



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y  
NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN  
DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA Y ONCOLOGÍA  
CURSO DE POSTGRADO DE ONCOLOGÍA MÉDICA**

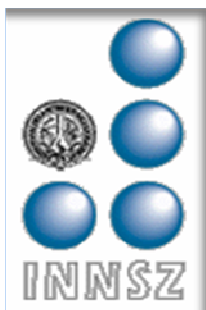
**“Uso del inhibidor de cinasa de residuos de tirosina Sunitinib para  
inducir incremento en la mortalidad en cultivos primarios de células  
de cáncer de mama resistente al agente de quimioterapia  
doxorubicina mediado por PDGF  $\beta$ ”**

**TESIS DE POSTGRADO  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN  
ONCOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENTA:  
DR. NOÉ VINICIO ANTONIO CASTRO SÁNCHEZ**

**TUTOR:  
DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ**

**COTUTOR:  
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**



MEXICO, D.F.

AGOSTO 2007



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.

---

**Dr. Eucario León Rodríguez**  
**Tutor de la Tesis**  
**Coordinador del Departamento de Hematología y Oncología Médica**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

---

**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**  
**Cotutor de Tesis**  
**Encargado del Departamento de Bioquímica**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

---

**Dr. Luís Fedederico Uscanga Domínguez**  
**Jefe de Enseñanza**  
**Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

<< Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones exteriores del Gobierno de México>>

### **Agradecimientos**

**A Dios:** Por permitirme ser hijo suyo y gozar de las múltiples bendiciones en mi vida, que sin su ayuda no sería la persona que soy.

**A mi esposa:** Danissa que importante ha sido tu apoyo y comprensión sin ti yo no podría disfrutar de forma completa mi vida como la vivo al día de hoy, gracias por estar a mi lado sin reproche, tu me completas Te amo negrita.

**A mi Hija:** Alejandra, llegaste a mi vida para demostrarme que lo simple es lo mas lindo, que a el amor le es intranscendente la distancia, que siempre tendré a alguien tan

especial como tu; has hecho que cada día mis pasos sean cuidadosos pues tengo a quien enseñar con el ejemplo.

**A *mis padres:*** Esmeralda y Noé Augusto por ser el mas claro ejemplo de lucha, honestidad y entrega; se que si llego a ser la mitad de excelente persona que son ustedes me dare por dichoso, los quiero mucho.

**A *mis sobrinos:*** Nicole y Karel son mis otros dos hijos; Nicole llegaste a mi vida en un momento difícil y llenaste mi mundo de amor, eres muy especial; Karel aunque aun no te conozco te amo mucho espero demostrarte lo especial que eres para mi.

**A *mi hermana:*** Karla, siempre te he admirado eres para mi la amiga incondicional se que puedo contar con vos para lo bueno y lo malo, has sido parte esencial en mi vida.

**A *mis hermanos:*** Manuel Augusto (q.e.p.d.) que se que siempre me has acompañado en mi vida y has sido mi ángel guardián; Jaroslav que me ha demostrado que la fuerza de voluntad y el amor lo logran todo, no tengo como agradecerte que hallas sido el “papa sustituto” de Ale te quiero mucho.

**A *mis abuelos:*** en especial a Manuel de Jesús Sánchez (q.e.p.d.) por ser el primero en saber que iba a llegar hasta donde estoy, se que siempre me has acompañado.

**A *mis suegros:*** por su cariño, y haberme otorgado su confianza.

**A *mis cuñadas:*** Dary, Nancy, Tania y Patricia por darme alegría, cariño y aceptarme como su hermano.

**A *mis maestros:*** Dr. Eucario León, Dr. Roberto de la Peña, Dr. Dan Green, Dr. Alejandro Zentella, Dra. Maria de Jesús Ibarra, Dr. Claudio Ramírez, Dra. Miriam Juárez, Dra. Iris Cazalli; que con sus enseñanzas y dedicación me mostraron el camino para llegar a la meta, de cada uno aprendí infinidad de enseñanzas.

**A *mis compañeros de residencia:*** Que de todos aprendí algo valioso.

**A *mis amigos:*** Miguel Moya, Juan Pablo, Julio, Eify, Victor, Zully y Juan Luís (q.e.p.d.) por su apoyo y amistad.

**A *mis pacientes mexicanos:*** Seria injusto mencionar tan solo algunos, pero de todo corazón les agradezco su confianza y cariño; y darme muchas enseñanzas de vida.

## Índice

Justificación	.....4
Objetivos	.....5
Hipótesis	.....6
Introducción	.....7
Material y Métodos	.....14
Resultados	.....17
Discusión de Resultados	.....27
Conclusiones	.....31
Anexo	.....32
Bibliografía	.....33

## **Justificación**

Se decidió realizar el estudio de “Uso del inhibidor de la cinasa de residuos de tirosin Sunitnib para inducir incremento en la mortalidad en cultivos primarios de células de cáncer de mama resistente al agente de quimioterapia doxorubicina mediado por PDGFR  $\beta$  (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\beta$ )”, dada la importancia que cáncer de mama en el país. El aumento de la tasa de mortalidad en los últimos años requiere de tratamientos efectivos en estas pacientes. El uso de inhibidores de cinasas de residuos de tirosina en otros tumores ha representado ventajas en supervivencia libre de enfermedad y periodos prolongados libre de enfermedad. Es importante encontrar medicamentos o combinaciones de los mismos que ayuden a revertir la resistencia a una droga de amplio uso en todos los contextos del cáncer de mama, y es por eso que se decidió efectuar este estudio. La inhibición del PDGFR  $\beta$  se ha estudiado en otros tumores y muy brevemente en cáncer de mama, por lo que es importante tener la experiencia en células de tumores de pacientes mexicanas.

## **Objetivos**

1. Demostrar la resistencia al agente de quimioterapia doxorubicina en líneas celulares y cultivos primarios de cáncer de mama.
2. Evaluar la efectividad citotóxica y/o citoestática del sunitinib en líneas y cultivos primarios de cáncer de mama.
3. Valorar la respuesta citotóxica y/o citoestática al tratamiento combinado de sunitinib y doxorubicina en células resistentes a la doxorubicina.
4. Demostrar inhibición de la fosforilación del PDGFR B por el sunitinib.



## Hipótesis

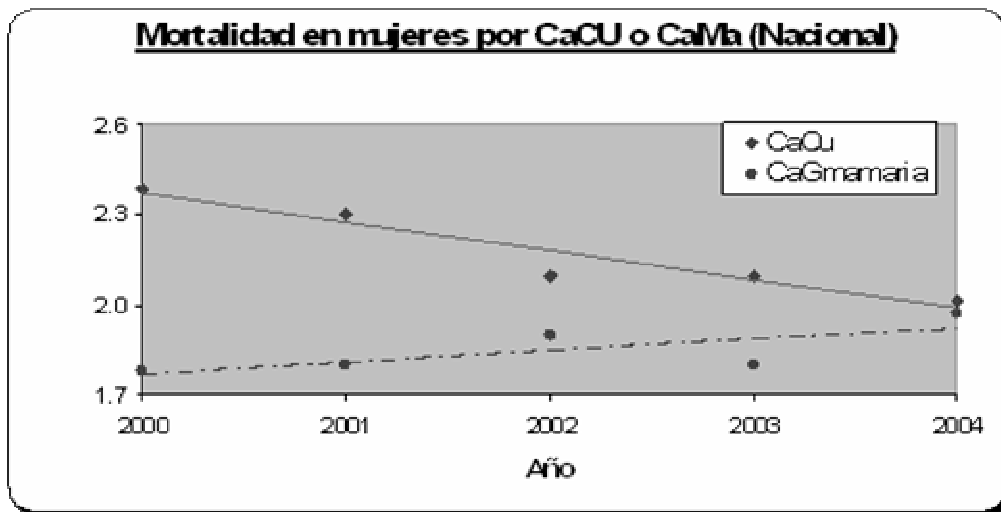
El uso del inhibidor de cinasa de residuos de tirosina Sunitinib incrementa la mortalidad celular en cultivos primarios de células resistentes a la doxorrubina mediado por la acción del PDGFR  $\beta$ .

Hipótesis Nula:

El uso del inhibidor de cinasa de residuos de tirosina Sunitinib no incrementa la mortalidad celular en cultivos primarios de células resistentes a la doxorrubina mediado por la acción del PDGFR  $\beta$ .

## Introducción:

Cáncer de Mama: El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en EEUU y en México, la incidencia ha ido aumentando en 1-2% anualmente desde 1960. Se esperaba para el 2002 se diagnosticaran 1,151,298 casos nuevos en EEUU, en México se diagnostican 25 nuevos casos día. El mayor número de casos se presentan en países desarrollados, la tasa de mortalidad en EEUU ha ido disminuyendo, actualmente, se encuentra en 20 por 100,000 habitantes. En contraste, en México la tasa de mortalidad no ha disminuido, al contrario, ha tenido una tendencia al incremento, para el 2004 la mortalidad en el país era de 2 por 100,000 habitantes, como se muestra en la grafica. (1) (2)



Fuente: Base de Mortalidad del INEGI, Base de Población CONAPO 2004

La incidencia de cáncer de mama a la edad de 25 años es de 10 en 100,000 y esto se incrementa hasta 100 veces a la edad de 45 años (3) siendo uno de los principales factores de riesgo como se muestra en la siguiente tabla

Edad	Riesgo Relativo
Localización Geográfica	5
Densidad Mamaria	>5
Edad de la menarca	3 (antes de los 11 años)
Edad a la menopausia	2 (después de los 54 años)
Edad al 1er embarazo a termino	3 (1er hijo después de los 40 años)
Historia Familiar	>2
Enfermedad Benigna de la mama	4-5
Cáncer en la otra mama	>4
Índice de Masa Corporal	2 (Posmenopáusicas)
Consumo de alcohol	1 (10 g/d)
Exposición a radiación ionizante	3
Anticonceptivos orales	2
Terapia de reemplazo hormonal	1.14

Datos tomados (4)

El factor pronóstico mas importante en la enfermedad es el estadio en el que se encuentre la paciente, siendo la supervivencia a 5 años de un estadio I es de 90% mientras que una paciente que se diagnostica en estadio IV su supervivencia a 5 años es de 18%.(4)

Otro factor importante para recurrencia de la enfermedad es la presencia y el número de ganglios linfáticos positivos, documentándose un 54% de probabilidad de recurrencia para más de 4 ganglios y una supervivencia del 13% a 10 años ((2)). El estado de los receptores

hormonales (estrógeno y progesterona) también es un factor pronóstico importante siendo mejor el tener ambos positivos, en los estadios II con receptores hormonales positivos la probabilidad de recurrencia es de 14% a 10 años. Otro de los factores pronósticos, que actualmente se toma como indispensable para la decisión de recibir y elegir que tipo de quimioterapia, es el HER-2/neu, un miembro de la familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) por sus siglas en inglés, el cual se encuentra sobre expresado en el 16-26% de los cánceres de mama.( 5))

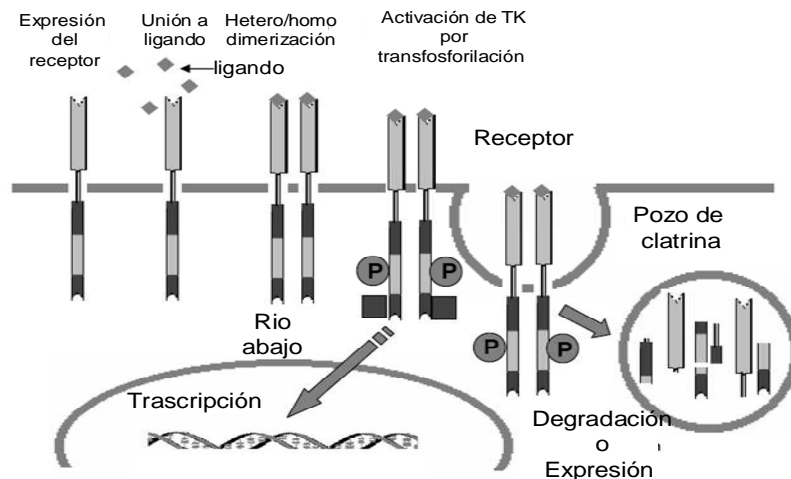
Ya que el cáncer de mama es una enfermedad multifactorial y compleja, el estudio y comprensión de las diferentes vías de señalización nos han permitido valorar su importancia. Ya que las proteínas cinasas de tirosina (PTKs del inglés protein tyrosine kinase), tiene un papel central en los procesos de señalización han sido motivo de estudio como factores pronóstico y posibles blancos de tratamiento.

Generalidades de las PTKs: Los organismos multicelulares se desarrollan en un medio por demás complejo en donde las vías de señalización contribuyen a procesos críticos, para su existencia. Las PTKs son importantes mediadores en las vías de señalización de transducción, que conllevan a la proliferación, diferenciación, migración, metabolismo y muerte celular programada ((6)). Las PTKs son una familia de enzimas, que catalizan la fosforilación de residuos selectos de tirosina de sus proteínas blanco, transfiriendo el fosfato en la posición  $\gamma$  del ATP al hidroxilo de la tirosina. Los estudios genómicos en los últimos 25 años han revelado que el genoma humano contiene cerca de 90 PTKs y muchas de las cuales están involucradas en múltiples pasos para el desarrollo y progresión del cáncer. Muchas de las vías de señalización donde participan las PTKs están alteradas de manera genética y epigenética en las células tumorales lo cual brinda ventajas proliferativas, de sobrevivencia y resistencias a los tratamientos estándar del cáncer.

El oncogen *src* fue la primera PTK identificada como agente transformante(7) ((6)) y mutaciones en el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)( 8)) se asocian a tumores estromales del tracto gastrointestinal (GIST) y Leucemia mieloide crónica (LMC); esta dicotomía demostró que existen 2 tipos de PTKs: los TRKs que son proteínas transmembranales que tienen un dominio de unión a un ligando extracelular y un dominio de cinasa intracelular y las PTKs que no son receptores, carecen de dominios transmembranales y se encuentran en el citoplasma, en el núcleo o en la superficie interna de la membrana celular.(9)

### Mecanismos de activación de las TRK's:

Los TRK's se activan al unir su ligando a su dominio extracelular, los cuales son moléculas de señalización extracelular (por ejemplo EGF, PDGF), lo que en la mayoría de los casos induce la dimerización del receptor (excepto el receptor de insulina), lo que conlleva a la activación de las PTKs, como se ilustra en el siguiente esquema. (9)



### Activación oncogénica de las PTKs:

Un mecanismo común en la activación de las PTKs de los cánceres hematológicos es la fusión de un receptor o no receptor PTK con una proteína sobre expresada en estas células, usualmente como consecuencia de una translocación cromosomal, lo que produce una oligomerización constitutiva de la PTK, aun en ausencia del ligando, el ejemplo clásico es BCR-ABL en LMC. El segundo mecanismo es una mutación que neutraliza los mecanismos de autorregulación de la PTK, como ocurre con SRC y finalmente, el tercer mecanismo es la expresión aberrante o aumentada del TRK, su ligando o ambos ((9)).

El Her2/Neu se encuentra amplificado en el 25% de las pacientes con cáncer de mama, alteración de mal pronóstico en las pacientes que la presentan. El Her2/Neu es un miembro de la familia del EGFR. Generalmente, los ligandos para EGFR, como el factor crecimiento epidérmico (EGF del inglés epidermal growth factor) se sintetizan como precursores transmembranales y se anclan en la membrana. Por medio de las metaloproteinasas alcanza la madurez y se liberan como ligandos solubles que activan el proceso de señalización ya antes descrito en sus células blanco(10). En el cáncer de mama, donde se encuentra sobreexpresado el receptor Her2/Neu, tiene una implicación clínica y

terapéutica importante, lo que llevo al desarrollo de un tratamiento específico en este grupo de pacientes con un anticuerpo monoclonal contra (Her2/Neu). (10) Se ha tratado de encontrar otras asociaciones entre las vías de señalización de TRKs en el proceso de carcinogenesis. Nosotros hemos estudiado en particular el sistema PDGF/PDGFR (PDGF del inglés platelet derived growth factor/ PDGFR platelet derived growth factor receptor) en el cáncer de mama. El factor de crecimiento derivado de plaquetas es un mitógeno potente que además activa vías antiapoptóticas en la células mesenquimales, consiste de dos cadenas polipeptídicas PDGFA y PDGFB, que se unen por puentes disulfuro y se codifican por dos genes diferentes localizados en los cromosomas 7 y 22 respectivamente. (11) Estudios *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama, MCF7, y en muestras de tejido de tumor de glándula mamaria, han demostrado la expresión de PDGF utilizando ensayos tipo Northern blot y Western blot. Los PGFRs  $\alpha$  y  $\beta$  mantienen las mismas características que todos los TRKs, la activación de estos receptores tienen una función importante en la embriogénesis, y su ya conocida implicación en los tumores estromales del tracto gastrointestinal. Mucho de lo reportado en la literatura es la acción paracrina que ejercen sobre diferentes líneas celulares (11) (12). Existe un único trabajo de señalización autocrina de PDGFR en el que se demostró que hay una retroalimentación positiva con la vía de señalización del TGF- $\beta$  en la transición de mesenquima a epitelio en células mamarias y en tumores de glándula mamaria de ratones, por lo que se considera un paso crítico de regulación de la maduración del tejido mamario ((13)).

PTKs como blanco terapéutico: El advenimiento de las terapias blanco dirigido a vías de señalización integrales del tumor. Esta aproximación ha permitido evidenciar la complejidad y el número de PTKs pero no se han obtenido los efectos curativos esperados. Todos estos estudios desembocaron en el desarrollo de múltiples fármacos que actúan como inhibidores relativamente específicos de PTKs y TRKs. A partir de 1971 la investigación en cáncer a tenido su máximo apogeo, a finales de 1980 se encontró evidencia de inhibidores de PTKs de bajo peso molecular, esta inhibición se abordado de diferentes formas: i) tratando de interferir con el sitio de unión a ligando (TRKs), o ii) con proteínas como substrato (NTRKs). Estas aproximaciones tuvieron poco o nulo efecto, sin embargo, la aproximación que ha demostrado ser exitosa ha sido el diseño de inhibidores competitivos de ATP. (9)

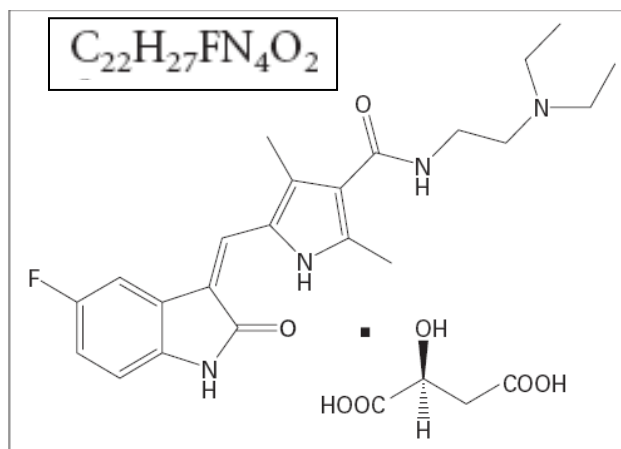
El sitio de unión a ATP tiene las siguientes características:

- a) Región de Adenina: contiene dos puentes de hidrogeno formados por la interacción N-1 y N-6 del grupo amino del anillo de adenina, muchos de los inhibidores potentes utilizan uno de estos sitios de unión.
- b) Región de Azúcar: se conforma de dos regiones: una región hidrofílica (ausente en EGFR), y una bolsa hidrofóbica que no participa en la unión del ATP, que es la que produce la selectividad de los inhibidores.
- c) Canal Hidrofóbico: que tampoco utiliza el ATP y puede ser empleado para la especificidad de los inhibidores.
- d) Región del sitio de unión a fosfato: que se ha utilizado para mejorar la selectividad del inhibidor.

Específicamente, todos los inhibidores empleados actualmente simulan al ATP. Al seguir el linaje evolutivo de los TRKs se tiene muchas similitudes dentro de los dominios de cinasa, lo que ha justificado el uso de fármacos desarrollados contra una PTK o TRK contra otros miembros de estas familias para los que fueron diseñados en un inicio. (9)

De todos los inhibidores de TRKs que se han desarrollado los más exitosos son Imatinib, Gefitinib, Erlotinib y más recientemente Sunitinib del que desarrollaremos más ampliamente a continuación. (8)

**Sunitinib:** El maleato de Sunitinib (SU11248 Pfizer Inc., New York, NY, USA), es una molécula pequeña que se administra por vía oral, su diseño le permite inhibir a una serie de TRKs dentro de los cuales se incluye a el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR del ingles vascular endotelial growth factor receptor) tipos1 y 2, PDGFR, el receptor de células madres c-KIT. En su desarrollo químico el sunitinib es una droga con alta solubilidad y estabilidad en el suero, y con una unión, en humanos y ratones, a proteínas plasmáticas hasta en un 95% comparado con otros inhibidores de TRKs ((14)) abajo se detalla la formula de la sal de maleato de sunitinib.



Diferentes líneas de evidencia apoyan la inhibición de VEGFR, PDGFR y el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 1 (FGFR1 del inglés Fibroblast growth factor receptor 1), por Sunitinib. En ensayos bioquímicos y celulares la inhibición de estas PTKs se ha logrado incluso a niveles de concentración tan bajos como nM. Su desarrollo básico principal fue el de su papel antiangiogénico, en donde demostró que producía aumento de la apoptosis y migración de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC del inglés human umbilical vein endothelial cells), pero como la mayoría de estas moléculas que se desarrollan se le ha documentado actividad contra otras PTKs para las cuales no fue diseñado, tiene acción sobre FLT3 (del inglés fms-related tyrosine kinase) que se produce en los precursores inmaduros hematopoyéticos, c-KIT y el factor estimulante de colonia-1R que está en los precursores de monocitos. En ensayos *in vitro* e *in vivo* para el cáncer de mama ha demostrado el sunitinib su eficacia encontrando regresión tumoral en modelos murinos en un rango de 88 a 90% en el volumen tumoral, en modelos de metástasis también inhibe la progresión de la enfermedad. (15)

En estudios clínicos fase II y fase III el sunitinib ha demostrado ser efectivo en el tratamiento del cáncer renal metastático por lo que fue aprobado por la FDA para el tratamiento de esta enfermedad. En los GIST también ha demostrado efectividad clínica, incluso en los pacientes que desarrollan resistencia al imatinib, su efectividad se ha probado en otros tumores sólidos; en cáncer de mama metastático se evaluó el uso como monoterapia en pacientes refractarios al tratamiento con antraciclinos y taxanos, con una tasa de respuesta del 14% que se correlacionó con descenso de VEGF circulante y que pudiera ser un marcador de respuesta al tratamiento. (16)



## **Materiales y Métodos**

**Reactivos.** El anticuerpo anti-fosfotirosina (4G10) fue obtenido a partir de fluido ascítico. Los anticuerpo primario PDGFR fueron comprados de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo anti-tubulina, el MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide), y la adriamicina fueron comprados a Sigma.

**Cultivo de Células de Cáncer de Glándula Mamaria.** Las líneas celulares T47D y ZR-75-30 fueron generosamente donadas. Las células fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI-1640 libre de rojo fenol (MicroLabs S.A. México) suplementado con 10% de suero fetal de bovino, antibióticos y antimicóticos. Los cultivos celulares fueron generados a partir de explantes derivados de una biopsia obtenida a partir de distintos procedimientos quirúrgicos de pacientes con cáncer de mama (Protocolo aprobado por el Comité de Ética ()) las características de las pacientes se describen en anexos. Brevemente, el tejido fue cortado en trozos pequeños y sembrados como explantes y sembrados en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal de bovino. Las células se dejaron crecer hasta que llenaron el plato de cultivo. Estas células fueron tripsinizadas y mantenidas como cualquier línea celular. La inmortalización se asumió después de mantenerse en crecimiento continuo *in vitro* por más de dos meses, el proceso se ilustra en anexos.

**Ensayo de Citotoxicidad Doxorubicina.** Para los ensayos de citotoxicidad, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 10% de suero fetal de bovino para los ensayos con el fármaco doxorubicina. Al siguiente día dosis definidas de adriamicina fueron adicionadas y 48 h después de la adición de ésta la viabilidad fue evaluada agregando 20 µl MTT a 5mg/ml por 4 h. La sal de formazan precipitada fue disuelta en 500 µl de isopropanol ácido y 500 µl de PBS y la densidad

óptica fue leída a 570 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de la absorbancia de las células tratadas sobre las células control no tratadas. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y se repitieron al menos tres veces de manera independiente.

***Ensayo de Citotoxicidad Sunitinib.*** Para los ensayos de citotoxicidad, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 0.10% de suero fetal de bovino para los ensayos con el fármaco sunitinib. Al siguiente día dosis definidas de sunitinib fueron adicionadas y 48 h después de la adición de ésta la viabilidad fue evaluada agregando 20 µl MTT a 5mg/ml por 4 h. La sal de formazan precipitada fue disuelta en 500 µl de isopropanol ácido y 500 µl de PBS y la densidad óptica fue leída a 570 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de la absorbancia de las células tratadas sobre las células control no tratadas. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y se repitieron al menos tres veces de manera independiente.

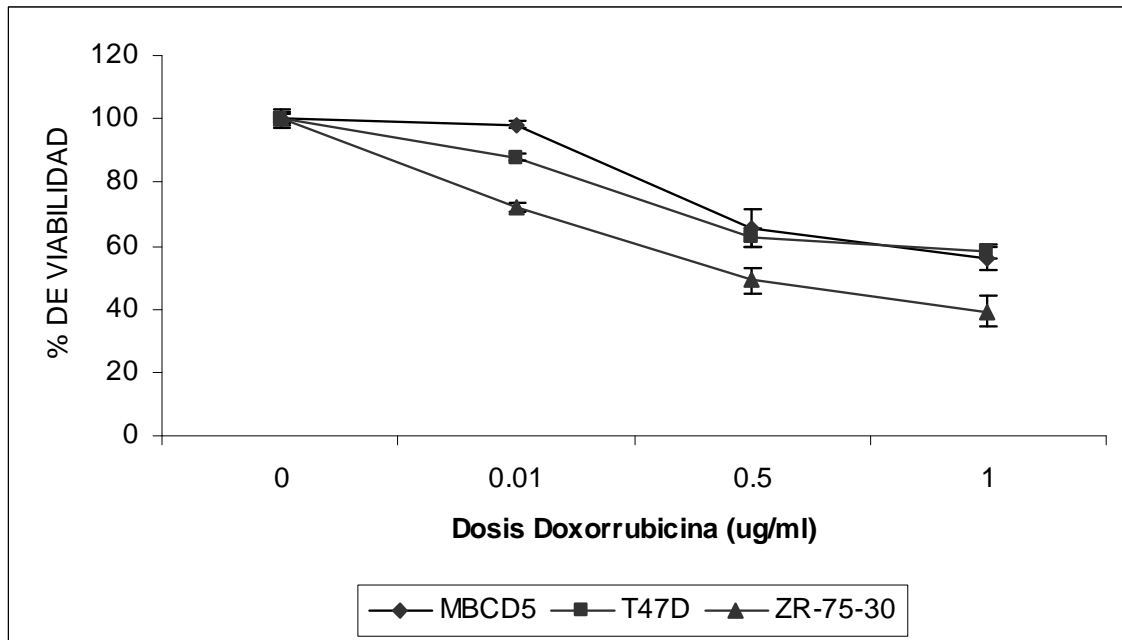
***Ensayo de Citotoxicidad Doxorrubicina mas Sunitinib.*** Para los ensayos de citotoxicidad, las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 0.10% de suero fetal de bovino para los ensayos con la combinación de fármacos. Al siguiente se administro doxorrubicina 0.1g/ml fueron adicionadas y 48 h después de la adición de ésta la viabilidad fue evaluada agregando 20 µl MTT a 5mg/ml por 4 h. La sal de formazan precipitada fue disuelta en 500 µl de isopropanol ácido y 500 µl de PBS y la densidad óptica fue leída a 570 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de la absorbancia de las células tratadas sobre las células control no tratadas. Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y se repitieron al menos tres veces de manera independiente.

**Western Blot e Inmunoprecipitación.** Las células se sembraron en cajas de petri en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 10% de suero fetal de bovino se dejó que las células tuvieran confluencia del 100% y posteriormente se realizaba 3 lavados con PBS y se dejaban 24 hrs con en medio RPMI-1640 libre de rojo fenol con 0.10% de suero fetal de bovino posteriormente fueron tratadas con sunitinib a distintas concentraciones e imatinib a 1  $\mu$ M durante 30 minutos. Luego, fueron lisadas en un buffer de lisis que contiene 50 mM HEPES (pH7.4), 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1 % Nonidato P-40, 10 mM NaF, 1 mM Vanadato de Sodio y 1X mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free; Roche). Treinta microgramos de proteína fueron sometidos a una electrofóresis en un gel de poliacrilamida desnaturizante y se transfirió a una membrana Immobilon-P PVDF (Millipore Corp., Bedford, MA). Los Western Blots se realizaron con los anticuerpos primarios anti-fosfotirosina (4G10), PGGF  $\beta$  o tubulina. Anticuerpos secundarios anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) se utilizaron según se requirió. La señal fue visualizada por quimioluminiscencia y expuesta a una película radiográfica (Kodak). Para la inmunoprecipitación de PGFR B, 500  $\mu$ g de proteína de lisados totales fueron incubados con anti-PDGFR B y proteína A sefarosa (Invitrogen) toda la noche a 4°C en agitación suave. Los inmuno-complejos fueron lavados tres veces con buffer de lisis y la proteína fue eluida de la sefarosa con buffer de muestra 2X. Las muestras se sometieron a una electrofóresis en geles de acrilamida desnaturizantes y se transfirieron a membranas Immobilon-P PVDF. Posteriormente, se realizaron. Western blots como se mencionó arriba.

## Resultados:

### Resistencia a Doxorubicina:

Los agentes quimioterapéuticos empleados en el tratamiento de cáncer de mama deberán ofrecer principalmente dos parámetros como lo son eficacia y seguridad. Al observar resistencia a algún fármaco, es de suma importancia investigar cuáles son las opciones terapéuticas para vencer dicha resistencia. Por tal motivo hemos generado un sistema de cultivo *in vitro* que permitiera estudiar la resistencia a adriamicina y como contrarrestarla. Con este propósito en un principio determinamos cuáles líneas celulares y cultivos primarios de células de cáncer de mama presentaban resistencia a doxorubicina *in vitro*. La figura 1 muestra una curva de viabilidad dosis respuesta con el agente de quimioterapia doxorubicina en dos líneas celulares de cáncer de mama como lo son T47D y ZR-75-30; y las células tumorales de cáncer de mama generadas de los cultivos primarios MBCD5. Los resultados muestran que hay células resistentes a la doxorubicina, como la línea T47D así como las células del cultivo primario MBCD 5. En contraste encontramos células sensibles a la doxorubicina, como las células de la línea ZR-75-30 en donde si se documenta una disminución de la viabilidad mayor al 50% no así en con las células de T47D y MBCD5 con 1 µg/ml de doxorubicina.

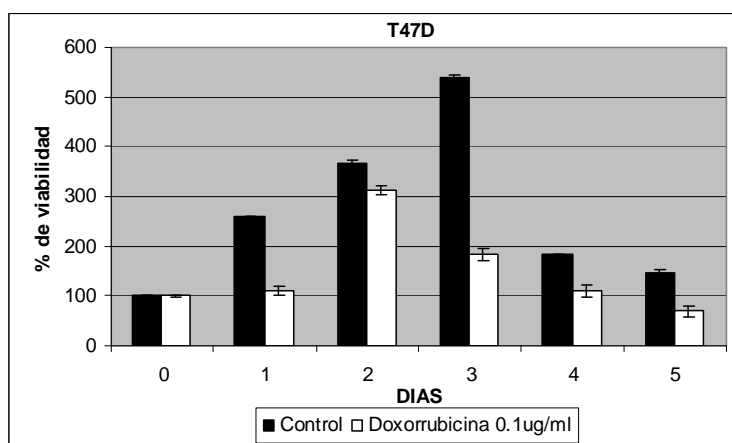


**Fig. 1 Curva de dosis respuesta a Doxorubicina:** Las células se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 7,500 células/cm<sup>2</sup> con SFB al 10% aplicándose a las células diferentes concentraciones de doxorubicina. La viabilidad celular se evaluó a las 48 h mediante la reacción de MTT. Los resultados representan el promedio  $\pm$  la desviación estándar (DS) de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

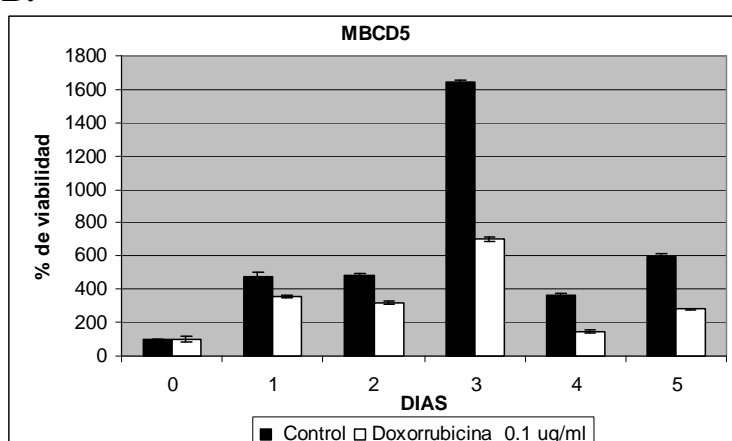
Es de suma importancia el encontrar a las células tumorales que son resistentes a un agente de quimioterapia como la doxorrubicina que es el pilar de múltiples tratamientos en cáncer de mama. El sistema in Vitro nos permitió evaluar como se comportan estas células en un curso temporal con el tratamiento. Sabemos que la mayoría de los tratamientos buscan generar citotoxicidad con el propósito de erradicar al mayor número de células tumorales y así disminuir la capacidad del tumor de formar focos metastáticos, por lo analizamos la viabilidad de las células resistentes que no lograba erradicar el fármaco. La Figura 2 muestra la viabilidad celular a lo largo de un curso temporal de 5 días con doxorrubicina en los dos cultivos celulares resistentes (T47D Y MBCD5).

**Figura No. 2**

**A.**



**B.**



**Figura 2**  
**Curso temporal de respuesta a doxorrubicina en T47D (A) y MBCD5 (B)**

Se sembró en placas de 24 pozos a una densidad de 7,500 cel/cm<sup>2</sup> con SFB al 10% aplicándose a las células doxorrubicina a 0.1 ug/ml a las 24 hrs de haber sembrado las células, evaluando la viabilidad celular, el día 0 representa el análisis a las 30 minutos de aplicada la droga y posteriormente a las 24 hrs. y sucesivamente, mediante la reacción de MTT, los resultados representan la DS promedio de tres experimentos independientes

Se ve claramente que estas células control (barras negras) proliferan bastante bien en las condiciones del cultivo alcanzando saturación al tercer día, la aparente caída en viabilidad posterior se asocia a la falta de proliferación que se presenta cuando el cultivo se satura. En las células que fueron tratadas con una concentración fija de doxorubicina (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) se observa que el medicamento disminuye la proliferación por lo que presenta más un efecto citoestático que citotóxico. En las células T47D (A) tratadas con doxorubicina presentan siempre una menor viabilidad que las no tratadas pero el patrón de viabilidad a lo largo del tiempo es semejante al de las células no tratadas, excepto que no se presente el pico máximo de proliferación a los 3 días. En las células MBCD5 (B) tratadas con doxorubicina ocurre algo semejante a las T47D. Los incrementos a los 3 y 5 días sugieren que a esta concentración el fármaco no anula la capacidad de división de las MBCD5, comportamiento que no se presenta en las T47D.

#### **Respuesta al Sunitinib:**

Existiendo ya en la literatura estudios clínicos en cáncer de mama con el inhibidor de TRK sunitinib en pacientes que son refractarias al tratamiento con atraciclenos y taxanos, lo importante de valorar su efecto a nivel *in vitro* es que así como las pacientes son un grupo heterogéneo los cultivos celulares conservan esta característica por lo que es interesante observar el comportamiento de los cultivos generados y compararlos con las células resistentes a la doxorubicina. En la figura 3 se evaluó el comportamiento de las diferentes cultivos primarios de células de cáncer mamario generadas por nosotros (protocolo aprobado por el comité de ética) y a la línea T47D. El Sunitinib se aplicó a diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1  $\mu\text{M}$ ). Se pudo establecer que primero las células si son sensibles al tratamiento con el sunitinib, disminuyendo el porcentaje de viabilidad celular en forma dependiente de la concentración; se ve claramente que no existe una línea celular que sea resistente aunque cabe notar que este medicamento no es citotóxico. El análisis microscópico de los cultivos reveló que frecuentemente se dejaban de observar figuras mitóticas indicativas de división celular activa. Lo que si se puede hacer notar es la variedad en cuanto a sensibilidad de las distintas células de los cultivos primarios. En las células MBCD3 se obtuvo una disminución en la viabilidad celular desde concentraciones de 0.01 siendo esta su  $\text{IC}_{50}$ , por el contrario, la  $\text{IC}_{50}$  en la mayoría de las células se alcanzó con concentraciones mayores, frecuentemente en el rango de 0.1  $\mu\text{M}$  de sunitinib. También se observa es que el incrementar a 1  $\mu\text{M}$  no disminuye la viabilidad celular incluso en las células mas sensibles.

### **Combinación de Sunitinib con Doxorrubicina:**

Teniendo en mente la resistencia de las líneas celulares al agente de quimioterapia adriamicina se decidió utilizar un inhibidor de TRK que es el sunitinib, para valorar la respuesta de la combinación de los dos fármacos, en algunos de los tratamientos con estas moléculas pequeñas, las combinaciones con agentes citotóxicos son las que producen mayores respuestas. En la figura 4 se observa el efecto de asociar el sunitinib con la doxorrubicina, se valoró en 6 líneas celulares de cáncer de mama generadas de los cultivos primarios, en la línea celular T47D y en células de mama normal generadas también de un cultivo primario; como ya se había observado anteriormente existe una heterogeneidad en cuanto a la respuesta de los diferentes cultivos primarios de los tumores primarios de cáncer de mama; se observa una disminución en la viabilidad celular en todas las células de los cultivos, lo importante y lo primero que se desprende de esta gráfica es que las células normales de cáncer de mama no presentan toxicidad en el tratamiento con las concentraciones crecientes de sunitinib, se observa una disminución en la viabilidad celular cuando se agrega la doxorrubicina ( $p = 0.71$ ), en estos experimentos de adición de los dos medicamentos se observa que el efecto en la gran mayoría de los casos para provocar una disminución en la viabilidad celular con una dosis de sunitinib de  $0.01 \mu\text{M}$  más doxorrubicina a  $0.1 \mu\text{g/ml}$  alcanzando con esta dosis su  $\text{IC}_{50}$  siendo en todas las líneas estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ), haciendo un análisis en el incremento de porcentaje de mortalidad de todas las células generadas en los cultivos primarios se puede observar interesantemente que aunque existen diferentes porcentajes de respuestas hay células mucho más sensibles que con dosis bajas incluso de  $0.001$  presentan incremento en la mortalidad celular (MBCD18, MBCD11, MBCD10 y MBCD3), y ocurre que al incrementar la dosis del sunitinib hasta  $1 \mu\text{M}$  se pierde progresivamente el incremento de la muerte celular.

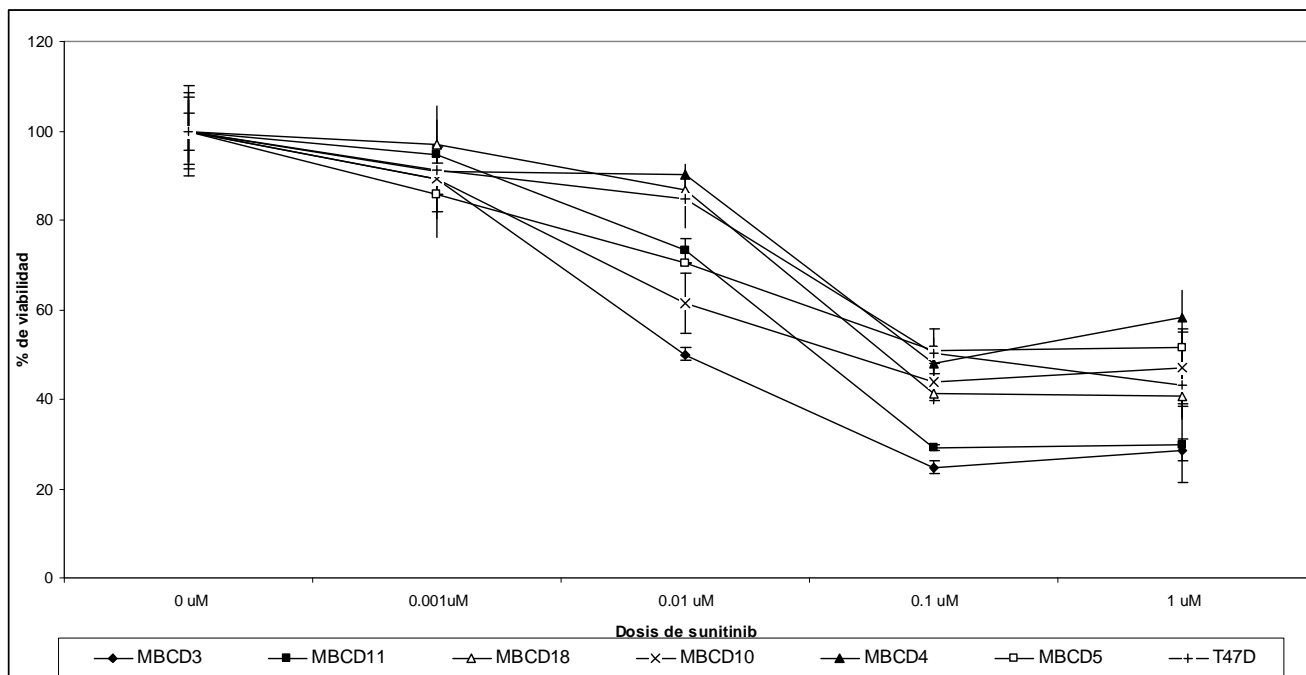
### **Inhibición de la fosforilación de residuos de tirosina mediada por el sunitinib**

Lo más sencillo que se obtuvo de los ensayos de viabilidad con el inhibidor de TRKs sunitinib se observó que en células de cultivos primarios de tumores de cáncer de mama si existe un efecto directo sobre la viabilidad de las células lo que si sabemos es que su acción principal es sobre la fosforilación de los residuos de tirosina principalmente de VEGFR y PDGFR, lo que quisimos ejemplificar con el siguiente experimento que se puede observar en la figura número 6 es la acción no específica del inhibidor de TRKs se colocó el sunitinib a diferentes concentraciones (0.01 y 0.1  $\mu\text{M}$ ) teniendo como control al imatinib que se administró a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  y se observa que a las dosis más bajas del sunitinib se ve un incremento en la intensidad de una banda que no se encuentra en el rango de peso molecular para un residuo de tirosina, y al aumentar la dosis si se observa una disminución en las bandas que por peso molecular corresponden a residuos de tirosina lo que demostró que el sunitinib tiene un efecto no selectivo al igual que con el imatinib donde se observa una desaparición total de las bandas de fosforilación.

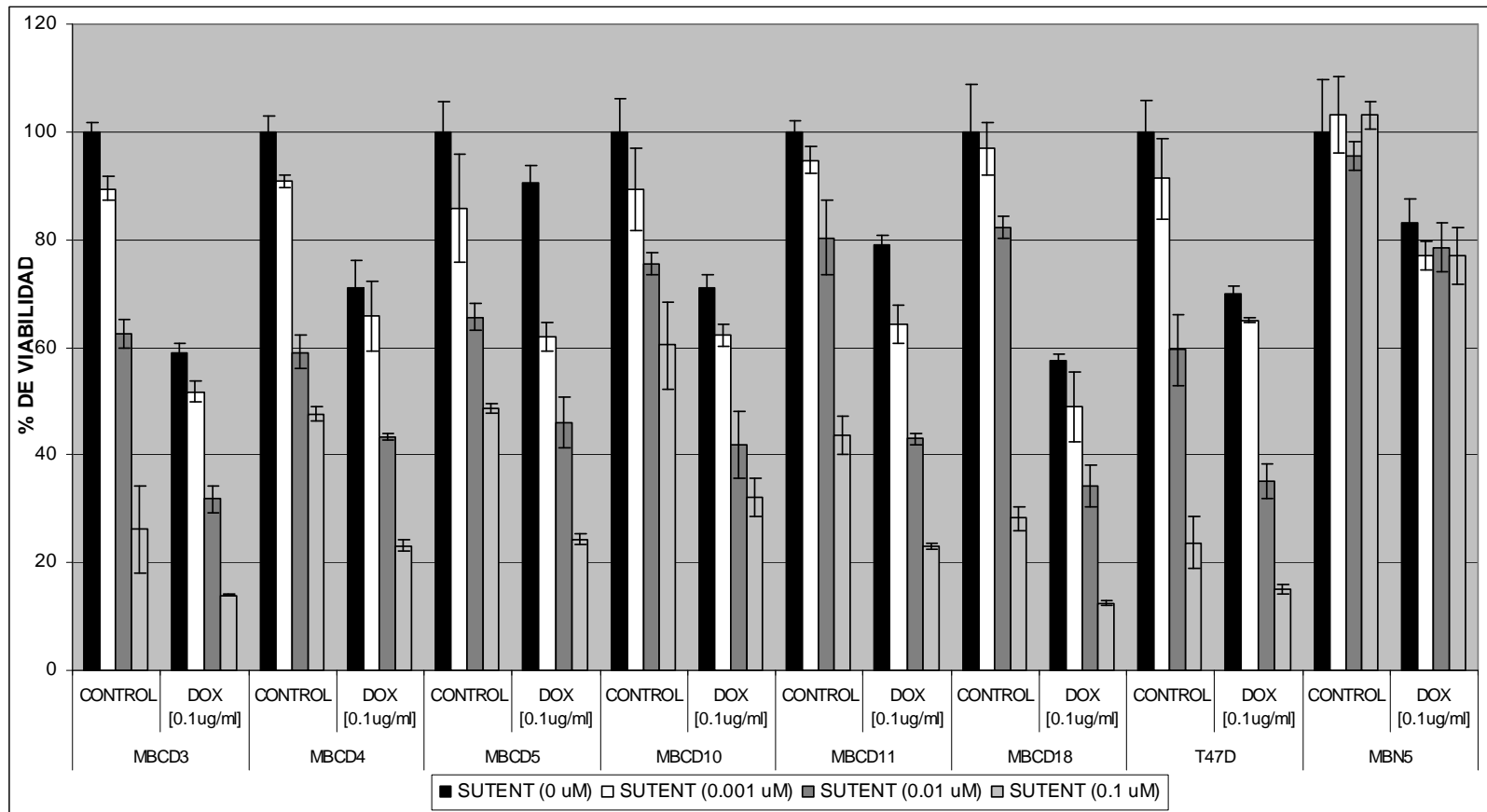
### **Inhibición de la fosforilación de PDGFR mediada por el sunitinib**

Posteriormente se realizó una valoración de la presencia del PDGFR en las líneas celulares algo que en realidad no es muy frecuente dentro de las células tumorales ya que se tiene evidencia de una acción paracrina más que autocrina, por lo que primero se realizó fue evaluar la presencia del PDGFR total en lisados de las células, al tener un resultado positivo encontrándose mayor intensidad de las bandas en la línea celular T47D aunque en las células obtenidas del cultivo celular primario MBCD5 también presentaron positividad para el PDGFR, por lo que a continuación se administró a diferentes concentraciones el sunitinib (0.001 y 0.01  $\mu\text{M}$ ) y como control positivo utilizamos al imatinib a 1  $\mu\text{M}$  y se ve claramente que existe una disminución en la fosforilación del PDGFR con la administración del sunitinib y es aún más evidente con el imatinib.

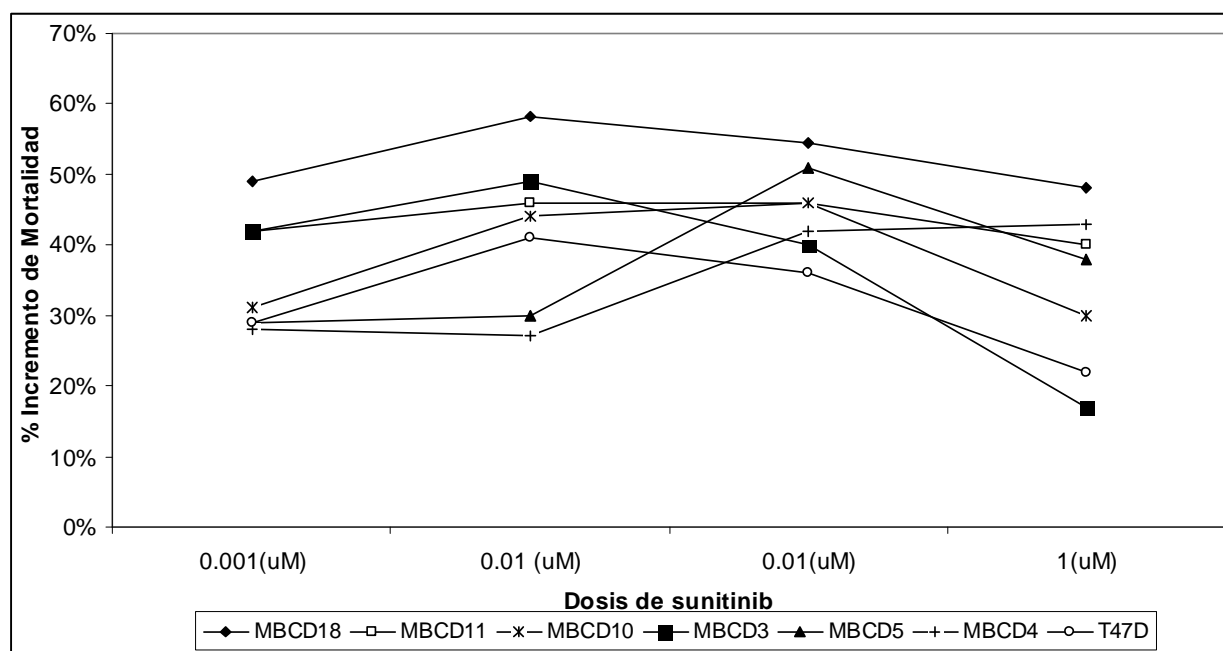




**Figura 3 Dosis respuesta a diferentes concentraciones de Sunitinib** Se sembró en placas de 24 pozos a una densidad de 7,500 cel/cm<sup>2</sup> suplementadas con SFB al 0.1% aplicándoles diferentes concentraciones crecientes de sunitinib y se evaluaba a las 48 hrs la viabilidad celular mediante la técnica de MTT los resultados representan la DS promedio de tres experimentos independientes.

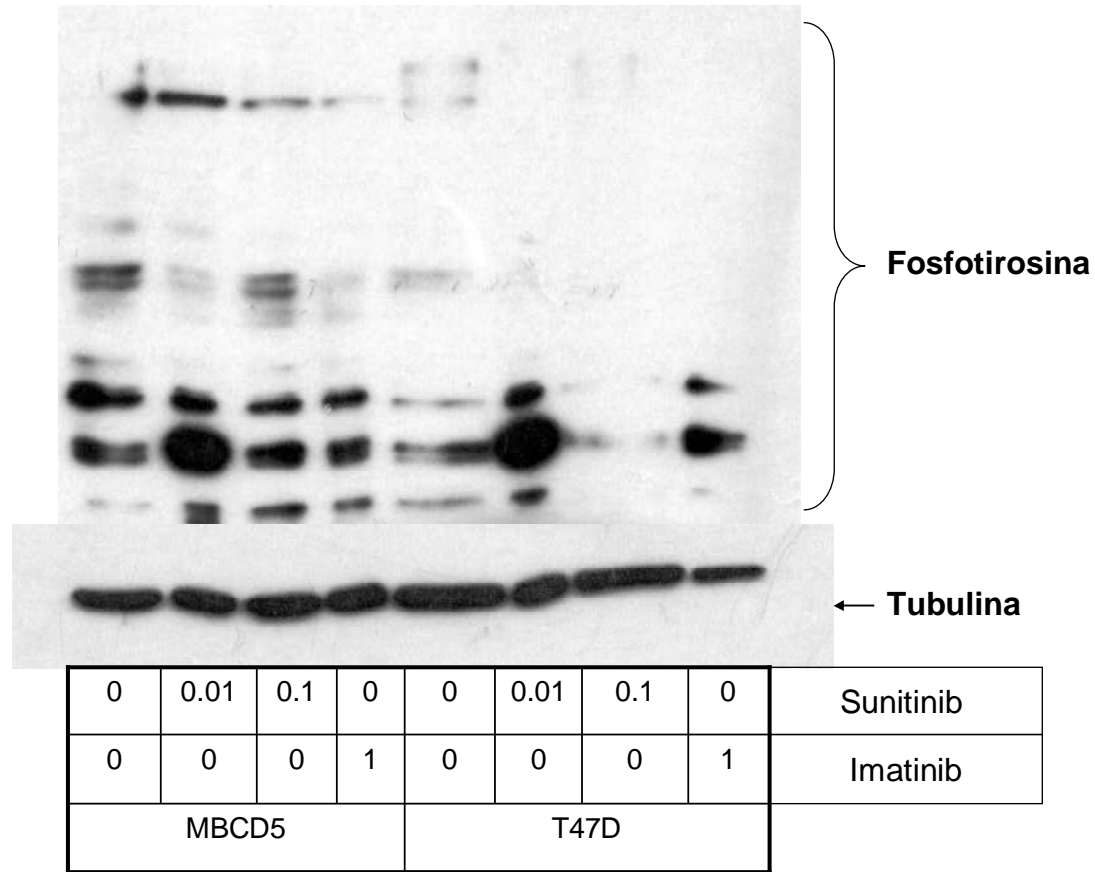


**Figura 4 Evaluación de de la adición a dosis crecientes de sunitinib de doxorubicina** Se sembró en placas de 24 pozos a una densidad de 7,500 cel/cm<sup>2</sup> suplementadas con SFB al 0.1% aplicándoles diferentes concentraciones crecientes de sunitinib (0, 0.001, 0.01 y 0.1) se dejó 2 horas y se añadió doxorubicina a 0.1 ug/ml, y se evaluaba a las 48 hrs. la viabilidad celular mediante la técnica de MTT los resultados representan la DS promedio de tres experimentos independientes.

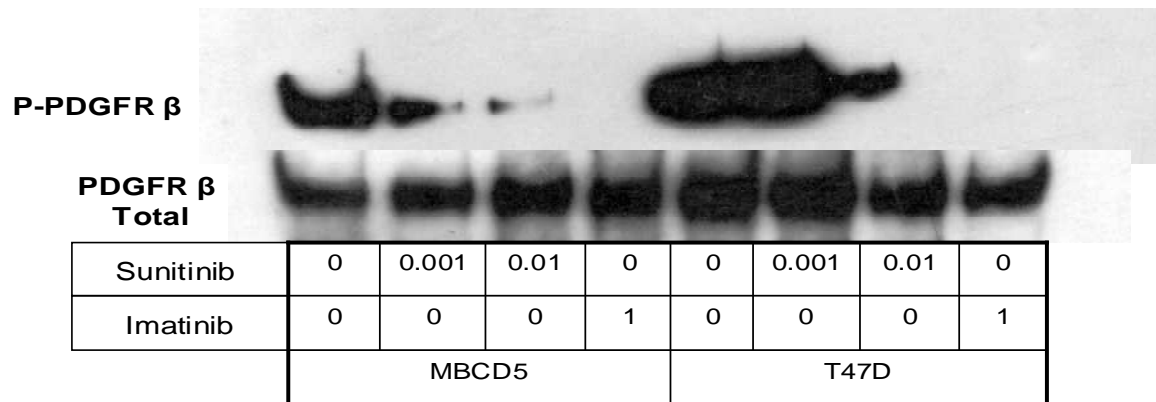


Sunitinib	MBCD18	MBCD11	MBCD10	MBCD3	MBCD5	MBCD4	T47D
0.001(uM)	49%	42%	31%	42%	29%	28%	29%
0.01 (uM)	58%	46%	44%	49%	30%	27%	41%
0.01(uM)	54%	46%	46%	40%	51%	42%	36%
1(uM)	48%	40%	30%	17%	38%	43%	22%

**Figura 5 Evaluación del incremento en la mortalidad del sunitinib:** Se sembró en placas de 24 pozos a una densidad de 7,500 cel/cm<sup>2</sup> suplementadas con SFB al 0.1% aplicándoles diferentes concentraciones crecientes de sunitinib (0, 0.001, 0.01 y 0.1) se dejó 2 horas y se añadió doxorrubicina a 0.1 ug/ml, y se evaluaba a las 48 hrs la viabilidad celular mediante la técnica de MTT los resultados representan la DS promedio de tres experimentos independientes, se obtuvo el promedio del porcentaje de incremento de la mortalidad de dosis comparativas del tratamiento de monodroga y la combinación.



**Figura 6 Evaluación de la disminución de la fosforilación de tirosina** Se sembraron en cajas de petri a una densidad de 2 millones de células, al tener confluencia del 100% se cambió a medio RPMI suplementado con SFB 0.1%, posteriormente se trataron con sunitinib a dosis de 0.01 y 0.1 uM e imatinib a 1 uM, y los lisados celulares fueron analizados para p-tirosina por medio de Western blot.



**Figura 7 Inhibición de la fosforilación del PDGFR  $\beta$  mediada por el Sunitinib** Se sembraron en cajas de petri a una densidad de 2 millones de células, al tener confluencia del 100% se cambio a medio RPMI suplementado con SFB 0.1%, posteriormente se trataron con sunitinib a dosis de 0.01 y 0.1  $\mu$ M e imatinib a 1  $\mu$ M, y los lisados celulares fueron analizados para P-PDGFR $\beta$  utilizando el análisis de Western blot.

## **Discusión de Resultados:**

En el presente trabajo se pudo identificar la heterogeneidad de población que puede ocurrir en las células tumorales del cáncer de mama. La presencia de células tumorales que presentan algún tipo de resistencia a fármacos de quimioterapia en este caso específicamente a doxorrubicina, ya que este tratamiento se considera el estándar ya sea para etapas tempranas como tardías. Como propuestas a esta resistencia se ha sugerido que la activación de NF- $\kappa$ B contribuye en la generación de resistencia a la quimioterapia induciendo la transcripción de genes anti-apoptóticos como A1/Bfl-1 o el gen de resistencia a multidroga. (14) Lo que es de recalcar con los datos obtenidos es que si bien los modelos de cinética de las neoplasias nos han permitido evaluar y proponer los tratamientos que en la actualidad se usan de manera convencional es interesante que al tener una línea de células de cáncer de mama resistente al tratamiento convencional, se puede observar en los cultivos es que aunque existe un efecto citostático en estas células resistentes este se pierde ya que las células que no mueren reactivan su maquinaria de división celular y aunque no llegan a tener la viabilidad de las células no tratadas. Esto se puede traducir en algo de importancia clínica ya que las células MBCD5 provienen de una paciente con pronta progresión de su enfermedad y desarrollo de metástasis, nos hace pensar que el no erradicar de manera eficiente a la mayoría de las células tiene consecuencias que inciden directamente sobre el pronóstico de las pacientes y es aquí donde radica la fortaleza de este estudio ya que todo lo que se analizó se contrasta con líneas celulares ya establecidas, que tiene como desventaja que siendo células con alta inestabilidad cromosomal pueden tener distintos comportamientos a la caracterización que se pudo obtener inicialmente y el comparar con los cultivos primarios hacen que se tenga información muy cercana a lo que ocurre *in vivo* y en pacientes mexicanas. Aunque no es algo que se pudiera traducir en estándar, para la valoración de la actividad de fármacos con finalidad de realizar un estudio parecido a un antibiograma, con lo laborioso y costoso que esto implicaría.

Es importante hacer notar que el sunitinib si se a empleado para el tratamiento del cáncer de mama en un estudio fase dos en donde se valoro efectividad de este tratamiento en pacientes con enfermedad metastásica resistente a el tratamiento con doxorubicina y paclitaxel, y a nivel molecular se a reportado en la literatura su efectividad en estudios *in vitro* y modelos murinos de cáncer de mama, lo interesante del presente estudio es la aproximación clínica antes mencionada, y el buscar nuevas terapias que posibiliten una mayor respuesta a el tratamiento convencional, aunque su utilidad se a evaluado únicamente en el contexto paliativo en enfermedad metastásica con respuesta , por lo general los inhibidores de TRKs ofrecen poca ventaja en cuanto a supervivencia; la ventaja que ofrecen es mayor respuesta objetiva y en ocasiones mayor tiempo libre de enfermedad. Esto nos da la ventaja de plantear terapias combinadas en el contexto de una enfermedad de una incidencia que se ha ido incrementando en el país y que en la mayoría de los casos se diagnostican en etapas avanzadas, y se necesitan tratamientos con una alta efectividad y que esto se reproduzca en aumento en la supervivencia. Lo que se observa es que al tratar a las células con el sunitinib este logra disminuir la viabilidad de las células pero no produce una disminución mayor al 40% hasta que se incrementa más la dosis, que esto pudiera traducirse en mayor toxicidad para los pacientes. Al demostrar que este fármaco no actúa en forma citotóxica en estas células lo que se podría traducir en que pase la misma situación con la doxorubicina, lo que haría impractico el tratamiento como monodroga al tener la evidencia en un estudio fase en estadios IV fase II del 14%, por lo que no se justificaría su empleo, aunque aun no se tienen reportes en cuanto a supervivencia y supervivencia libre de enfermedad. La combinación de los fármacos produce un efecto sinérgico que se demuestra con un incremento en la mortalidad celular por arriba del 40% y que se traduce en un efecto estadísticamente significativo ( $p < 0.0001$ ), esto apoyaría los resultados ya descritos (15) en donde se documento una aumento en la respuesta, mayor mortalidad celular e incluso regresión de tumores murinos de mama, cuando se asociaba el sunitinib al tratamiento estándar (fluouracilo, docetaxel y doxorubicina), la ventaja del presente estudio con respecto a lo reportado en la literatura es que se utilizaron células de cultivos primarios de pacientes y en células que claramente se encontraron resistentes al tratamiento con doxorubicina; y otro hallazgo muy importante en el presente trabajo es que la viabilidad en las células de cultivo de tejido mamario normal no se vio disminuida con el tratamiento con el sunitinib; lo que puede ser explicado por que en las células tumorales presentan una activación constitutiva de TRKs que no esta presente en las células normales y lo que nos haría pensar que la toxicidad en el tratamiento con este agente seria muy bien tolerado; la combinación si produce una disminución en la viabilidad celular que no alcanza los

valores en las células tumorales no siendo significativo (p 0.71) que de igual manera se puede traducir en una buena tolerancia a la toxicidad del tratamiento combinado. Esto demuestra que la especificidad de los inhibidores es relativa y esto apoyaría el uso de estos medicamentos en tumores para los que no fueron diseñados.

Lo más importante después de demostrar que las células eran sensibles al sunitinib era evaluar por que mecanismo molecular era su acción principal en las células derivadas de los cultivos primarios, se decidió evaluar al PGFR por los reportes en la literatura de su efecto en cáncer de mama aunque lo interesante es que no se han reportado mucho sobre la localización del PDGFR y su acción autocrina; interesantemente se documento que el sunitinib si inhibe la fosforilación de los residuos de tirosina, llama la atención que en las T47D y e las MBCD5 a la dosis de 0.01 se encontró una banda aumentada de intensidad que pudiera corresponder mas a una fosfatasa que a estas dosis incidiría mas en una acción de apagado que una acción competitiva del inhibidor; si produce una disminución en la fosforilación en los residuos de tirosina que es una manera no selectiva, lo que apoya lo encontrado en los resultados de viabilidad celular. Esto consolida la idea de la inespecificidad que pudiera sonar paradójico en fármacos que se desarrollan para ser específicos. La acción es muy evidente en el receptor de PDGFR  $\beta$  disminuyendo francamente la fosforilación del mismo, esta acción que tiene como implicación en las células resistentes a adriamicina, ya que comparte procesos comunes en la vía de señalización de c-Abl que se esta estudiando como una de los principales mecanismos de resistencia a doxorubicina.

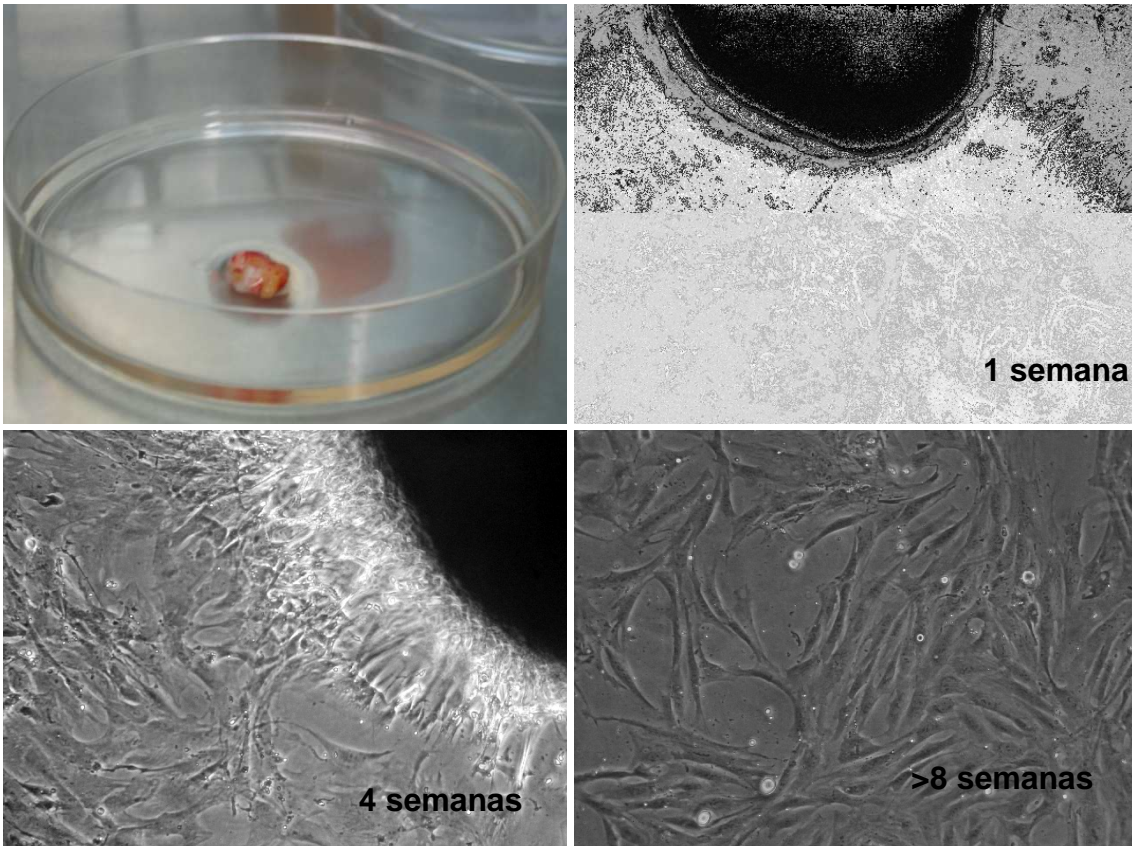


## Conclusiones

1. Al igual que *in vivo* se puede demostrar diferentes grados de resistencia a un agente de quimioterapia como doxorubicina en las líneas celulares.
2. El sunitinib es un agente citoestático mas que citotóxico en las líneas celulares.
3. La combinación del sunitinib y la doxorubicina ejercen un efecto significativo en disminuir la viabilidad celular.
4. En el presente estudio el efecto de disminución de la viabilidad celular esta mediada por la acción del PDGFR  $\beta$ .

## Anexo

Generación de cultivos primarios de muestras de cáncer de glándula mamaria



### Características de las pacientes

Línea Celular	Diagnóstico	Estadio	Metástasis	RE	Nódulos	Erb2	Tratamiento	Estado
MBCD3	Ca Ductal	IIB	-	+	0-18	++	Neoadyuvancia	Viva
MBCD4	Ca Ductal	I-C	-	5%+	6-12	NE	Hormonoterapia adyuvante	Viva
MBCD5	Ca Ductal	IV	Hueso	90%+	5-13	+++	Paliativo	Viva
MBCD10	Ca Ductal	IIB		90%	0/15	+++	Neoadyuvancia	Viva
MBCD11	Ca Ductal	II-A	-	95%+	4-14	+++	Neoadyuvancia	Viva
MBCD18	Ca Ductal	III-C	-	-	13-18	+++	Neoadyuvancia/ adyuvancia	Viva

Rte  
**Bibliografia**

1. Harris, J. R., Lippman, M. E., Veronesi, U., and Willett, W. Breast cancer (1)[see comment]. *New England Journal of Medicine*, 327: 319-328, 1992.
2. Hortobagyi, G. N. Management of breast cancer: status and future trends. *Seminars in Oncology*, 22: 101-107, 1995.
3. Xiong, Q., Valero, V., Kau, V., Kau, S. W., Taylor, S., Smith, T. L., Buzdar, A. U., Hortobagyi, G. N., and Theriault, R. L. Female patients with breast carcinoma age 30 years and younger have a poor prognosis: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer*, 92: 2523-2528, 2001.
4. Valagussa, P., Tess, J. D., Rossi, A., Tancini, G., Banfi, A., and Bonadonna, G. Adjuvant CMF effect on site of first recurrence, and appropriate follow-up intervals, in operable breast cancer with positive axillary nodes. *Breast Cancer Research & Treatment*, 1: 349-356, 1981.
5. Cohen, S. The epidermal growth factor (EGF). *Cancer*, 51: 1787-1791, 1983.
6. Hunter, T. and Cooper, J. A. Protein-tyrosine kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 54: 897-930, 1985.
7. Coussens, P. M., Cooper, J. A., Hunter, T., and Shalloway, D. Restriction of the in vitro and in vivo tyrosine protein kinase activities of pp60c-src relative to pp60v-src. *Molecular & Cellular Biology*, 5: 2753-2763, 1985.
8. Krause, S. W. and Holler, E. Imatinib in chronic myeloid leukemia.[comment]. *New England Journal of Medicine*, 356: 1780; author reply 1780, 2007.
9. Krause, D. S. and Van Etten, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine*, 353: 172-187, 2005.
10. Gusterson, B. A., Gelber, R. D., Goldhirsch, A., Price, K. N., Save-Soderborgh, J., Anbazhagan, R., Styles, J., Rudenstam, C. M., Golouh, R., and Reed, R. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group.[see comment]. *Journal of Clinical Oncology*, 10: 1049-1056, 1992.
11. Bronzert, D. A., Pantazis, P., Antoniadis, H. N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R. B., and Lippman, M. E. Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 5763-5767, 1987.
12. Li, H., Fredriksson, L., Li, X., and Eriksson, U. PDGF-D is a potent transforming and angiogenic growth factor. *Oncogene*, 22: 1501-1510, 2003.
13. Jechlinger, M., Sommer, A., Moriggl, R., Seither, P., Kraut, N., Capodiecci, P., Donovan, M., Cordon-Cardo, C., Beug, H., and Grunert, S. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, 116: 1561-1570, 2006.
14. Sun, L., Liang, C., Shirazian, S., Zhou, Y., Miller, T., Cui, J., Fukuda, J. Y., Chu, J. Y., Nematalla, A., Wang, X., Chen, H., Sistla, A., Luu, T. C., Tang, F., Wei, J., and Tang, C. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46: 1116-1119, 2003.

15. Abrams, T. J., Murray, L. J., Pesenti, E., Holway, V. W., Colombo, T., Lee, L. B., Cherrington, J. M., and Pryer, N. K. 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. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2: 1011-1021, 2003.
16. Chow, L. Q. and Eckhardt, S. G. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy.[see comment]. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 884-896, 2007.