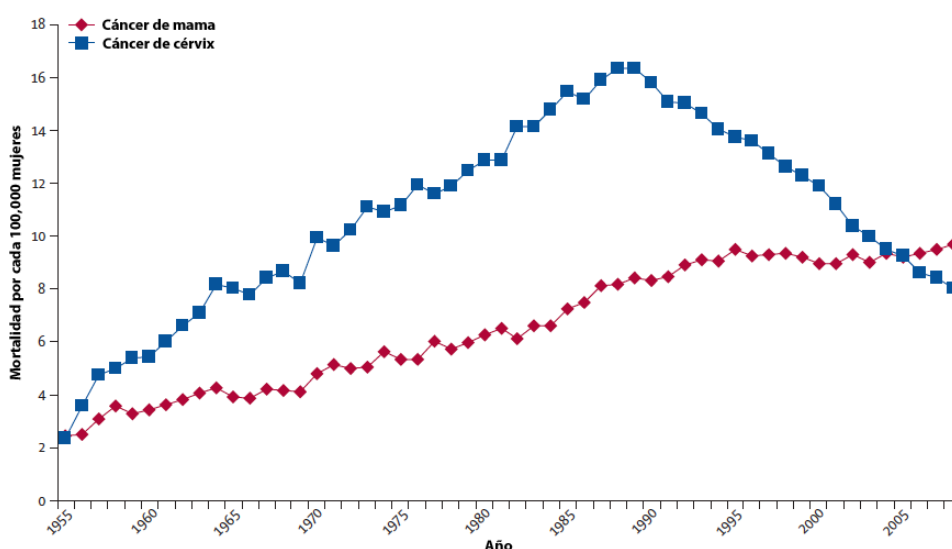


Figura 1. Mortalidad ajustada por edad por cáncer de mama y cáncer cérvico uterino en México 1955 – 2008. (Fuente: Lancet Oncol 2012 ; 13 : 335–43)

Tabla 1		
Subtipo	Características	
Luminal A	<i>Todas las siguientes:</i> RE y RP +, Her 2 –, Ki 67 bajo	
Luminal B	<i>Her 2 -:</i> RE +, Her 2 – <i>Al menos una de las siguientes:</i> RP - o bajo, Ki 67 alto	<i>Her 2 + (luminal):</i> RE +, Her 2 sobre expresado o amplificado, cualquier Ki 67, cualquier RP
Her 2 + no luminal	Sobre expresión o amplificación de Her 2, RE y RP -	
Basaloide	Ductal triple negativo: Her 2 –, RE y RP -.	

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama según el último consenso de St. Gallen, los cuales clínicamente son útiles en la valoración y decisión terapéutica. (Fuente: Annals of Oncology 24: 2206–2223, 2013)



Además de la heterogeneidad antes mencionada, desde mediados del siglo pasado se han observado variaciones intratumorales morfológicas relevantes en el pronóstico de las pacientes, lo cual ha llevado a la estratificación según el grado de diferenciación histológica de las neoplasias malignas de la mama <sup>6</sup>. Recientemente, esta “heterogeneidad intratumoral” ha sido mejor demostrada en estudios realizados en tumores de mama y riñón, en los que al momento del diagnóstico se observan diversas subclonas (tanto en del tumor primario como en las metástasis) producto de múltiples mutaciones somáticas que han evolucionado a través del tiempo <sup>7-10</sup>. Recientemente Snuderl y colaboradores identificaron la amplificación de diferentes receptores de factores de crecimiento (RFC) que tienen actividad de cinasas de tirosina dentro de un mismo tumor, los cuales de forma interesante eran expresados de forma mutuamente excluyente entre diferentes células pertenecientes a un glioblastoma multiforme <sup>11</sup>. Esto plantea interrogantes sobre el abordaje diagnóstico y terapéutico de la mayoría de los tumores sólidos, ya que gran parte de la decisión terapéutica está basada en la toma de una biopsia que podría no ser representativa de todas las subpoblaciones celulares existentes dentro del tumor, lo cual cobra aún más relevancia en el contexto metastásico. Otra causa importante de heterogeneidad intratumoral es la transición epitelio–mesénquima (TEM), que es un proceso reversible por el cual las células neoplásicas pierden sus características epiteliales (perdida de expresión de E-cadherina) y las sustituyen por un fenotipo mesenquimatoso (expresión de vimentina entre otros). La TEM es un proceso dinámico, por lo que en un momento dado podemos encontrar subpoblaciones celulares en distintas fases del mismo <sup>12-14</sup>, lo cual cobra relevancia clínica, dado que la TEM está relacionada con la capacidad de invasividad, resistencia a fármacos y diseminación metastásica (figura 2). Esto se corrobora con el hallazgo de que estas características fenotípicas se han encontrado en células tumorales circulantes en todas las etapas clínicas de la enfermedad y también se ha demostrado que posterior a tratamientos con quimioterapia u hormonoterapia, se encuentran subpoblaciones con características mesenquimatosas e iniciadoras de tumor (fenotipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-/bajo</sup>) en el tumor residual, lo que sugiere resistencia al tratamiento indicado <sup>15,16</sup>.

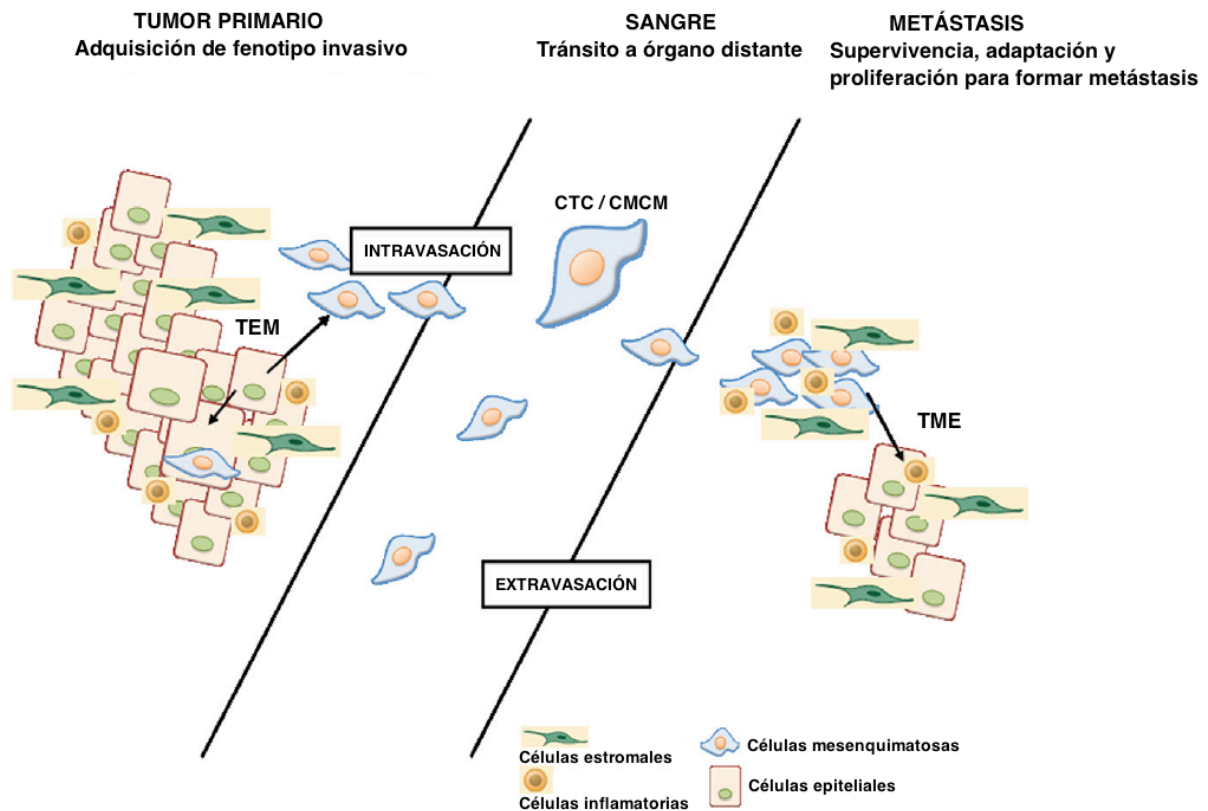


Figura 2. TEM como fuente de heterogeneidad tumoral e importancia en el proceso metastásico. TME: transición mesénquima – epitelial. (Fuente: Cancer Treatment Reviews 38 (2012) 689–697)

Actualmente, gran parte de la información obtenida para el estudio del cáncer de mama se deriva de la utilización de líneas celulares establecidas que proceden de lesiones metastásicas tales como derrames pleurales o ascíticos. A diferencia de las células obtenidas de tumores primarios, las líneas celulares comerciales son en general homogéneas, y su uso como modelos de experimentación tiene el inconveniente de no haber sido parte del microambiente tumoral y las importantes interacciones que ahí se desarrollan<sup>17,18</sup>. En un estudio reciente, se realizó una caracterización fenotípica y molecular de un amplio panel de líneas celulares establecidas y se demostró que gran parte de los tumores mamarios pueden ser representados por las mismas. Interesantemente, ninguna de las líneas celulares estudiadas asemeja el comportamiento biológico de los tumores de mama luminal A que tienen el mejor pronóstico clínico, siendo de nuevo una de las posibles explicaciones, el origen de las mismas (MCF7 y T47D provienen de derrame pleural, mientras ZR75-1 de ascitis), además de que históricamente el porcentaje de éxito para establecer una línea celular con receptores de estrógeno positivos es < 10%<sup>19,20</sup>. En este trabajo de las 65 líneas celulares estudiadas el 66% eran receptores de estrógeno negativos lo cual claramente no es representativo de la incidencia de tumores con fenotipo luminal A en las pacientes con cáncer de mama, que clínicamente es el subtipo histológico más frecuente<sup>18,21,22</sup>.

Hoy sabemos que no todas las pacientes se benefician de las mismas modalidades terapéuticas, lo cual se basa sobre todo en el estudio de la heterogeneidad intertumoral; sin embargo, se desconoce el papel de la heterogeneidad intratumoral y sus implicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Nosotros hipotetizamos que diversas subpoblaciones celulares tienen una diferente expresión de receptores hormonales y de factores de crecimiento, lo cual se traduce en distinta capacidad de migración y proliferación celular. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es caracterizar distintas subpoblaciones de células obtenidas de un cultivo primario de un tumor mamario y determinar la expresión de los receptores hormonales de estrógenos y progesterona (RE y RP), marcadores de transición epitelio-mesénquima (Vimentina y pérdida de E-cadherina) y RFC (PDGFR, VEGFR, Her 1, Her 2, Her 3, Her 4, cMET, PTP1B, IGF-1R) y su relación con la proliferación, capacidad de migración, tumorigenicidad y respuesta a diversos fármacos. Los resultados muestran que existe co-expresión de múltiples RFC los cuales se presentaron en un patrón mutuamente excluyente dentro de las subpoblaciones estudiadas. Asimismo, observamos expresión mutuamente excluyente de vimentina (relacionada con la TEM) y E-cadherina. En base a la expresión de RFC y marcadores de TEM se identificaron 3 grupos fenotípicos: 1A) Her 1 +++, Her 2 ++, Her 3 ++/+++, PDGFR -, MET ++/+++, PTP1B ++, VEGFR +/++ y vimentina ++/+++; 1B) Her 1 +/++, Her 2 ++, Her 3 +, PDGFR -, MET ++/+++, PTP1B ++, VEGFR +/++ y vimentina ++/+++; y 2) Her 1 -, Her 2 ++/+++, Her 3 -, PDGFR +++, MET -, PTP1B -, VEGFR - y vimentina -. Estos grupos fenotípicos presentan distintas tasas de proliferación, capacidad de migración celular, respuesta a fármacos y capacidad tumorigénica.

## **2. Planteamiento del problema**

El presente trabajo aporta información en relación a la siguiente pregunta: ¿En qué medida existe una diferente expresión de RFC, receptores hormonales, expresión de PTP1B y marcadores de transición epitelio mesénquima en las diversas subpoblaciones celulares dentro de un cultivo primario de un tumor mamario y cuál es su implicación en las distintas funciones biológicas y la respuesta a fármacos?

Los antecedentes descritos dan sustento al planteamiento de la presente investigación tomando en cuenta que existe una importante heterogeneidad intratumoral demostrada recientemente en tumores sólidos como riñón y mama <sup>7-10</sup>. De la misma forma, el proceso de TEM puede dar lugar a que encontremos subpoblaciones celulares en distintas fases del mismo <sup>12-14</sup>, todo lo cual plantea interrogantes sobre el abordaje diagnóstico y terapéutico de la mayoría de los tumores sólidos, ya que gran parte de la decisión terapéutica está basada en la toma de una biopsia que podría no ser representativa de todas las subpoblaciones celulares existentes dentro del tumor.

Por otro lado, gran parte de la información obtenida para el estudio del cáncer de mama se deriva de la utilización de líneas celulares establecidas, que proceden de lesiones metastásicas tales como derrames pleurales o ascíticos que son en general homogéneas, y su uso como modelos de experimentación tiene el inconveniente de no haber sido parte del microambiente tumoral y las importantes interacciones que ahí se desarrollan <sup>17,18</sup>. Razón por lo cual hemos decidido trabajar con subpoblaciones celulares obtenidas de un cultivo primario de un tumor de glándula mamaria.

## **3. Justificación**

La información obtenida durante los últimos años ha permitido la caracterización de marcadores que permiten dividir a las pacientes en cuatro grupos terapéuticos principales, basados en patrones de expresión de marcadores moleculares <sup>3-5</sup> lo cual demuestra una “heterogeneidad intertumoral”, que se ha asociado además al pronóstico <sup>5</sup>, gracias a lo cual, hoy sabemos que no todas las pacientes se benefician de las mismas modalidades terapéuticas, lo cual se basa sobre todo en el estudio de la heterogeneidad intertumoral; sin embargo, se desconoce en gran medida el papel de la heterogeneidad intratumoral y sus implicaciones en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

## **4. Hipótesis**

### **4.1. Hipótesis nula**

Diversas subpoblaciones celulares tienen una misma expresión de marcadores de TEM, receptores hormonales y de factores de crecimiento, lo cual se traduce en igual susceptibilidad farmacológica, capacidad de migración, proliferación y tumorigenicidad.

### **4.2. Hipótesis alternativa**

Diversas subpoblaciones celulares tienen una diferente expresión de marcadores de TEM, receptores hormonales y de factores de crecimiento, lo cual se traduce en distinta susceptibilidad farmacológica, capacidad de migración, proliferación y tumorigenicidad.

## **5. Objetivos**

### **5.1. General**

Caracterizar distintas poblaciones de células obtenidas de un cultivo primario (MBCDF) de un tumor mamario.

### **5.2. Específicos**

- 5.2.1. Determinar la expresión de Receptores hormonales (RE y RP), receptores de crecimiento celular (PDGFR, VEGFR, Her1, Her2, Her 3, Her4, cMET, IGF-1R) y fosfatasa de tirosina PTP1B.
- 5.2.2. Determinar la expresión de marcadores de TEM (vimentina y E-cadherina) en cada subpoblación estudiada.
- 5.2.3. Determinar la velocidad proliferativa de cada subpoblación celular estudiada.
- 5.2.4. Determinar la capacidad de migración de cada subpoblación celular estudiada.
- 5.2.5. Evaluar la tumorigenicidad de las diversas subpoblaciones celulares en ensayos realizados en agar suave.
- 5.2.6. Determinar la susceptibilidad a diferentes fármacos en cada una de las subpoblaciones celulares estudiadas.

## **6. Material y métodos**

### **6.1. Reactivos**

Anticuerpos contra Her 2, MET y VEGFR fueron obtenidos de Cell Signalling Technology (Danvers, MA); los anticuerpos primarios contra receptores de estrógeno y progesterona fueron obtenidos de Cell Marque Corporation (Rocklin, CA); anticuerpos anti Her 1, Her 3, Her 4, PTP1B, IGFR1R, PDGFR, tubulina y E-cadherina fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); y anticuerpos contra vimentina se obtuvieron de Life Technologies (Grand Island, NY).

### **6.2. Cultivo de líneas celulares**

El cultivo celular primario de cáncer de mama MBCDF se derivó a partir de una biopsia de tejido obtenido de una mastectomía radical (protocolo aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Ref. 1549, BQO-008-06/9-1) como ya se reportó previamente<sup>23</sup>. Brevemente, el tejido fue disociado en pequeños fragmentos y sembrado en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, antibiótico y antimicótico. El tejido se dejó crecer en un incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se dejó crecer hasta que las células llenaron el plato de cultivo y se despegaron con tripsina al 0.05%. Se asumió la inmortalización luego de crecimiento continuo *in vitro* por más de dos meses<sup>23</sup>. Utilizamos las líneas celulares comerciales MCF7 (generosamente donadas por el Dr. Alejandro Zentella, Unidad de Bioquímica, INCMNSZ), T47D, SK-BR-3, (donadas por la Dra. Rocío Becerra, Depto. Biología de la Reproducción, INCMNSZ) y HUVEC (procesadas por el Q.F.P Martín Gallardo) como controles de células luminales, HER2 positivas, y VEGFR positivas, respectivamente<sup>17,18,24</sup>.

### **6.3. Obtención de subpoblaciones del cultivo primario MBCDF por el método de dilución limitante**

Las células del cultivo celular primario MBCDF fueron diluidas en medio de cultivo RPMI-1640 a una concentración de 1 célula por cada 200 µl. En placas de 96 pozos se sembraron 100 µl de la dilución y se revisaron cada tercer día en microscopio invertido. Se marcaron los pozos en los que se visualizó una colonia, las cuales posteriormente fueron transferidas a placas de 12 pozos al llegar a una confluencia de 50 a 70% y posteriormente a cajas de Petrí de 100mm de diámetro.

#### **6.4. Ensayo de Inmunoblot (Western Blot)**

Las células fueron sembradas en cajas Petrí de 100mm diámetro con medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Para la extracción de la proteína se permitió una confluencia del 90% y se rasparon las células con gendarme para la obtención de pellets que posteriormente fueron lisados en buffer de lisis que contiene 50mM de HEPES (pH 7.4), 1mM EDTA, 250 mM de 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 se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante y fueron transferidos a membrana Immobilon-P PVDF (Millipore Corp Bedford, MA). Las membranas fueron bloqueadas durante 45 minutos con leche descremada al 5% en PBS-Tween y posteriormente fueron incubadas con los diferentes anticuerpos toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubaron por 45 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente. La señal fue visualizada por quimioluminiscencia y se expuso a una película radiográfica (Kodak).

#### **6.5. Ensayos de Proliferación Celular**

La velocidad de proliferación celular se determinó sembrando 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pozos por triplicado. Se obtuvieron evaluaciones los días 0, 2, 4 y 6. En los días mencionados se agregó 40 µl de MTT (5 mg/ml) a cada pozo y se dejó actuar por 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, posterior a lo cual fue aspirado el medio de cultivo del pozo. Luego de completarse los 6 días del experimento, se agregó a cada pozo 200 µl de isopropanol acidulado 0.1 N de HCl y 200 µl de PBS, dejando en agitación por 20 minutos. Posteriormente, se determinó la absorbancia mediante un lector de ELISA a una densidad óptica de 570 y 630 nm. El incremento en la proliferación se realizó mediante la normalización de la densidad óptica del día con respecto a la densidad óptica del día cero. Se realizaron 3 experimentos de manera independiente y se reportó el promedio de estos ± el error estándar.

#### **6.6. Ensayos de Migración Celular**

La capacidad de migración celular de las diferentes subpoblaciones celulares elegidas se realizó mediante cámaras de Boyden (figura 3). Se sembraron 100,000 células/cm<sup>2</sup> por triplicado. Las células se incubaron por 6 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se aspiró el medio de cada cámara de Boyden y se limpió la parte interna de las mismas gentilmente con aplicadores de algodón, cuidando no deformar la membrana ni tocar la parte externa. Se

fijaron las células con glutaraldehído al 1.1% en PBS por 20 minutos en agitación. Posteriormente fueron teñidas con cristal violeta, dejando en agitación por 20 minutos, y luego lavadas con agua para eliminar el exceso del colorante. Se permitió su completo secado y se procedió a su visualización en microscopio a un aumento de 20X, escogiendo 5 campos aleatorios de cada cámara de Boyden (figura 1).

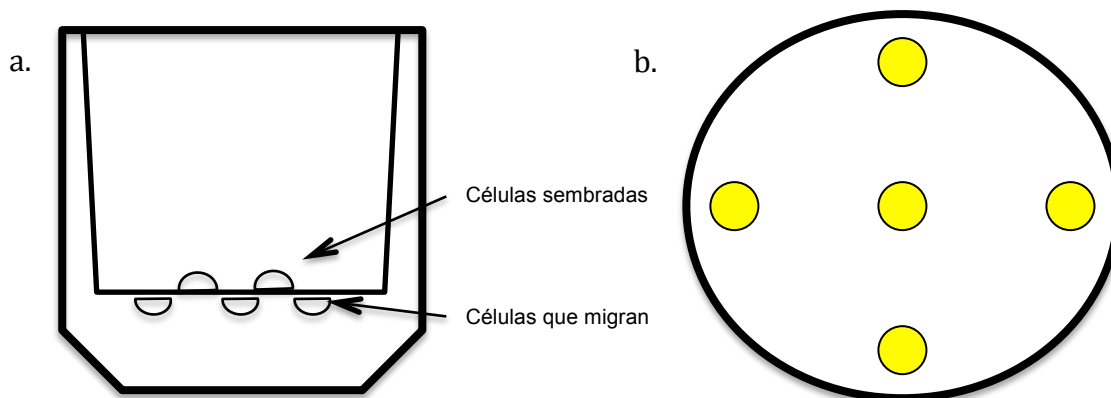


Figura 3. Ensayo de migración celular. a) Diagrama de representación de la cámara de Boyden. b) Campos microscópicos para recuento de migración celular

El promedio de 5 campos de células contados fue dividido entre el área del campo visual ( $0.001\text{cm}^2$ ). Este cociente fue multiplicado por el área total de la membrana de la cámara de Boyden ( $0.33\text{ cm}^2$ ), obteniendo así el número total de células que migraron. El porcentaje de migración se obtuvo dividiendo el número de células que migraron entre el total de células sembradas, multiplicado por 100.

### 6.7. Ensayos de Citotoxicidad

La viabilidad celular ante concentraciones crecientes de diversos fármacos se realizó mediante ensayos colorimétricos utilizando la técnica de cristal violeta. Brevemente, se sembraron  $15,000\text{ células/cm}^2$  en placas de 48 pozos por triplicado. Se agregaron concentraciones crecientes de los fármacos de interés y se incubó por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de transcurridas las 48 horas las células fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% en PBS, dejando en agitación por 20 minutos y fueron teñidas con cristal violeta. Se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro a  $570\text{nm}$ .

### 6.8. Formación de colonias en agar suave

El crecimiento celular independiente de anclaje se realizó mediante la formación de colonias en agar blando. Brevemente, en placas de 6 pozos se colocó una base de agar constituida por agarosa al 1% y medio de cultivo RPMI-2X + SFB 20%.



Posteriormente, 2,500 células de cada subpoblación fueron resuspendidas en agarosa al 0.7% + RPMI-2X + 20% de SFB y sembradas sobre el agar base. Se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 3 semanas. Se suplementaron dos veces por semana con RPMI-1640 + 10% de SFB, antibiótico y antimicótico. Se tiñeron con cristal violeta y se visualizaron las colonias macroscópicas formadas. Como control positivo de este experimento se utilizó la línea celular T47D (conocida por su capacidad para formar colonias en agar suave).

### **6.9. Método estadístico**

Se realizó el análisis de los promedios de tres ensayos por triplicado y el error estándar de la media. Para descartar la hipótesis nula empleamos el análisis de varianza de dos vías con corrección de Bonferroni, estableciendo un nivel de significancia estadística con un valor de  $P < 0.05$ . Para la recolección de los datos utilizamos Microsoft Excel para Mac, versión 14.0.0 y se elaboraron las gráficas y el análisis estadístico con GraphPad Prism v6 para Mac OS X.

## 7. Resultados

### 7.1. Caracterización de subpoblaciones según apariencia morfológica y fenotipo

#### 7.1.1. Obtención de subpoblaciones de tumor primario de mama.

Mediante el método de dilución limitante se obtuvieron 21 subpoblaciones originadas del cultivo primario de un tumor mamario MBCDF. En base a su apariencia morfológica, fueron divididas en dos grupos para el análisis de expresión de RFC (Figura 4). Las células del grupo 1 tienen forma alargada y se observan varias células creciendo en suspensión ya sea de forma aislada o formando pequeños cúmulos. A este primer grupo pertenecen las células B3, B4, B5, B6, C1, C3, C4 y D5. Las células del grupo 2 son más pequeñas, de forma estrellada, predominantemente adheridas al plástico y con una menor proporción de células creciendo en suspensión comparadas con el grupo 1. Al grupo 2 pertenecen las subpoblaciones B2, B7, B10, C5, C9, D4, F, F3, F5, F7, F8, F10 y F11.

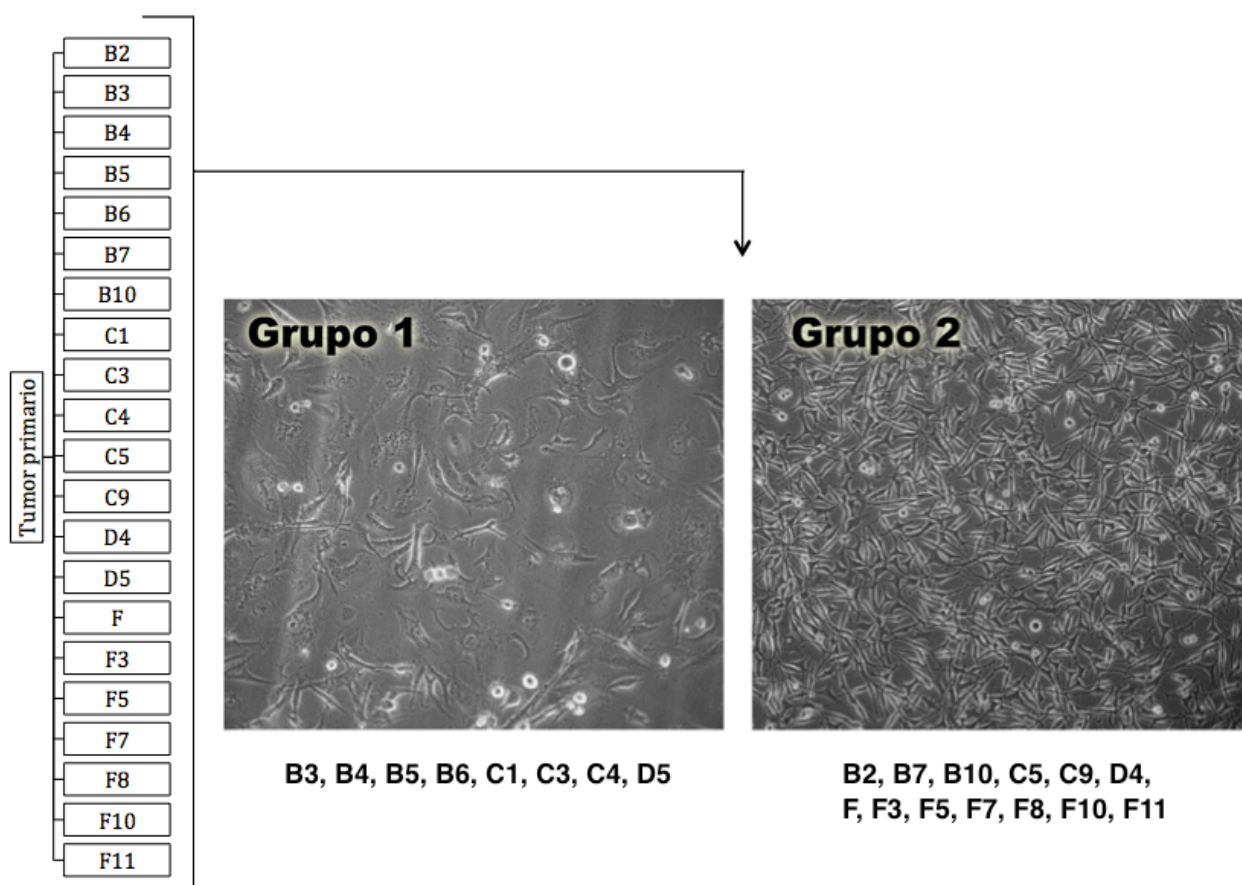


Figura 4. Subpoblaciones celulares obtenidas del cultivo primario (MBCDF) proveniente de un tumor mamario por el método de dilución limitante. Se procedió a dividir las en dos grupos según su apariencia morfológica. Se presentan micrografías representativas del grupo 1 y grupo 2 tomadas en microscopio invertido Olympus CK40 a un aumento de 10X utilizando una cámara Canon.

### **7.1.2. Expresión de receptores de factores de crecimiento y PTP1B**

Para determinar la expresión de RFC (Her 1, Her 2, Her 3, Her 4, PDGFR, VEGFR cMET, IGF-1R) y la fosfatasa de tirosina PTP1B, se analizó cada una de las subpoblaciones celulares mediante la técnica de Western blot. Se colocó B2 entre las células del grupo 1 y D5 entre las del grupo 2 como controles, y las líneas celulares MCF7 , SK-BR-3 y HUVEC (modelos de células luminales, HER2 positivas, y VEGFR positivas, respectivamente), <sup>17,24</sup> las cuales fueron nuestros controles positivos. Como se demuestra en la figura 5, observamos que existe un patrón mutuamente excluyente entre la expresión de VEGFR, MET, PTP1B, HER 1 y HER 3 con la expresión de PDGFR. Notablemente, la expresión de PDGFR es exclusiva de las células del grupo 2 y la expresión del resto de receptores antes mencionados, incluyendo PTP1B, se observa solamente en las células del grupo 1. Otros receptores como HER2 e IGF1R se expresaron indistintamente en ambos grupos de subpoblaciones celulares.

### **7.1.3. Expresión de receptores para estrógenos y progesterona**

La expresión de receptores para estrógenos y progesterona se forma parte del análisis clínico necesario para definir el tratamiento de las pacientes con cáncer de mama<sup>3</sup>. Como parte de la caracterización de las subpoblaciones estudiadas, se determinó la expresión de estos receptores a través de la técnica de Western blot, utilizando las líneas celulares MCF7 y SK-BR-3 como controles positivos y negativos, respectivamente. No observamos expresión de receptores hormonales en ninguna de las subpoblaciones obtenidas del cultivo primario. En la figura 6, se presentan los inmunoblots de los lisados proteicos, en los que la expresión de receptores de estrógenos y progesterona solamente se observa en la línea celular MCF7 (modelo de células luminales).

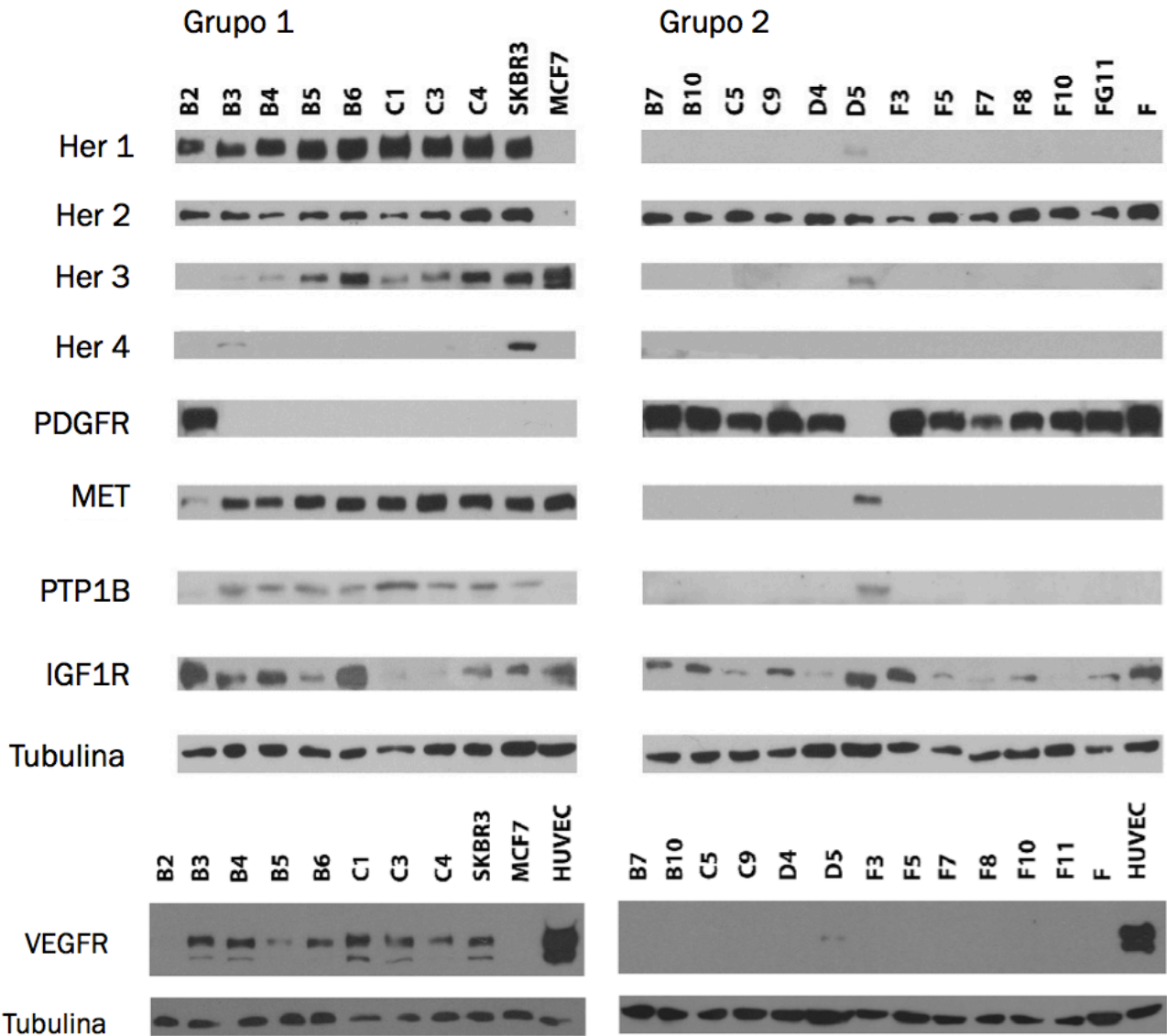


Figura 5. Expresión de receptores de factores de crecimiento y la fosfatasa de tirosina PTP1B en subpoblaciones del grupo 1 y 2. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína total en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida. Se realizó Western blot utilizando anticuerpos específicos para los receptores de factores de crecimiento mencionados. (Se colocó B2 entre las células del grupo 1 y D5 entre las del grupo 2 como controles, respecto al grupo analizado, además de las líneas celulares SK-BR-3, MCF7 y HUVEC que fueron nuestros controles positivos. La tubulina se utilizó como control de carga).

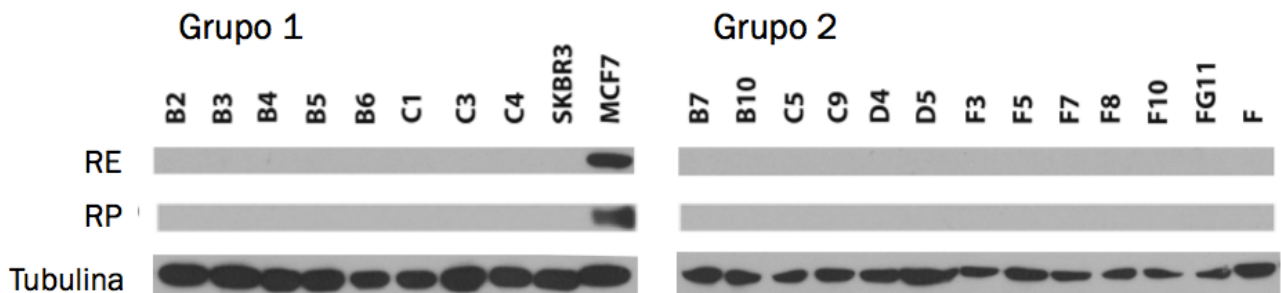


Figura 6. Expresión de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP) en subpoblaciones del grupo 1 y 2. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína total en geles de poli-acrilamida desnaturalizantes. Se realizó Western blot utilizando anticuerpos específicos para los receptores de factores de crecimiento mencionados. (Se colocó B2 entre las células del grupo 1 y D5 entre las del grupo 2 como controles, respecto al grupo analizado, además de las líneas celulares MCF7 y SK-BR-3, que fueron nuestros controles positivos y negativos, respectivamente. La tubulina se utilizó como control de carga).

#### 7.1.4. Expresión de marcadores de transición epitelio – mesénquima (TEM)

Con el propósito de determinar la expresión de marcadores de TEM en las subpoblaciones estudiadas, determinamos a través de la técnica de Western blot la presencia de vimentina y E-cadherina. La vimentina incrementa su expresión en las células que pierden sus características epiteliales y adoptan un fenotipo mesenquimatoso, mientras la E-cadherina, proteína transmembranal importante en la unión a la membrana basal y uniones laterales, disminuye su expresión, llegando en ocasiones a desaparecer<sup>12,14,25–29</sup>. La expresión de vimentina se observó únicamente en las células del grupo 1, observando nuevamente un patrón mutuamente excluyente, con respecto al grupo 2. En cuanto a E-cadherina, esta se expresó predominantemente en las células del grupo 2, aunque algunas de las células del grupo 1 (B5, B6, C3 y C4) presentan una expresión débil (Figura 7).

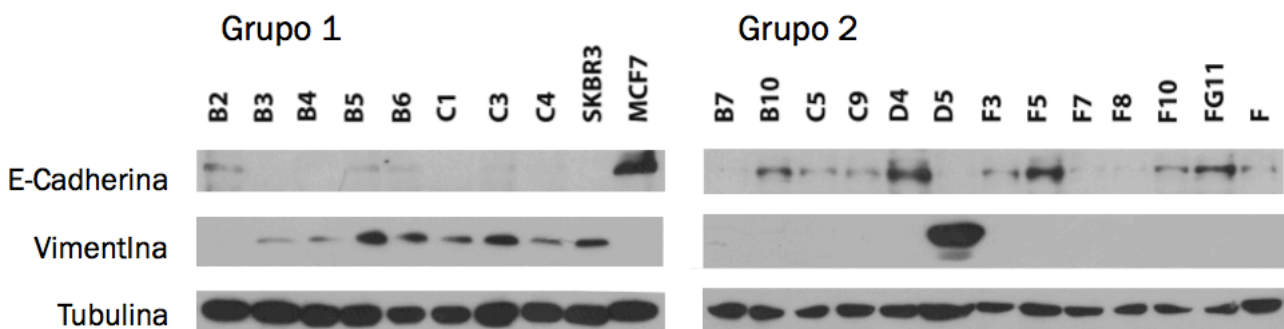


Figura 7. Expresión de marcadores de TEM (vimentina y E-cadherina) en subpoblaciones del grupo 1 y 2. Se cargaron 30  $\mu$ g de proteína total en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Se realizó Western blot utilizando anticuerpos específicos para los receptores de marcadores mencionados. (Se colocó B2 entre las células del grupo 1 y D5 entre las del grupo 2 como controles, respecto al grupo analizado, además de las líneas celulares MCF7 y SK-BR-3, que fueron nuestros controles positivos y negativos, respectivamente. La tubulina se utilizó como control de carga.

#### 7.1.5. Fenotipos celulares obtenidos

Los resultados del análisis de RFC permitió dividir las subpoblaciones en tres grupos fenotípicos (1A, 1B y 2), a su vez, pertenecientes a los grupos morfológicos previamente establecidos. Las subpoblaciones pertenecientes al grupo morfológico 1 se dividieron en 1A y 1B, las cuales tienen en común la ausencia de expresión de PDGFR, alta expresión de MET, PTP1B, VEGFR y vimentina. Se diferencian entre sí por la mayor expresión de los receptores Her 1 y Her 3, observado en las células del grupo 1A. Todas las subpoblaciones celulares pertenecientes al grupo morfológico 2 formaron parte del grupo fenotípico 2 y se caracterizan por su alta expresión de PDGFR y Her 2, así como ausencia en la expresión de Her 1, Her 3, MET, PTP1B, VEGFR y vimentina (Tabla 2).

Tabla 2									
Grupo fenotípico	Grupo morfológico	Expresión de receptores							
		Her 1	Her 2	Her 3	PDGFR	MET	PTP1B	VEGFR	Vimentina
1A	1	+++	++	++/+++	-	++/+++	++	+ / ++	++/+++
1B	1	+ / ++	++	+	-	++/+++	++	+ / ++	++/+++
2	2	-	++/+++	-	+++	-	-	-	-

Tabla 2. Grupos fenotípicos establecidos según la expresión de receptores de factores de crecimiento, marcadores de TEM y fosfatasa de tirosina PTP1B. Las células del grupo morfológico 1 fueron divididas en 1A y 1B, mientras que todas las subpoblaciones del grupo morfológico 2 compartieron el mismo fenotipo (Grupo fenotípico 2)

## 7.2. Funciones biológicas y respuesta a fármacos

### 7.2.1. Funciones biológicas

#### 7.2.1.1. Proliferación celular de los grupos fenotípicos 1A, 1B y 2

Una vez establecidos los grupos fenotípicos, se seleccionaron 2 o 3 subpoblaciones celulares representativas de cada uno de ellos, para realizar los análisis de proliferación y migración celular (Tabla 3). Para determinar la tasa de proliferación celular *in vitro*, utilizamos el ensayo colorimétrico de reducción de MTT. Las subpoblaciones del grupo fenotípico 2, que se caracterizan por su alta expresión de PDGFR, presentaron una mayor tasa de proliferación comparadas con los grupos 1A y 1B, lo cual fue estadísticamente significativo a partir del segundo día del ensayo. Se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos 1A y 1B únicamente el sexto día del ensayo (Figura 8 y tabla 4). Estos resultados sugieren que la expresión de PDGFR confiere a las células una mayor capacidad de proliferación como se observó para las células del grupo 2.

Tabla 3		
Grupo fenotípico	Grupo morfológico	Subpoblaciones representativas
1A	1	B6, C1
1B	1	D5, B3
2	2	F, F3, C9, B2

Tabla 3. Grupos fenotípicos basados en la expresión de receptores de factores de crecimiento, PTP1B y vimentina y subpoblaciones escogidas para representar cada uno de ellos en los ensayos de proliferación, migración celular, tumorigenicidad y citotoxicidad.

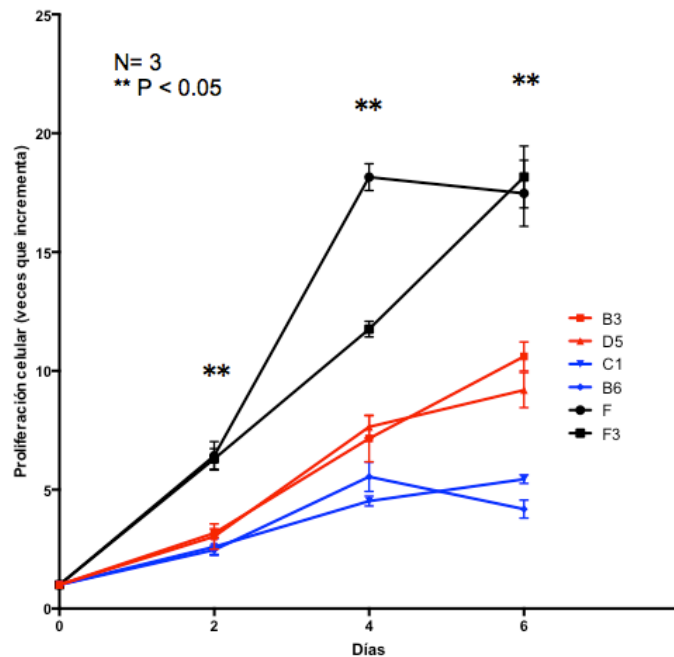


Figura 8. Proliferación celular de las subpoblaciones estudiadas. Se observa que las células del grupo fenotípico 2 (F y F3) presentan una mayor tasa de proliferación celular la cual es estadísticamente significativa desde el segundo día del ensayo. Entre las poblaciones de los grupos fenotípicos 1A y 1B existe diferencia estadística únicamente en el sexto día del ensayo, teniendo una mayor tasa proliferativa las subpoblaciones del grupo 1B. (\*\* Estadísticamente significativo).

Tabla 4 Diferencia entre subpoblaciones representativas de cada fenotipo	
Día 2	Valor P
F3 vs B3 (Grupo 2 vs 1B)	** 0.0049
B6 vs B3 (Grupo 1A vs 1B)	> 0.9999
Día 4	
F3 vs B3 (Grupo 2 vs 1B)	** < 0.0001
B6 vs B3 (Grupo 1A vs 1B)	0.7792
Día 6	
F3 vs B3 (Grupo 2 vs 1B)	** < 0.0001
B6 vs B3 (Grupo 1A vs 1B)	** < 0.0001

Tabla 4. Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) observadas entre subpoblaciones representativas de cada grupo fenotípico. (Grupo 1A representado por B6, grupo 1B por B3 y grupo 2 por F3). (\*\* Estadísticamente significativo).

### 7.2.1.2. Migración celular de los grupos fenotípicos 1A, 1B y 2

Previamente, observamos que las subpoblaciones del grupo fenotípico 2 tiene mayor proliferación. Con la finalidad de analizar como se comportan los grupos fenotípicos en cuanto a la migración celular, se realizaron ensayos de migración utilizando cámaras de Boyden. Se sembraron  $100 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y se incubaron por 6 horas en las cámaras de Boyden, El recuento de las células que migraron en campos de 20X (figura 9) mostró que la subpoblación F presentó el mayor porcentaje de migración (61%), seguida de C9 y B2 (50.7 y 40.7%, respectivamente), todas pertenecientes al grupo fenotípico 2. En la figura 10A se indica el porcentaje de migración de cada subpoblación y en la 10B se

presenta la comparación entre F y cada subpoblación estudiada. No encontramos diferencias estadísticamente significativa entre F, C9 y B2 (todas pertenecientes al grupo fenotípico 2); sin embargo, entre F y el resto de subpoblaciones (F3 y grupos fenotípicos 1A y 1B) existió diferencia significativa en cuanto a la capacidad de migración.

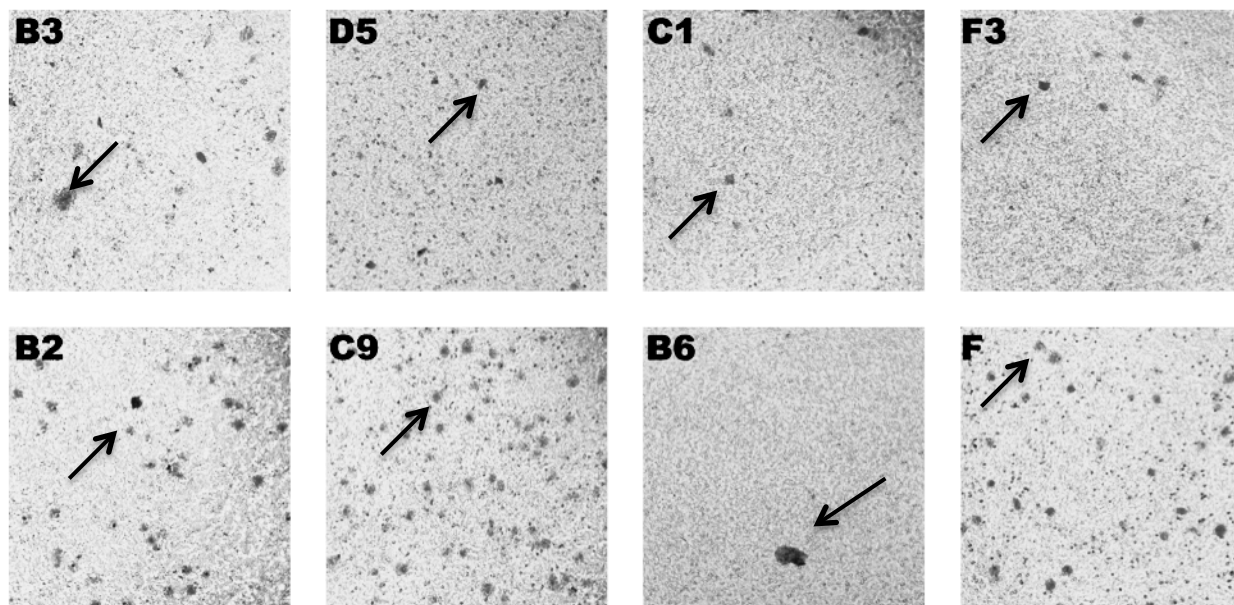


Figura 9. Campos microscópicos para evaluación de migración celular. (Se hizo el recuento de 5 campos al azar por triplicado de cada subpoblación celular). Se presentan micrografías representativas de cada subpoblación celular tomadas en microscopio invertido Olympus CK40 a un aumento de 20X utilizando una cámara Canon. Se señala con una flecha las células que migraron a través de la membrana de la cámara de Boyden.

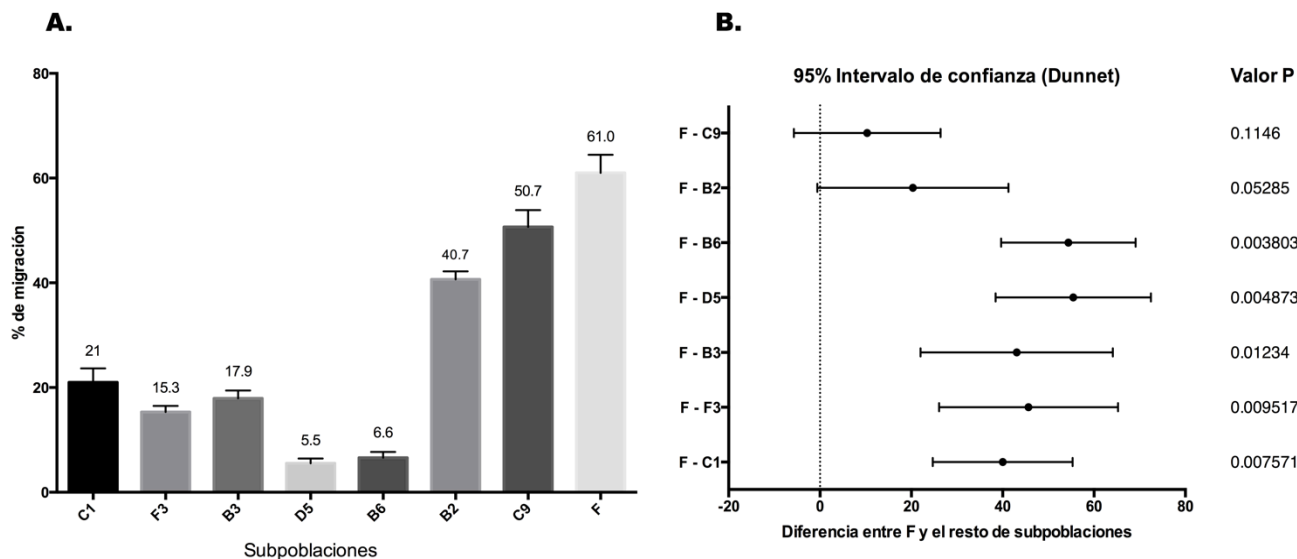


Figura 10. A. Porcentaje de migración celular de cada subpoblación. Se observa que las células del grupo fenotípico 2 (F, C9 y B2) tienen mayor capacidad de migración a través de la membrana de la cámara de Boyden. B. Al comparar a todas las subpoblaciones con F (subpoblación con mayor capacidad de migración) observamos que a excepción de C9 y B2 todas las demás subpoblaciones presentan una menor tasa de migración celular, lo cual fue estadísticamente significativa (IC 95%, P estadísticamente significativa <0.05)



### 7.2.1.3. Tumorigenicidad de los grupos fenotípicos 1A, 1B y 2

Para determinar el crecimiento celular independiente de anclaje (el cual se ha asociado con la capacidad tumorigénica y potencial metastásico *in vivo*<sup>30,31</sup>), realizamos ensayos en agar suave para analizar la capacidad de formación de colonias macroscópicas durante tres semanas, utilizando como control positivo la línea celular T47D. Tal como se observa en la figura 11, todas las subpoblaciones celulares tuvieron la capacidad para formar colonias en el agar suave. Sin embargo, en general las subpoblaciones pertenecientes al grupo fenotípico 2 forman colonias en mayor número, y en el caso de la subpoblación F se observa que las mismas son de mayores dimensiones en comparación con el resto de subpoblaciones pertenecientes a este grupo fenotípico. En el caso de los grupos fenotípicos 1A y 1B podemos observar que forman menor cantidad de colonias (máximo 3 por pozo), a excepción de B3 cuyas colonias se presentan en mayor número y tamaño.

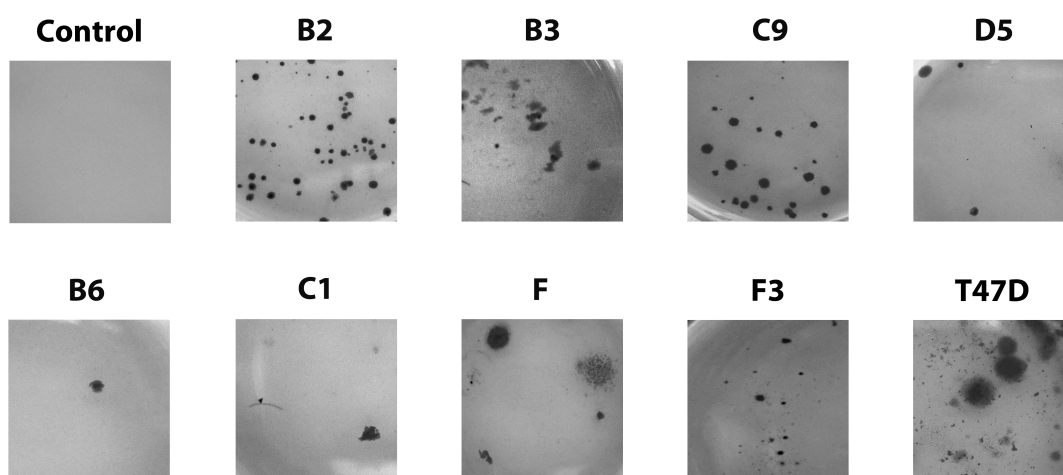


Figura 11. Formación de colonias macroscópicas en agar suave. Se sembraron 2,500 células por pozo y se incubaron durante 3 semanas, siendo posteriormente teñidas con cristal violeta. Se presentan fotografías representativas de cada subpoblación celular tomadas con una cámara Canon. Como control positivo se utilizó la línea celular de cáncer de mama T47D.

### 7.2.2. Ensayos de viabilidad celular ante concentraciones farmacológicas crecientes

La siguiente interrogante que nos planteamos fue si los grupos fenotípicos responden de manera diferente a fármacos de quimioterapia utilizadas en el tratamiento del cáncer de mama e inhibidores de cinasas de tirosina, incluyendo crizotinib (inhibidor de la cinasa de tirosina MET)<sup>32</sup> e imatinib (inhibidor de PDGFR)<sup>33</sup>. Se realizaron ensayos de citotoxicidad sembrando 15,000 células en placas de 48 pozos que fueron tratadas luego de 24 horas con concentraciones de fármacos crecientes. La viabilidad celular se determinó con la técnica colorimétrica de cristal violeta.

### 7.2.2.1. Viabilidad celular ante concentraciones crecientes de doxorubicina, lapatinib, crizotinib y capecitabina

En la figura 12 se observa la viabilidad celular ante concentraciones crecientes de doxorubicina (0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ ), lapatinib (0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 y 1  $\mu\text{M}$ ), crizotinib (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y capecitabina (0, 25, 50, 100, 200, 400, 600 y 800  $\mu\text{g/ml}$ ). Encontramos que con el tratamiento de los diferentes fármacos hay una disminución de la viabilidad de manera dosis respuesta. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las subpoblaciones celulares representativas de los grupos fenotípicos estudiados.

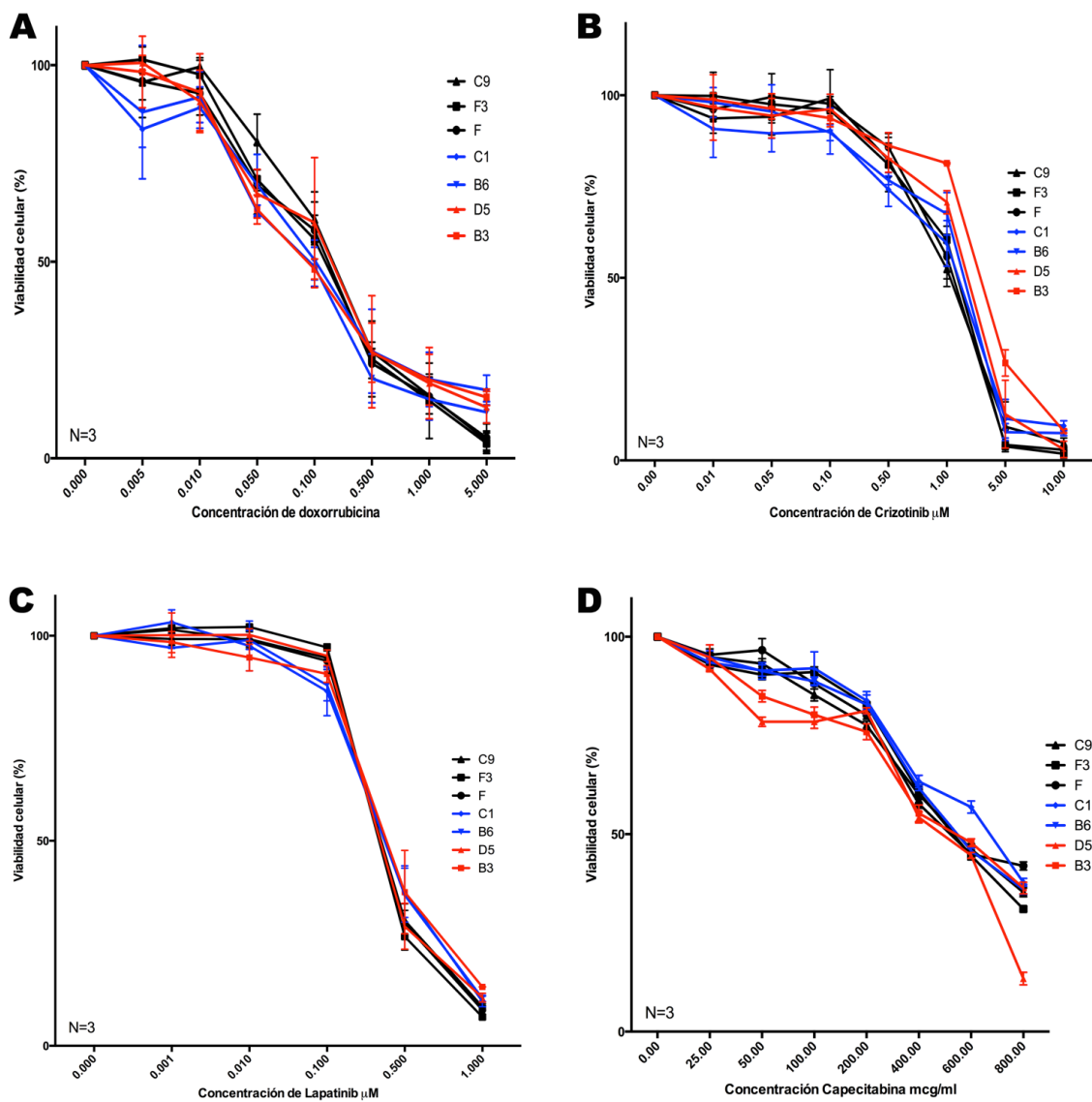


Figura 12. Curvas de viabilidad celular ante concentraciones crecientes de A. Doxorubicina; B. Crizotinib; C. Lapatinib; y D. Capecitabina. Fueron sembradas 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 48 pozos y 24 horas después fueron tratadas con concentraciones crecientes de fármacos por 48 horas. La viabilidad celular se determinó con la técnica colorimétrica de cristal violeta. Se presentan los porcentajes de viabilidad, sin observar diferencias estadísticamente significativas entre las diversas subpoblaciones de los grupos fenotípicos 1A, 1B y 2.

### 7.2.2.2. Expresión de PDGFR y aumento en la susceptibilidad al imatinib

Al exponer las diversas subpoblaciones celulares a concentraciones crecientes de imatinib (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) se observó que las células PDGFR +, pertenecientes al grupo fenotípico 2, presentaron caída en la viabilidad de manera dosis respuesta comparado con las subpoblaciones de los grupos 1A y 1B (PDGFR -), en las que solo se observa una disminución de la viabilidad celular a partir de 1  $\mu\text{M}$ . La diferencia observada entre las subpoblaciones del grupo 2 y los grupos 1A y 1B fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). (Figura 13)

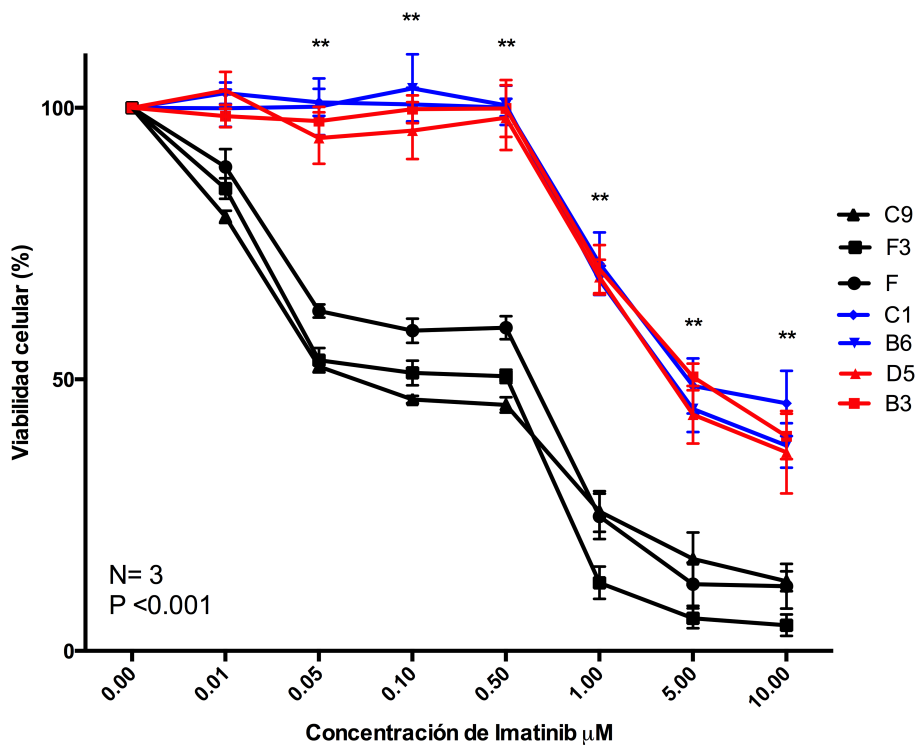


Figura 13. Citotoxicidad ante concentraciones crecientes de imatinib. Fueron sembradas 15,000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 48 pozos y 24 horas después fueron tratadas con concentraciones 0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$  por 48 horas. La viabilidad celular se determinó con la técnica colorimétrica de cristal violeta. Se presentan los porcentajes de viabilidad, observando que es menor en las subpoblaciones celulares PDGFR + (grupo fenotípico 2) al compararlas con las subpoblaciones PDGFR - (grupos fenotípicos 1A y 1B).  $P < 0.001$ . \*\* Diferencia estadísticamente significativa a concentraciones  $\geq 0.05 \mu\text{M}$ .

### 7.2.2.3. Viabilidad celular ante concentraciones crecientes de Paclitaxel

En la figura 14 se presenta la viabilidad celular ante concentraciones crecientes de paclitaxel (0.1, 0.5, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células de los grupos fenotípicos 1A y 1B (PDGFR -, PTP1B +) presentan mayor resistencia a los efectos del paclitaxel, lo cual se traduce en mayor viabilidad celular. Lo contrario ocurre con las subpoblaciones del grupo fenotípico 2 (PDGFR +, PTP1B -). Al hacer las comparaciones entre las subpoblaciones representativas de los grupo fenotípicos 2 versus 1A y 1B, este fenómeno fue estadísticamente significativo.

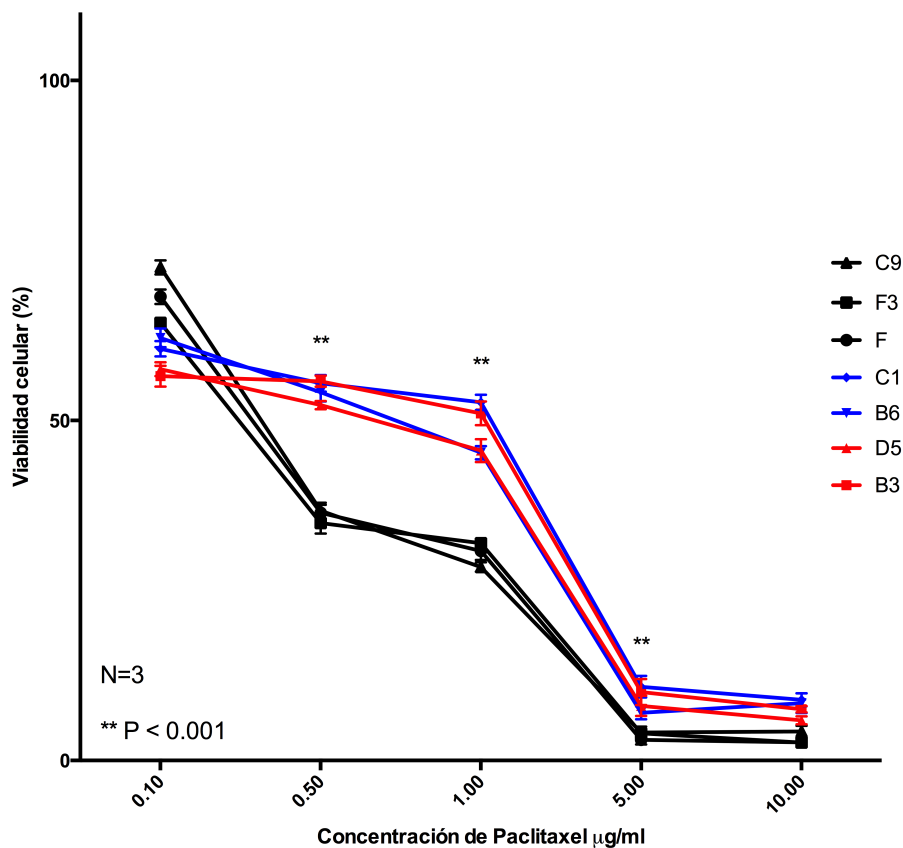


Figura 14. Viabilidad celular ante concentraciones crecientes de paclitaxel. Fueron sembradas 15,000 células/ $\text{cm}^2$  en placas de 48 pozos y 24 horas después fueron tratadas con concentraciones 0.1, 0.50, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  por 48 horas. La viabilidad celular se determinó con la técnica colorimétrica de cristal violeta. Se presentan los porcentajes de viabilidad, observando que es menor en las subpoblaciones celulares PDGFR + y PTP1B - (grupo fenotípico 2) al compararlas con las subpoblaciones PDGFR - y PTP1B + (grupos fenotípicos 1A y 1B).  $P < 0.001$ . \*\* Diferencia estadísticamente significativa a concentraciones de 0.50, 1 y 5  $\mu\text{g/ml}$ .

## 8. Discusión y conclusión

En el presente estudio analizamos la expresión de una amplio panel de RFC, la fosfatasa de tirosina PTP1B, marcadores de TEM y receptores hormonales. Se relacionó la expresión de estos con funciones biológicas propias de las células neoplásicas y respuesta a diversos fármacos. El modelo utilizado fueron subpoblaciones obtenidas de un cultivo primario de un tumor mamario. Uno de los principales hallazgos demostrados en este trabajo es la co-expresión de múltiples receptores de con actividad de tirosina cinasa en las células tumorales, lo cual contribuye a heterogeneidad intratumoral <sup>34</sup>. Esto es de gran importancia clínica debido a que puede explicar la resistencia innata y adquirida a inhibidores dirigidos contra estos blancos terapéuticos. En el caso de la resistencia adquirida, al administrar un inhibidor de cinasas de tirosina, se pueden activar circuitos autócrinos y parácrinos dependientes de ligando y receptor, los cuales, activan vías de señalización río abajo, como fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) y cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Debido a la amplia convergencia de las vías de señalización presentes en las célula, estas son activadas por otros receptores hacia los cuales no está dirigido el tratamiento <sup>35,36</sup>. De la misma forma se ha demostrado recientemente que en las células neoplásicas existe notable redundancia entre vías de señalización, lo cual se asocia a resistencia innata a inhibidores de cinasas de tirosina <sup>37</sup>. Ejemplos de estos fenómenos han sido descritos en líneas celulares de cáncer pulmonar no microcítico, en las cuales se ha demostrado que la resistencia a los inhibidores de EGFR (gefitinib y erlotinib) se asocia a una amplificación de MET debido a un aumento de su ligando natural (HGF), lo que conlleva a una activación de PI3K dependiente de Her 3 <sup>38,39</sup>. En cáncer de mama se ha demostrado que dentro de las subpoblaciones celulares se puede encontrar un fenotipo Her 2+/ MET+, que explica un mecanismo de resistencia al bloqueo de Her 2, a través del cual, la célula activa vías de señalización dependientes de MET de forma compensatoria, que conlleva resistencia al tratamiento. De forma interesante se observa que el bloqueo inducido de cualquiera de los receptores (MET o Her 2) conlleva a un aumento de la señalización dependiente del otro <sup>35</sup>.

Además de la co-expresión y co-activación de múltiples RFC en la misma célula, recientemente Snuderl y colaboradores reportaron que la expresión de MET, PDGFRA y EGFR en un glioblastoma primario tiene un patrón mutuamente excluyente en distintas subpoblaciones celulares del mismo tumor, planteando interrogantes sobre la utilidad de las terapias dirigidas <sup>11</sup>. Respecto a este patrón mutuamente excluyente de PDGFR entre las subpoblaciones estudiadas y su relación con la TEM, Jechlinger y colaboradores

utilizando una línea celular de epitelio mamario, demostraron un rol importante de PDGFR durante el desarrollo de las metástasis de cáncer de mama. De forma interesante, observaron que para el inicio de la TEM inducida por el factor transformador del crecimiento beta ( $TGF\beta$ ), es necesario el establecimiento de un circuito autócrino PDGF/PDGFR, que induce la señalización a través de PI3K y protege a las células de la apoptosis durante el proceso de transición. Se observó que al inhibir la señalización de PI3K y bloquear PDGFR las células presentaban apoptosis, sin embargo, después de haberse dado la TEM, la célula no necesita más de este circuito para sobrevivir, lo cual se demostró al inhibir PI3K y bloquear PDGFR y no observar muerte celular <sup>40</sup>. Los datos obtenidos en el presente trabajo pueden relacionarse con lo observado por estos investigadores, ya que las subpoblaciones deficientes en PDGFR presentan un fenotipo mesenquimatoso con expresión de vimentina y pérdida de E-cadherina y por lo que asumimos que han completado la TEM y en consecuencia no necesitarían la señalización dependiente de PDGFR para mantener su supervivencia. Asimismo, se demuestra que las subpoblaciones celulares de un tumor mamario, pueden encontrarse en diversos momentos de la TEM y a su vez expresar distintos RFC lo cual puede ser atribuible a la transición en que se encuentran o a los diversos estímulos provenientes de las mismas células tumorales o su entorno.

Este es el primer estudio llevado a cabo en un cultivo primario de un tumor mamario, en el que se demuestra un patrón mutuamente excluyente de varios RFC, marcadores de TEM y la fosfatasa PTP1B entre las subpoblaciones identificadas. La heterogeneidad demostrada en este trabajo, ubica a las subpoblaciones celulares de este cultivo primario en tres grupos fenotípicos. Observamos que las subpoblaciones celulares PDGFR+, MET-, PTP1B-, Her 1-, Her 2+, Her 3-, y VEGFR- (grupo fenotípico 2) mantienen el fenotipo epitelial con expresión de E-cadherina; mientras que las subpoblaciones PDGFR-, MET+, PTP1B+, Her 1+, Her 2+, Her 3+ y VEGFR + (grupos fenotípicos 1A y 1B) expresan vimentina, habiendo perdido en su mayoría la expresión de E-cadherina, lo cual les confiere un fenotipo mesenquimatoso. Las subpoblaciones del grupo 2 presentan una mayor tasa de proliferación celular, capacidad de migración celular y tumorigenicidad. Contradictoriamente, las subpoblaciones del grupo fenotípico 1 (A y B), a pesar de tener el fenotipo mesenquimatoso, mostraron una capacidad de migración y tumorigenicidad menor que la observada en las células con características epiteliales (grupo 2), lo cual probablemente esté relacionado a la redundancia en las vías de señalización existentes en una célula neoplásica, que es muy compleja y puede dar lugar a diversas respuestas

biológicas *in vitro*, además del papel importante que juega PDGFR y Her 2 en la capacidad de invasión y metástasis, siendo su sobre expresión un factor importante asociado a pobre pronóstico <sup>40-43</sup>. Asimismo, se debe considerar la interacción con los componentes del microambiente tumoral, como factor necesario para que las células neoplásicas adquieran incremento en su capacidad de migración, lo cual es imposible establecer en este modelo *in vitro*.

En cuanto a la respuesta a fármacos, observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular a concentraciones crecientes de lapatinib, doxorubicina, crizotinib y capecitabina. Sin embargo, la sensibilidad a los efectos del paclitaxel e imatinib es diferente en las subpoblaciones pertenecientes a los grupos fenotípicos. Se observó una mayor susceptibilidad en las células del grupo fenotípico 2 (PDGFR +, PTP1B -) y mayor resistencia en las células de los grupos 1A y 1B, lo cual es consistente con datos no publicados de nuestro grupo de trabajo, donde se ha observado que cultivos primarios de cáncer de mama PDGFR + PTP1B - son susceptibles al efecto citotóxico tanto de Imatinib como de Paclitaxel <sup>43,44</sup>. Estos hallazgos ubican a PDGFR y PTP1B como posibles marcadores predictivos de respuesta al tratamiento con Imatinib y taxanos, y serían útiles clínicamente al momento de escoger el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. Como se indicó previamente, las subpoblaciones celulares del grupo fenotípico 2 (PDGFR +) se caracterizaron por conservar marcadores epiteliales, lo cual podría tener una importante implicación terapéutica, ya que el bloqueo de PDGFR en etapas tempranas de la enfermedad podría disminuir el potencial metastásico de estas subpoblaciones en pacientes seleccionadas. Al respecto, una de las líneas de investigación que surgen de este trabajo, se debe centrar en determinar el grado de activación de los distintos RFC expresados, lo cual podría ayudar a crear “perfiles de heterogeneidad intratumoral” que permitan seleccionar a las pacientes para diversos tratamientos dirigidos, así como estrategias orientadas a la modulación del microambiente tumoral, fuente importante de factores de crecimiento celular. En el contexto de enfermedad en etapas tempranas se podría identificar subpoblaciones celulares con potencial metastásico, determinar su patrón de expresión de RFC y dirigir estrategias terapéuticas (adyuvantes o neoadyuvantes) encaminadas a la erradicación de las mismas, mientras que en enfermedad avanzada, un abordaje terapéutico adaptativo como el propuesto por Gatenby y colaboradores <sup>45,46</sup>, podría mantener un equilibrio entre las diversas subpoblaciones celulares, permitiendo prolongar la supervivencia de las pacientes.

Por otra parte, la mayoría de los trabajos publicados en la literatura, utilizan como modelos de experimentación líneas celulares comerciales, obtenidas principalmente de lesiones metastásicas, derrames pleurales o ascíticos. Estas líneas celulares son homogéneas, y su uso como modelos de experimentación tiene entre otros inconvenientes, el hecho de no haber sido parte del microambiente tumoral y las importantes interacciones que ahí se desarrollan <sup>17,18</sup>. Una de las fortalezas del presente estudio es que se ha realizado con subpoblaciones obtenidas de un tumor primario, y prácticamente todos los experimentos se han realizado en menos de 30 pasajes. Esto permite que nuestras conclusiones se basen en la expresión de marcadores de TEM y RFC, presentes al momento de la resección del tumor.

Finalmente, con los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que la expresión de RFC y marcadores de TEM es heterogénea en diferentes subpoblaciones de un cultivo primario de un tumor mamario, expresándose algunos de estos, de manera mutuamente excluyente. Esto tiene implicación en las funciones biológicas de las células neoplásicas (proliferación, migración y tumorigenicidad) así como respuesta a diversos fármacos y plantea interrogantes sobre el abordaje diagnóstico y terapéutico de las pacientes con cáncer de mama.



## 9. Bibliografía

1. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893–917. doi:10.1002/ijc.25516.
2. Chávarri-Guerra Y, Villarreal-Garza C, Liedke PER, et al. Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol*. 2012;13(8):e335–43. doi:10.1016/S1470-2045(12)70246-2.
3. Goldhirsch a, Winer EP, Coates a S, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206–23. doi:10.1093/annonc/mdt303.
4. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61–70. doi:10.1038/nature11412.
5. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393–8. doi:10.1073/pnas.1732912100.
6. Bloom H, Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957;11(3):359–77. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2073885&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed June 9, 2014.
7. Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, et al. The life history of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):994–1007. doi:10.1016/j.cell.2012.04.023.
8. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):979–93. doi:10.1016/j.cell.2012.04.024.
9. Gerlinger M, Rowan A. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012;366(10):883–892. doi:10.1056/NEJMoa1113205.
10. Martinez P, Birkbak NJ, Gerlinger M, et al. Parallel evolution of tumour subclones mimics diversity between tumours. *J Pathol*. 2013;230(4):356–64. doi:10.1002/path.4214.
11. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, et al. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2011;20(6):810–7. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.005.
12. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1420–1428. doi:10.1172/JCI39104.1420.

13. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1588–93. doi:10.2353/ajpath.2009.080545.
14. Berx G, Raspé E, Christofori G, Thiery JP, Sleeman JP. Pre-EMTing metastasis? Recapitulation of morphogenetic processes in cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24(8):587–97. doi:10.1007/s10585-007-9114-6.
15. Creighton CJ, Li X, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):13820–5. doi:10.1073/pnas.0905718106.
16. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):449–55. doi:10.1007/s10549-011-1373-x.
17. Ross DT, Perou CM. A comparison of gene expression signatures from breast tumors and breast tissue derived cell lines. *Dis Markers.* 2001;17(2):99–109. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3850857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
18. Prat A, Karginova O, Parker JS, et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;142(2):237–55. doi:10.1007/s10549-013-2743-3.
19. Gazdar a F, Kurvari V, Virmani a, et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer.* 1998;78(6):766–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9833771>.
20. Amadori D, Bertoni L, Flamigni a, et al. Establishment and characterization of a new cell line from primary human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;28(3):251–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8018954>.
21. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747–52. doi:10.1038/35021093.
22. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869–74. doi:10.1073/pnas.191367098.
23. Esparza-López J, Medina-Franco H, Escobar-Arriaga E, León-Rodríguez E, Zentella-Dehesa A, Ibarra-Sánchez MJ. Doxorubicin induces atypical NF-κB activation through c-Abl kinase activity in breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(10):1625–35. doi:10.1007/s00432-013-1476-3.
24. Imoukhuede PI, Popel AS. Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res.* 2011;317(7):955–65. doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.014.

25. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene*. 2011;30(12):1436–48. doi:10.1038/onc.2010.509.
26. Kokkinos MI, Wafai R, Wong MK, Newgreen DF, Thompson EW, Waltham M. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer-- observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):191–203. doi:10.1159/000101320.
27. Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, et al. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol*. 2005;206(4):451–7. doi:10.1002/path.1797.
28. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(18):3033–46. doi:10.1007/s00018-011-0735-1.
29. Kallergi G, Papadaki M a, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011;13(3):R59. doi:10.1186/bcr2896.
30. Cifone M a, Fidler IJ. Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine fibrosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(2):1039–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=348419&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 5, 2014.
31. Mori S, Chang JT, Andrechek ER, et al. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene*. 2009;28(31):2796–805. doi:10.1038/onc.2009.139.
32. Zou HY, Li Q, Lee JH, et al. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67(9):4408–17. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4443.
33. Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295(1):139–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10991971>.
34. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*. 2007;318(5848):287–90. doi:10.1126/science.1142946.
35. Paulson AK, Linklater ES, Berghuis BD, et al. MET and ERBB2 are coexpressed in ERBB2+ breast cancer and contribute to innate resistance. *Mol Cancer Res*. 2013;11(9):1112–21. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0042.

36. Qi J, McTigue M a, Rogers A, et al. Multiple mutations and bypass mechanisms can contribute to development of acquired resistance to MET inhibitors. *Cancer Res.* 2011;71(3):1081–91. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-1623.
37. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature.* 2012;487(7408):505–9. doi:10.1038/nature11249.
38. Engelman J a, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007;316(5827):1039–43. doi:10.1126/science.1141478.
39. McDermott U, Pusapati R V, Christensen JG, Gray NS, Settleman J. Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency. *Cancer Res.* 2010;70(4):1625–34. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3620.
40. Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, et al. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1–10. doi:10.1172/JCI24652.progression.
41. Eccles S a. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001;6(4):393–406. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12013529>.
42. Ai M, Liang K, Lu Y, Qiu S, Fan Z. Brk/PTK6 cooperates with HER2 and Src in regulating breast cancer cell survival and epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(3):237–45. doi:10.4161/cbt.23295.
43. Dip-Borunda AK, Escobar-Arriaga E, Esparza-López J, León-Rodríguez E, Jesús I-SM de. La presencia de PDGFR beta incrementa la proliferación, migración y capacidad tumorigénica en cultivos primarios de cáncer de mama. *Gac Mex Oncol.* 2013;12(6):382.
44. Garibay-Díaz JC, Esparza-López J, Hernández-Flores O, et al. Opposite response to Paclitaxel and Docetaxel in PTP1B expressing breast cancer cells. *Manuscr Submitt Publ.* 2013.
45. Gatenby R a, Silva AS, Gillies RJ, Frieden BR. Adaptive therapy. *Cancer Res.* 2009;69(11):4894–903. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3658.
46. Silva AS, Kam Y, Khin ZP, Minton SE, Gillies RJ, Gatenby R a. Evolutionary approaches to prolong progression-free survival in breast cancer. *Cancer Res.* 2012;72(24):6362–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2235.