



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría en Ciencias Bioquímicas

El papel de los receptores para eritropoyetina (EpoR) y para el factor de crecimiento SCF (c-Kit) en cáncer de mama

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

L.I.B.B. LIZBETH GONZÁLEZ JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE ADSCRIPCIÓN
DRA. MARÍA ELENA IBARRA RUBIO , FACULTAD DE QUÍMICA
DR. JORGE MANUEL VÁZQUEZ RAMOS, FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F. septiembre, 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.

a Ximena

apaise ma Chimène, apaise ta douleur,
fais agir ta constance en ce coup de malheur,
tu reverras le calme après ce faible orage,
ton bonheur n'est couvert que d'un peu de nuage,
et tu n'as rien perdu pour le voir différer.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Se agradece el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Clave IN209613) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Ciencia Básica- Clave 152492) para la realización de este proyecto.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca para la realización de mis estudios de maestría (No. de Beca: 47143).

Se agradece el apoyo técnico brindado por la M. en C. María Cecilia Aguilar Zacarías para la realización de este proyecto.

Se agradece a la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez y al Dr. José Esparza López del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) por la donación de las líneas celulares y su asesoría técnica durante la realización de este proyecto.

Se agradece a la Dra. Rebeca López Marure del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez” por su ayuda para llevar a cabo el análisis por citometría de flujo.

Se agradece al personal de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, Lic. Lucía Brito Ocampo, Lic. Martha Cariño Aguilar y a la bibliotecaria María Petra Muñoz García, por su apoyo para la consulta de referencias bibliográficas.

Agradecimientos personales

A mis padres y hermanos por darme siempre su inconmensurable amor, apoyo y comprensión para estudiar esta difícil carrera. Este trabajo es fruto de todos ustedes.

A mi novio por estar siempre conmigo y darme los alientos para no claudicar en esta empresa.

A todos mis tíos, tías, primos y primas por su cariño y por hacerme sentir dotada para esto.

A todos mis amigos por acompañarme en los ratos amenos y en los que no lo han sido tanto; por ayudarme a superar mis miedos y enfrentar los retos.

A mis compañeros y amigos de laboratorio por compartir conmigo, entre risas, los días de experimentos fallidos y exitosos (Majo), por las discusiones que nos llevaron a cuestionar toda la ciencia (Alejandro) y por los consejos prácticos y de vida (Cecita).

A mi alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que aprendí aquí y lo que seguiré aprendiendo. Orgullo azul y oro.

A la Dra. Leticia Rocha por apoyarme en todos mis proyectos dentro y fuera del laboratorio y por que todas sus enseñanzas me han forjado como una persona de ciencia pero también más humana.

Índice

Índice	5
Resumen	7
I. Introducción.....	8
A. Cáncer de mama	8
1. Datos epidemiológicos: morbilidad, mortalidad, evolución	8
2. Clasificación del cáncer de mama	9
3. Tratamiento del cáncer de mama	16
B. Eritropoyetina y su receptor	19
1. Eritropoyetina (Epo)	19
2. El receptor para eritropoyetina (EpoR)	20
3. Vías de señalización Epo/EpoR.....	20
C. El factor de células troncales (SCF) y su receptor (c-Kit).....	21
1. SCF	22
2. c-Kit.....	22
3. Vías de señalización	22
D. La cooperación de c-Kit y EpoR.....	24
E. Participación de las vías de señalización Epo/EpoR y SCF/c-Kit en cáncer.....	26
1. Epo y anemia	26
2. Epo y EpoR en cáncer	26
3. Epo en cáncer de mama	27
4. SCF/c-Kit en cáncer	28
5. SCF/c-Kit en cáncer de mama	29
II. Antecedentes	31
III. Hipótesis.....	33
IV. Objetivos	33
A. Objetivo general	33
B. Objetivos particulares	33
V. Material y Métodos	34

A.	Cultivos celulares	34
B.	Extracción de RNA y RT-PCR	34
C.	Extracción de proteínas y Western blot.....	36
D.	Citometría de flujo.....	37
E.	Ensayos de viabilidad.....	37
F.	Ensayos de migración.....	38
G.	Ensayos de silenciamiento	39
H.	Análisis estadísticos.....	40
VI.	Resultados	41
A.	Expresión del receptor EpoR en líneas celulares de cáncer de mama tipo ductal	41
B.	Expresión del receptor c-Kit en líneas celulares de cáncer de mama tipo ductal..	41
C.	Efecto de la eritropoyetina en la proliferación celular	43
D.	Efecto del SCF en la proliferación celular	45
E.	Efecto conjunto de SCF y Epo en la proliferación celular	47
F.	La proliferación celular inducida por Epo y SCF se reduce con el silenciamiento de los receptores EpoR y c-Kit.....	48
G.	Efecto de SCF y Epo en la migración celular	51
H.	La migración celular disminuye con el silenciamiento de los receptores EpoR y c-Kit.....	52
I.	Moléculas señalizadoras activadas por Epo y SCF.....	53
VII.	Discusión.....	56
A.	La expresión de c-Kit y EpoR en cáncer de mama	57
B.	Proliferación	59
C.	Migración	62
D.	Señalización	63
VIII.	Conclusiones	65
IX.	Referencias	66

Resumen

El cáncer de mama es el tipo de cáncer que más afecta a las mujeres mexicanas en la actualidad. A pesar de la existencia de diversas terapias para combatir el cáncer, la inespecificidad de la mayoría de los tratamientos de radio y quimioterapia ocasiona que no sólo las células tumorales mueran si no también las células sanas. Esta condición provoca que los pacientes presenten frecuentemente cuadros de anemia.

A fin de mitigar la anemia asociada al cáncer, los pacientes reciben eritropoyetina (Epo) la cual promueve la proliferación y diferenciación de los precursores eritroides. Sin embargo esta práctica ha generado controversia ya que algunos estudios han reportado que Epo puede inducir la proliferación de células tumorales que expresan el receptor para eritropoyetina (EpoR). Ante tal situación, resulta importante determinar si este efecto es significativo en el cáncer de mama.

Durante el desarrollo de los progenitores eritroides además de Epo también participa el factor de crecimiento de células troncales (SCF). Esta citocina, a través de la activación de su receptor (c-Kit), coopera con Epo para estimular la multiplicación y la supervivencia de las células. Por otro lado, se tiene evidencia de que c-Kit promueve la expansión de células malignas en ciertos tipos de cáncer, por lo que surge la pregunta de si SCF/c-Kit y Epo/EpoR pueden ser vías que actúen sinérgicamente para promover la proliferación y la migración de células cancerosas mamarias.

En este trabajo se identificó la expresión de los receptores EpoR y c-Kit en una línea celular de cáncer mamario ductal no comercial de origen mexicano (MBCD5) y se observó que al estimular estas células con las citocinas Epo y SCF, por separado, la proliferación y la migración celular se incrementaron de manera significativa. No obstante, al administrar simultáneamente ambas citocinas no se observó un efecto sinérgico ni en la capacidad proliferativa ni en la migratoria. Estos resultados sugieren que las vías SCF/c-Kit y Epo/EpoR pueden promover la multiplicación y la capacidad invasiva de células tumorales.

I. Introducción

A. Cáncer de mama

Desde tiempos remotos, una de las enfermedades que más ha aquejado a la humanidad ha sido el cáncer¹. El cáncer es el nombre genérico que se le da a un grupo de más de cien enfermedades las cuales se caracterizan por el crecimiento descontrolado de células anormales. Los registros más antiguos de casos de cáncer, fueron formalmente descritos por los egipcios hacia el año de 1500 A.C^{1,2}. Precisamente en el papiro conocido como el de Edwin Smith, uno de los primeros tipos de cáncer en ser descrito fue el cáncer de mama. En dicho escrito se reportan ocho casos de úlceras y tumores mamarios que fueron tratados con cauterización aunque en el escrito también se señala que “no existe tratamiento” cuando el tumor se ha expandido. Estas observaciones, aunque antiguas, denotan un claro reconocimiento de la letalidad del cáncer mamario así como de la falta de tratamientos, aspectos que en la actualidad siguen siendo dos de los principales retos de la medicina moderna puesto que el cáncer de mama es uno de los problemas más importantes de salud pública a nivel mundial .

1. Datos epidemiológicos: morbilidad, mortalidad, evolución

El cáncer de mama es el tipo de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en la población femenina en el mundo entero de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud³ y el proyecto Globocan⁴. En nuestro país éste es también el cáncer que más afecta a las mujeres en la actualidad. El informe más reciente hecho por el INEGI⁵ señaló que en 2010, la principal causa de morbilidad hospitalaria por neoplasmas entre las mujeres fue el cáncer de mama: a 22 de cada 100 mujeres hospitalizadas por cáncer se les diagnosticó cáncer de mama. En cuanto a las defunciones causadas por tumores malignos desde el 2006 el cáncer mamario presenta la tasa de mortalidad más alta en mujeres con 32.8 personas de cada 100 mil.

Estos, junto con otros datos^{6,7}, señalan que en los últimos años las tasas de mortandad e incidencia debido a cáncer mamario han aumentado considerablemente y han rebasado los casos y muertes asociados con cáncer de cérvix uterino. Estas estadísticas pueden explicarse en parte por las limitantes existentes en México que hacen que los sistemas de prevención, diagnóstico, tratamiento e incluso de cuidados paliativos sean exiguos. Algunos estudios locales^{8,9} han señalado que la mayoría de los casos de cáncer de mama en México se diagnostican en una etapa muy avanzada como para ser tratados efectivamente lo cual se ve reflejado en las altas tasas de mortalidad. Ya que esta enfermedad tiene un alto impacto en nuestro país, la evaluación de marcadores tumorales es crucial para guiar la investigación de cáncer mamario y establecer mejores sistemas, tanto clínicos como moleculares, de diagnóstico y de tratamiento.

2. Clasificación del cáncer de mama

El cáncer de mama es un conjunto de enfermedades heterogéneas puesto que, de paciente a paciente, presenta diferentes características morfológicas así como variabilidad en el progreso clínico y la respuesta a los diferentes tratamientos. Esto ha hecho imperante la necesidad de concebir una clasificación que sea de utilidad clínica y que permita en cierta medida la generalización.

Al momento del diagnóstico, se procede a determinar el estadio, esto proporciona información respecto al pronóstico y orienta el tratamiento. La estadificación describe la extensión o gravedad del cáncer que aqueja a una persona. Ésta se basa en la descripción macroscópica del tumor primario: su tamaño, si hay diseminación en ganglios linfáticos cercanos, si ha ocurrido metástasis y su grado.

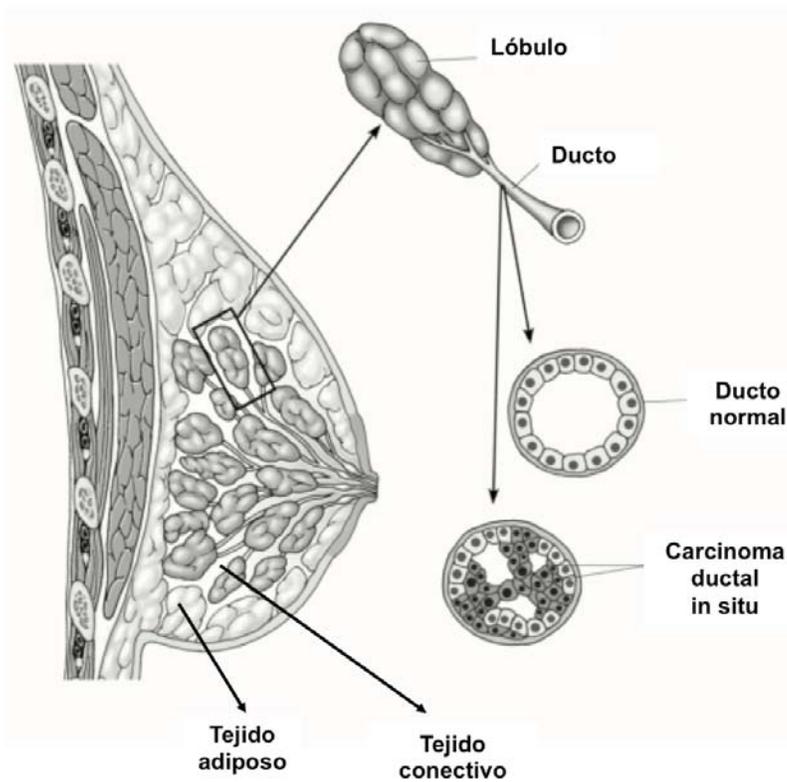
El grado de un tumor es una indicación de la rapidez con la que probablemente crecerá y se extenderá el tumor. El grado se determina tomando en cuenta la descripción citológica (grado nuclear y de diferenciación celular, índice mitótico, formación de túbulos, entre otros) y la descripción histológica del tumor (subtipo histológico).

Los sistemas de estadificación y gradación se complementan actualmente con dos esquemas de clasificación tumoral: el histopatológico y el molecular. A continuación abordaremos algunos aspectos básicos de ambas clasificaciones.

a) *Clasificación histopatológica*

Las mamas están formadas por tejido conjuntivo, adiposo, linfático y epitelial. El tejido epitelial mamario está compuesto por dos estructuras: los *lóbulos*, que a su vez se subdividen en lobulillos, y los *ductos* los cuales conducen la leche durante la lactancia (**Figura 1**). Los tumores mamarios se dan principalmente en estas dos estructuras; también ocurren en los otros tejidos, aunque de manera más rara.

A



Cáncer ductal

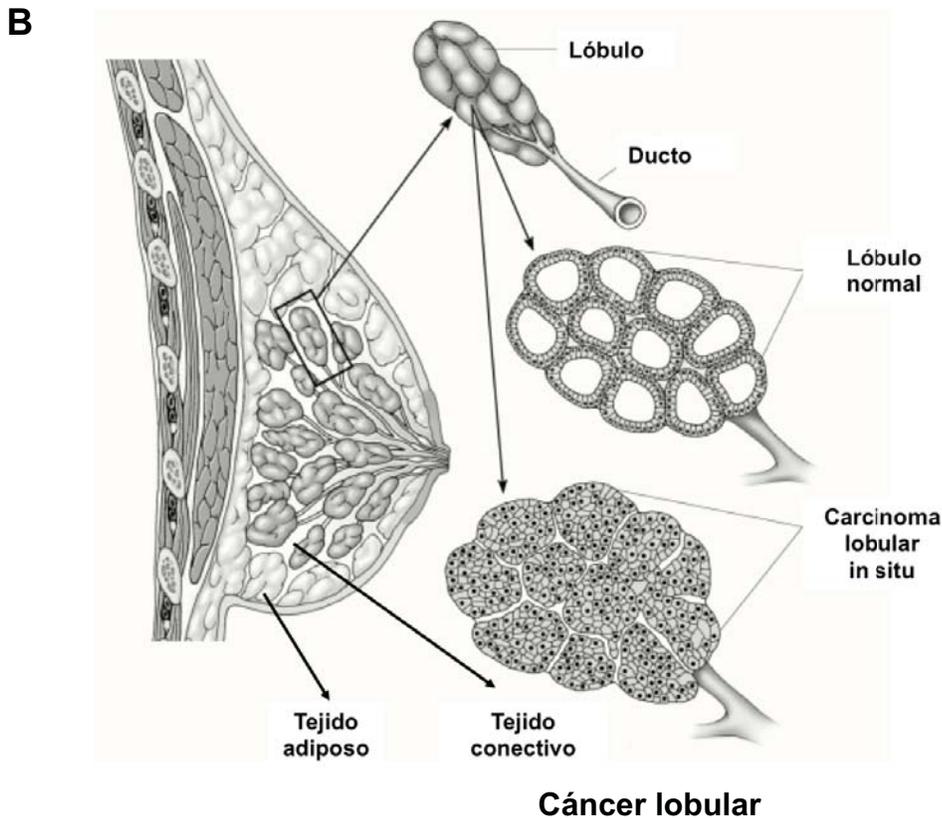


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria y los principales tipos histológicos del cáncer de mama.: el cáncer ductal y el lobular. **A.** Carcinoma ductal in situ. **B.** Carcinoma lobular in situ. Esquemas modificados a partir de material de la American Cancer Society.

Tomando en cuenta las características histológicas mamarias, el cáncer de mama se clasifica de acuerdo a un esquema propuesto por la OMS en 2003¹⁰ en carcinomas *in situ* y carcinomas invasivos (**Tabla 1**).

Los carcinomas *in situ* se componen de células epiteliales malignas que se encuentran confinadas a su sitio de origen y que aun no se han diseminado ni invadido la membrana basal. Un carcinoma *in situ* puede ser ductal, o lobular. Aproximadamente 80% de los carcinomas son ductales y el resto lobulares¹¹.

En los casos de carcinomas invasivos las células han sobrepasado la membrana basal y han invadido el tejido adyacente (la parénquima o el tejido linfático) u otros tejidos más distantes. Aproximadamente 95% de los casos de cáncer de mama invasivo son de origen epitelial, ya sea ductal o lobular¹². Otros tipos menos frecuentes incluyen los

cánceres derivados del tejido conectivo como tumores filoides y angiosarcomas (estroma) así como linfomas (tejido linfoide) (Véase **Tabla 1**).

Cáncer de mama	In situ	Ductal	
		Lobular	
	Invasivo	Ductal	Sin otra especificación
			Medular
			Mucinoso
			Papilar
			Tubular
			Secretor
			Adenoideo quístico (raro)
			Apócrino (raro)
			Metastático
			Lobular
	Otros	Inflamatorio	
		Enfermedad de Paget (pezón)	
		Angiosarcoma (raro)	
Tumor filosoide			
Linfoma			

Tabla 1. Clasificación histopatológica del cáncer de mama. En esta tabla se muestra una clasificación del cáncer de mama basada en las características del tejido tumoral. Esta tabla fue adaptada a partir de diferentes fuentes¹³⁻¹⁶.

El cáncer ductal invasivo es el tipo histológico más frecuente de cáncer de mama que se presenta y abarca entre 50 y 75% de todos los casos¹². Existen varios subtipos de cáncer ductal invasivo que son menos frecuentes y que se clasifican de acuerdo a la forma en la que se ven las células tumorales (Véase **Tabla 1**).

Tradicionalmente esta clasificación ha sido la más utilizada, sin embargo hoy en día se ha reconocido que su utilidad clínica es limitada puesto que su capacidad predictiva es insuficiente. Por lo tanto se han establecido nuevos esquemas de clasificación, los cuales se toman en cuenta características moleculares de los tumores mamarios.

b) Clasificación molecular

Las características histopatológicas del cáncer de mama han sido de utilidad limitada para la definición de los diferentes factores de pronóstico y de tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, la identificación de las características moleculares del tumor permiten diferenciar alteraciones genéticas para poder clasificar el cáncer de mama de una manera más adecuada en lo que se refiere a pronóstico y efectividad en el tratamiento^{17,18}.

Gracias a los avances de la biología molecular, actualmente se ha propuesto un nuevo esquema de clasificación que complementa el modelo de clasificación histopatológica. Este esquema divide a los cánceres de acuerdo a la expresión de ciertas proteínas y genes. Actualmente son tres los marcadores moleculares que se han establecido ya en la práctica médica, aunque existen muchos otros candidatos que se están investigando para validarlos clínicamente. Los tres marcadores indispensables para establecer la clasificación molecular son los receptores de estrógeno (RE) y progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2/neu).

EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE HORMONAS

Un tumor puede clasificarse de acuerdo a la presencia o ausencia de los receptores de estrógenos y progesterona. Cerca del 75% de los casos de cáncer de mama son positivos para los receptores de hormonas¹⁹ lo que significa que las células cancerígenas proliferan en presencia de estrógenos y/o progesterona. Los receptores de estrógeno se encuentran con mayor frecuencia que los de progesterona. La razón por la que se debe determinar el estatus de estos receptores es porque esto ayuda a establecer el tipo de tratamiento, que en este caso es la terapia con inhibidores de las enzimas que participan en la síntesis de estas hormonas.

- **Positivo para el receptor de estrógeno.** Los tumores positivos para este receptor se asocian con mejores tasas de supervivencia. Estos tumores se tratan con terapias antiestrógenos. Con frecuencia, son las mujeres postmenopáusicas las que presentan este tipo de cáncer.

- **Negativo para el receptor de estrógeno.** Este tipo de cáncer es más frecuente en mujeres premenopáusicas y se asocia con un pronóstico de supervivencia menor en comparación a los que son positivos para este receptor.

ESTATUS DEL RECEPTOR HER2/NEU

Her2/neu es un protooncogen que codifica para un receptor transmembranal tipo cinasa de tirosina de la misma familia que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Aunque esta presente en el epitelio mamario sano, se estima que se sobreexpresa en 15 a 30%²⁰ de todos los casos de cáncer de mama. La sobreexpresión de Her2/neu se asocia con un pronóstico poco favorable y una tasa de supervivencia baja. Esto se debe a que los tumores positivos para Her2/neu son más agresivos y resistentes a la terapia hormonal y citotóxica. Los tumores positivos para este receptor se tratan con un anticuerpo monoclonal (Trastuzumab) que está dirigido contra los dominios extracelulares de Her2/neu.

El análisis inmunohistoquímico de los tumores mamarios ha permitido clasificar los tumores en cuatro grupos fundamentales^{21,22}, donde la presencia o no de receptores de estrógenos son definitivos para la categorización de esta clasificación. Así tenemos:

Tumores con receptores de estrógenos positivos

- **Luminal A:** receptores de estrógeno positivos, receptores de progesterona positivos o negativos, Her2/neu negativo.
- **Luminal B:** receptores de estrógeno positivos, receptores de progesterona positivos, Her2/neu positivo.

Tumores con receptores de estrógeno negativos

- **HER2/Neu:** receptores de estrógenos negativos, receptores de progesterona negativos, Her2/neu positivo.
- **Tipo basal o triple negativo:** receptores de estrógeno negativo, receptores de progesterona negativos, Her2/neu: negativo.

BRCA1, OTRO MARCADOR MOLECULAR DE UTILIDAD CLÍNICA

Además otro de los marcadores que se analizan son los genes de susceptibilidad a cáncer de mama (BRCA1 y BRCA2). El BRCA1 y el BRCA2 son genes humanos que codifican para proteínas supresoras de tumores. Estas proteínas desempeñan funciones importantes en diferentes procesos celulares, que incluyen la activación y la regulación transcripcional, la reparación de daños al ADN, el control del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación. Cuando uno de estos genes tiene una mutación, o alteración, como cuando no se produce su proteína o no funciona correctamente, el daño al ADN no puede repararse adecuadamente. Como resultado de eso, las células tienen más probabilidad de presentar alteraciones genéticas adicionales que pueden conducir al cáncer.

Cerca del 80% de los casos de cáncer de mama observados en una misma familia están asociados a los genes BRCA. Las mutaciones específicas que se heredan en el BRCA1 y en el BRCA2 aumentan el riesgo de cánceres de mama y de ovario en las mujeres y se han asociado con riesgos mayores de otros tipos de cáncer como el de próstata o el de páncreas. Las mutaciones en estos genes representan del 20 a 25% de los cánceres de mama hereditarios y cerca de 5 a 10% de todos los cánceres de mama. Los casos de cáncer de mama asociados con las mutaciones en el BRCA1 y en el BRCA2 tienden a presentarse a una edad más temprana que los cánceres de mama esporádicos.

La presencia de mutaciones en estos genes tiene implicaciones en el pronóstico y en el tratamiento del paciente a largo plazo, las mujeres que son portadoras de estas mutaciones tienen más probabilidad de padecer un segundo cáncer tanto en el mismo mama (ipsilateral) como en el mama opuesto (contralateral) que las mujeres que no son portadoras de estas mutaciones. Así, algunas mujeres con una mutación dañina del BRCA1 o del BRCA2 que presentan cáncer de mama en un mama optan por una mastectomía bilateral. Además los cánceres de mama en las mujeres con una mutación dañina del BRCA1 tienen también más probabilidad de cánceres tres veces negativos y estos cánceres tienen un pronóstico más precario que otros cánceres de mama.

ALGUNOS CANDIDATOS A MARCADORES TUMORALES

En los últimos años se ha probado que la determinación de marcadores tumorales es una herramienta de mucha utilidad para brindar una atención adecuada y personalizada a los pacientes con cáncer. La presencia de estos marcadores ayudan no sólo al diagnóstico y a la clasificación del cáncer sino también al pronóstico pues gracias a estos marcadores se puede tener un mejor panorama de cual será la respuesta al tratamiento, la agresividad del tumor y sus probabilidades de desarrollar metástasis. Esto ha motivado a numerosos grupos de trabajos a investigar el papel de otras proteínas, genes e incluso microRNAs en el contexto del cáncer de mama para así determinar si éstos pueden convertirse en marcadores confiables y de utilidad clínica. Entre los marcadores que están ya afianzándose en la clínica junto a los receptores hormonales y a Her2/neu se encuentran el antígeno Ki67 y la proteína supresor de tumores p53. Por otro lado también hay otros candidatos prometedores en los que se incluyen PCNA, caveolina, CXCR4, varios factores de crecimiento (EGF, HGF, IGF, VEGF y TGF- β), Myc, FoxP3 y micro RNAs (miR-375 and miR-122)²³.

3. Tratamiento del cáncer de mama

Las terapias para tratar este tipo de cáncer incluyen terapias tópicas (cirugía y radioterapia) y terapias sistémicas (quimioterapia, terapia hormonal y terapia específica). Dentro del esquema de fármacos administrados de manera sistémica en la actualidad encontramos (i) inhibidores del receptor de estrógenos; (ii) agentes citotóxicos inespecíficos que inhiben la síntesis del DNA y la división celular, causando la muerte tanto de células tumorales como de células sanas y (iii) una nueva generación de fármacos específicos que incluyen inhibidores de receptores membranales con actividad de cinasa de tirosina y anticuerpos monoclonales dirigidos contra los mismos.

La quimioterapia puede ser administrada antes o después de la cirugía y ésta puede combinar dos o más fármacos, dependiendo del tipo histológico de cáncer, su estadio y las características moleculares del tumor (positividad para receptores de estrógenos y/o progesterona y/o Her2/neu). En la **Tabla 2** se hace una breve recapitulación de los

fármacos y sus mecanismos de acción. Los regímenes combinados con mayor efectividad en el cáncer de mama, adoptados en México²⁴ son: FEC (5-Fluorouracilo, Epirubicina, Ciclofosfamida), EC (Epirubicina y Ciclofosfamida), CMF (Ciclofosfamida, Metrotexato y 5-Fluorouracilo), DC (Docetaxel y Capecitabina), GT (Gemcitabina y Paclitaxel), Ixabepilona con Capecitabina y Trastazumab administrado con Paclitaxel acompañado o no de Carboplatino o con Docetaxel, Vinorelbina o Capecitabina. Además de estos esquemas en otros países, en particular en los Estados Unidos, se han adoptado tratamientos con fármacos de nueva generación como los anticuerpos (Trastazumab, Pertuzumab, Bevacizumab) y los inhibidores específicos de los receptores Her2/neu y EGFR (Lapatinib) y el receptor FKBP12, que participa en la vía de señalización de mTor (Everolimus)²⁵.

Otros de los inhibidores bajo ensayos clínicos hoy en día incluyen al Afatinib que inhibe a Her2-neu y anticuerpos monoclonales como Cetuximab contra el receptor EGF-R. No obstante el uso de estos fármacos, la quimioterapia inespecífica es la más utilizada a pesar de los efectos adversos que ocasiona.

Debido a la inespecificidad de la quimioterapia y la radioterapia además de las complicaciones que los tumores tienen *per se*, el cáncer tiene un impacto sistémico negativo en los pacientes; la anemia es el síndrome que se asocia con mayor frecuencia al cáncer²⁶. Ésta enfermedad se caracteriza por la disminución del número de eritrocitos lo cual se traduce con una concentración de hemoglobina en la sangre inferior a los 11 g/dl. Aunque la incidencia de la anemia depende del tipo de tumor, la etapa, la edad y el sexo del paciente, en suma se estima que entre el 40 y el 60% de los pacientes con cáncer presentarán anemia en alguna etapa de la enfermedad^{27 28}.

El uso de eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) ha mejorado considerablemente el tratamiento y la calidad de vida de los individuos anémicos pues aumenta la concentración sanguínea de hemoglobina y reduce las transfusiones. Varios estudios han reportado el efecto positivo que ejerce la aplicación de rHuEPO combinada con la quimioterapia y la radioterapia con respecto a la supervivencia de los pacientes²⁹.

Terapias endócrinas	Agentes citotóxicos	Inhibidores específicos
	Antraciclinas	Anticuerpos monoclonales
Moduladores selectivos del receptor de estrógenos	Doxorubicina.	Trastazumab (anti Her2/neu)
Tamoxifen	Epirubicina.	Pertuzumab (anti Her2/neu)
Toremifeno	Doxorubicina liposomal	Bevacizumab (anti VEGF-A, uso retirado)
	Mitoxantrona.	
	Taxanos	Inhibidores dirigidos
Subreguladores selectivos del receptor para estrógenos	Paclitaxel	Lipatinib (Inhibidor de Her2/neu)
Fulvestrante	Docetaxel.	Everolimus (Inhibidor de mTOR)
	Abraxane	
Inhibidores de la aromatasa		
Anastrozol	Agentes alquilantes	
Letrozol	Ciclofosfamida	
Exemestano		
Análogos de gonadotropinas	Fluoropirimidinas (antimetabolitos)	
Goserelina	Capecitabina	
Leuprolina	5-FU.	
Triptorelina	Metotrexato	
Progestinas	Sales de platino	
Acetato de medroxiprogesterona	Carboplatino	
Acetato de megestrol	Cisplatino	
Estrógenos	Alcaloides de vinca	
Dietilbestrol	Vinorelbina	
Etinilestradiol	Vinblastina	
	Vincristina	
Andrógenos	Otros.	
Fluoximesterona	Gemcitabina	
	Mitomicina C	

Tabla 2. Fármacos empleados en el tratamiento contra el cáncer de mama. Los fármacos están agrupados por su función y a su vez subdivididos por familias de acuerdo a su naturaleza química.

Sin embargo, en años recientes, el tratamiento con rHuEPO ha generado muchas especulaciones en torno a los posibles riesgos que puede desencadenar la administración de rHuEPO en pacientes con cáncer, ya que se ha identificado que tejidos cancerosos³⁰ pueden expresar al receptor para eritropoyetina, como precisaremos en la siguiente sección.

B. Eritropoyetina y su receptor

1. Eritropoyetina (Epo)

Se trata de una glicoproteína de 30.4 kDa considerada, junto con el factor de crecimiento de células troncales (SCF, del inglés *Stem Cell Factor*), el principal regulador de la eritropoyesis ya que promueve la proliferación y diferenciación de los progenitores eritroides y asegura su supervivencia al inhibir la apoptosis. En adultos, Epo es producida en los riñones de manera constitutiva y en el hígado, en donde se produce proporcionalmente al grado de hipoxia. Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que Epo se produce en una gran variedad de tejidos como el endotelio, el músculo liso, la placenta, los testículos, el sistema nervioso central, en el tracto genital femenino y en las glándulas mamarias^{31,32}.

El papel de Epo es fundamental para la eritropoyesis, así como lo es su regulación ya que la oxigenación de los tejidos depende en gran medida de que los eritrocitos transporten suficiente oxígeno a las células y conduzcan el CO₂ hacia los pulmones. El nivel de oxígeno en la sangre es detectado por el riñón a través de un mecanismo molecular altamente regulado; un decremento en los niveles de oxígeno en la sangre estimula la producción de Epo. Epo viaja por el torrente sanguíneo desde los riñones hasta la médula ósea donde se encuentran los progenitores eritroides para así estimular la producción de hematíes; Epo se comporta como una hormona. A nivel molecular, su producción está regulada directamente por el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1 α) el cual, como su nombre lo indica, es expresado en condiciones hipóxicas. HIF-1 α activa la expresión del gen que codifica para Epo y la de

ciertos genes que participan en la angiogénesis (como VEGF), el metabolismo glicolítico, la remodelación vascular y la supervivencia celular. Los efectos biológicos de Epo, como la proliferación, la diferenciación y la inhibición de la apoptosis, se regulan a través de la unión a su receptor, EpoR.

2. El receptor para eritropoyetina (EpoR)

EpoR (58-65kDa) pertenece a la superfamilia de receptores de citocinas del tipo I. Los miembros de dicha familia se caracterizan por la ausencia de función catalítica en su dominio intracelular y por asociarse a proteínas con actividad de cinasas de tirosina como JAK-2. Los receptores para la trombopoyetina, la hormona del crecimiento HGH, el GSCF y las interleucinas IL-2, IL-3, e IL-4 forman parte de este grupo de receptores. EpoR es un receptor transmembranal que tiene además varias isoformas. EpoR tiene una versión completa de 484 aminoácidos (aa) y una troncada de sólo 303 aa. Existe también una forma soluble del receptor de 115 aa. La formas troncada y la soluble contienen un dominio extracelular al cual se une Epo. La forma soluble de EpoR puede actuar como un antagonista al competir con la forma completa del receptor por la Epo disponible en el medio extracelular. EpoR se expresa en los progenitores eritroides y en tejidos no hematopoyéticos sanos como el endotelio vascular, el músculo liso y cardíaco, las neuronas, la placenta, el riñón y el estroma hepático entre otros. EpoR se expresa también en ciertas condiciones patológicas como en el cáncer³³.

3. Vías de señalización Epo/EpoR

La unión de Epo induce la dimerización de EpoR. Esta unión produce un cambio de conformación en el receptor, la cual propicia la fosforilación y subsecuente activación de la cinasa Janus 2 (JAK-2). JAK-2 se encuentra asociada constitutivamente al dominio intracelular de EpoR. Una vez activada, JAK-2 fosforila a múltiples proteínas citoplasmáticas y a ciertos residuos de tirosina de EpoR. Este evento conlleva a la creación de sitios de acoplamiento para que otras proteínas, que posean el dominio

SH2, se ensamblan a EpoR y así se activan diferentes cascadas de señalización. Las principales vías de señalización³¹ activadas por EpoR son las de STAT5, MAPK y PI3K, como se observa en la **Figura 2**.

Como mencionamos antes, Epo actúa a lo largo de la ruta de diferenciación eritroide como una de las principales citocinas reguladoras junto a otras citocinas como IL-3, trombopoyetina (TPO), ligando de la tirosina fetal 3 (FLT-3L) y el factor de células troncales (SCF)³⁴; esta última es capaz de actuar sinérgicamente con Epo y regular la proliferación, diferenciación y supervivencia de células progenitoras y precursores eritroides. A continuación detallaremos algunas características y funciones de SCF y su receptor (c-Kit).

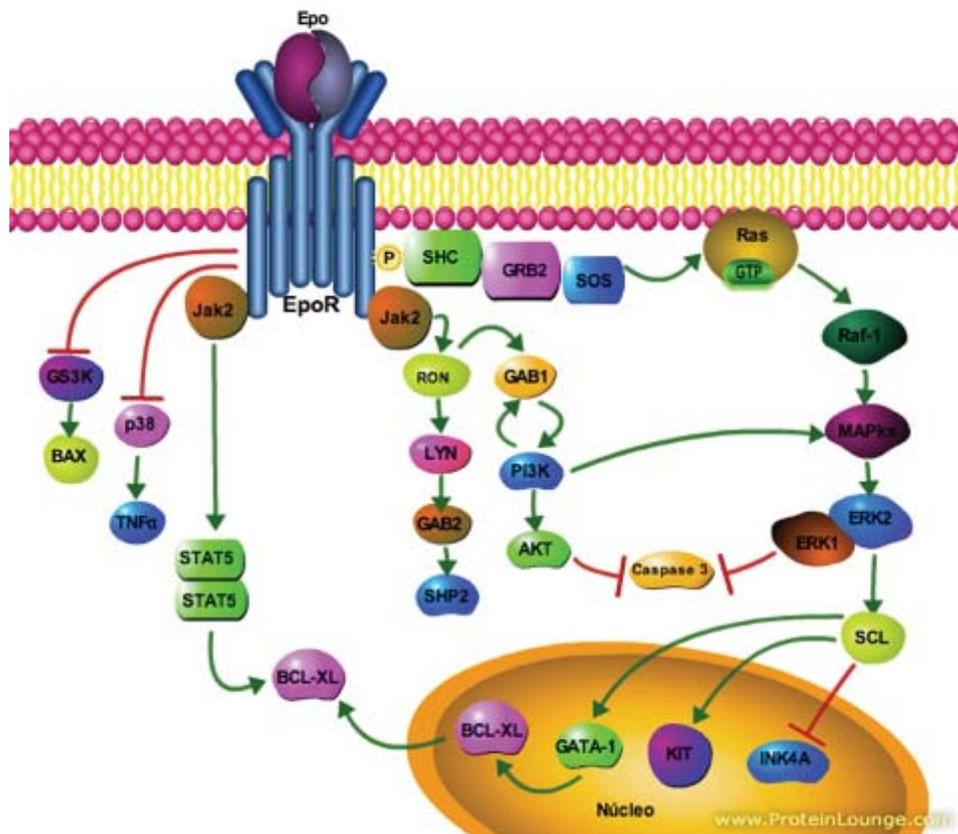


Figura 2. Principales vías de señalización activadas por Epo. Tras la unión de Epo a su receptor, éste puede iniciar con la activación de varias vías de señalización: la vía JAK-STAT, la vía Ras-MAPK y la vía PI3K.

C. El factor de células troncales (SCF) y su receptor (c-Kit)

1. SCF

El factor de crecimiento SCF es un homodímero unido por fuerzas no covalentes. Cada uno de los monómeros presenta puentes disulfuro internos, los cuales estabilizan su estructura. El gen que codifica para SCF se encuentra en el locus Sl (Steel) el cual se localiza en el cromosoma humano 12. El mRNA que codifica para SCF puede estar sujeto a *splicing* alternativo lo que produce una forma soluble y otra membranal de este factor. Existen dos isoformas, cada una de las cuales puede dar origen a una forma membranal (45 o 32 kDa) la cual puede sufrir proteólisis y originar una forma soluble del factor (31 kDa y 18.5 kDa)³⁵⁻³⁷. La expresión de SCF es fundamental durante el desarrollo embrionario pues estimula la hematopoyesis. En este período se expresa en tejidos donde se lleva a cabo la hematopoyesis como el hígado y la médula ósea. En tejido adulto, SCF se expresa en fibroblastos y en el endotelio y en menor cantidad en otros tejidos como el ovárico. La unión a su receptor c-Kit induce la dimerización completa de éste último, el cual se activa mediante la autofosforilación de ciertos de sus residuos de tirosina, como veremos en la siguiente sección.

2. c-Kit

c-Kit (120 y 145 kDa) es un receptor con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas del tipo III (como PDGFR y el receptor para CSF-1). El gen que lo codifica se encuentra en el *White spotting* locus, del cromosoma 4 humano. Codifica para al menos tres mRNAs diferentes. El receptor puede sufrir proteólisis y ser liberado de la membrana generando una forma soluble. Fisiológicamente se expresa en una gran variedad de tejidos incluyendo células embrionarias, germinales, epiteliales, hematopoyéticas, los mastocitos, los basófilos, el endotelio umbilical y las células del músculo liso vascular³⁸. La expresión de formas mutantes, con ganancia de función, también han sido identificadas en varios tipos de cáncer³⁹.

3. Vías de señalización

Las vías de señalización activadas^{31,36,37} por este factor están implicadas en procesos como la eritropoyesis, la linfopoyesis, el desarrollo y la función de las células cebadas, la megacariopoyesis, la gametogénesis y la melanogénesis. Las cascadas de señalización activadas por SCF/c-Kit regulan la proliferación, la supervivencia y la migración celular. Dentro de las vías activadas por SCF/c-Kit encontramos las siguientes: PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT y PLC γ . Véase **Figura 3**.

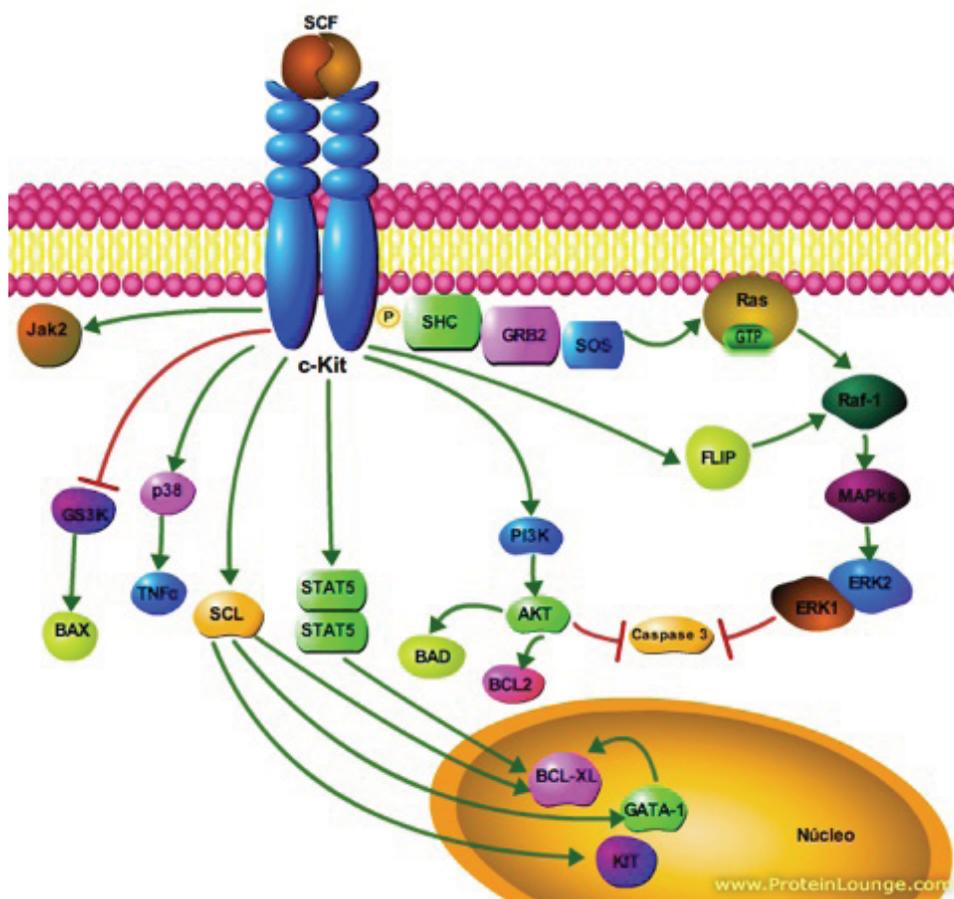


Figura 3. Principales vías de señalización activadas por SCF. Una vez que SCF se une a su receptor, varias vías de señalización se activan, entre ellas están las vías de PI3K/Akt, Ras-MAPK, JAK/STAT y PLC γ

D. La cooperación de c-Kit y EpoR

El papel de c-Kit y EpoR se ha estudiado mayormente en la eritropoyesis³⁴. A lo largo de esta ruta de diferenciación, Epo y SCF actúan sinérgicamente como las principales citocinas reguladoras pues activan diferentes vías de señalización a través de sus receptores cognados, los cuales mediante una orquestada expresión espacio-temporal rigen finamente el proceso de diferenciación eritroide⁴⁰.

c-Kit es considerado un marcador de troncalidad hematopoyético⁴⁰ ya que se expresa desde las etapas más tempranas de la hematopoyesis: desde las células troncales hematopoyéticas pluripotentes, pasando por los progenitores multipotentes, los progenitores linfoides y mieloides comunes, hasta los progenitores eritroides-megacariocíticos, los cuales se diferencian dando lugar a los progenitores eritroides.

La expresión de EpoR es más tardía, en cambio, pues comienza en el estadio de unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E, por sus siglas en inglés) y alcanza su máximo en las unidades formadoras de colonias eritroides CFU-E y en los proeritroblastos para luego de eso menguar^{40,41}.

En cuanto a los efectos atribuidos a estas citocinas, SCF participa principalmente en la sobrevivencia y en la proliferación de progenitores eritroides inmaduros. En cuanto a Epo, ésta actúa como agente mitogénico en células progenitoras eritroides tempranas (BFU-E) mientras que en progenitores eritroides tardíos (CFU-E) Epo actúa como agente de supervivencia pues facilita la evasión de la apoptosis⁴². Así pues, la actividad principal de Epo es controlar la producción de células eritroides a través de la promoción de la supervivencia y diferenciación de progenitores eritroides en la médula ósea y también con un papel menor como mitogénico⁴³. Aunque se ha observado que SCF puede inducir el crecimiento y la supervivencia de los progenitores eritroides, su efecto es potenciado por Epo⁴⁴.

Por otro lado, aunque existe evidencia de que Epo y SCF actúan de manera conjunta en la eritropoyesis en algunos estudios en ratones transgénicos³⁴ se ha demostrado que no poseen funciones redundantes. Ratones viables con mutaciones en los genes que codifican para SCF y c-Kit, sufren anemia hipoplástica macrocítica³⁴. Por otro lado mutaciones que afectan completamente a SCF y a c-Kit, ocasionan la muerte *in utero*

de los ratones³⁴. De manera similar ratones con deficiencias en Epo y EpoR mueren durante la gestación debido a la escasez de progenitores eritroides en el hígado. Los progenitores eritroides requieren de la sinergia de c-Kit y de EpoR para activar vías de señalización que les permitan sobrevivir, proliferar, diferenciarse y migrar³¹

Este fenómeno de sinergia se ha comprobado en experimentos tanto *in vitro*⁴⁵ como *in vivo*⁴⁶, en donde se ha evaluado la cantidad de BFU-E y CFU-E formados después de la administración simultánea de SCF y Epo. Sin embargo los mecanismos de cooperación aún se desconocen. Existen pruebas de una interacción física entre ambos receptores, la cual es mediada por una región del dominio citoplasmático de EpoR conocida como la caja 2⁴⁵. La interacción física contribuye con la cooperación acercando a los receptores, de tal modo que c-Kit transfosforila a EpoR. Al parecer una vez activado por SCF, c-Kit fosforila ciertos residuos de tirosina del dominio citoplasmático de EpoR^{46,47}. En particular se sabe que las tirosinas de la parte distal del dominio intracelular de c-Kit y de EpoR desempeñan un papel esencial en la regulación de la señalización, siendo los sitios de unión a Src y PI3K indispensables para que este proceso se lleve a cabo⁴⁷. Así mismo, se tiene noción de que las combinaciones de interacciones entre diferentes tirosinas de c-Kit y EpoR podrían tener diferentes resultados a nivel funcional.

Sin embargo, también existen pruebas de que hay otros mecanismos que controlan la señalización que no involucran necesariamente a las tirosinas de EpoR sino a mecanismos de transcripción⁴⁸. De hecho, algunos estudios señalan que la estimulación con SCF es esencial para mantener la expresión de STAT5 y EpoR⁴⁹. Todos estos estudios indican que si bien no hay un mecanismo de cooperación canónico, el efecto sinérgico es innegable al menos en los progenitores eritroides.

E. Participación de las vías de señalización Epo/EpoR y SCF/c-Kit en cáncer

1. Epo y anemia

Considerando el efecto mitogénico de Epo sobre los progenitores eritroides, a partir de 1989, el uso de eritropoyetina recombinante humana (rHuEpo) fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de anemia causada por fallas renales^{26,32}. Debido al éxito del tratamiento de pacientes anémicos con rHuEpo, a partir de 1993, ésta también fue aprobada para administrarse en pacientes con cáncer. Sin embargo en años recientes el tratamiento con rHuEpo ha generado muchas especulaciones en torno a los posibles riesgos que puede desencadenar su administración en pacientes con cáncer, esto debido a la expresión de Epo y EpoR en tejidos cancerosos^{50,51}.

2. Epo y EpoR en cáncer

La expresión de Epo y su receptor se ha identificado en varios tipos de cáncer, tanto en líneas celulares como en tejidos y cultivos primarios. Entre ellos destacan el cáncer vesicular, mamario, gastrointestinal, renal, hepático, prostático, pulmonar, pancreático y tiroideo además de leucemias, melanomas, sarcomas, tumores del sistema nervioso, del tracto reproductor femenino y de cabeza y cuello^{50,51}. En los casos donde tanto Epo como su receptor se expresan se ha propuesto un circuito de retroalimentación; en contextos cancerosos Epo parece operar de manera autocrina/paracrina. Al parecer, la expresión de Epo y EpoR en líneas celulares tumorales es inducible por hipoxia^{52,53}. Además se ha reportado la presencia de diferentes formas de EpoR, que se generan por *splicing* alternativo que pudieran regular de manera diferencial el efecto de Epo sobre estas células⁵⁴.

En cuanto al efecto proliferativo de Epo sobre las células tumorales, algunos grupos reportan que Epo estimula la proliferación celular⁵⁵ y otros sugieren que este estímulo no tiene ninguna influencia en la multiplicación celular⁵⁶.

3. Epo en cáncer de mama

En mama, se ha estudiado la expresión y localización de Epo y su receptor tanto en tejidos normales como en líneas celulares y tejidos provenientes de neoplasias de mama.⁵⁷ En condiciones normales tanto el epitelio ductal como el epitelio lobular expresan Epo y EpoR⁵⁸. Epo se localiza dentro de las células y además se ha demostrado que los niveles de Epo en los lóbulos aumentan conjuntamente a los cambios secretorios y que Epo se encuentra de manera constitutiva en la leche y en secreciones de mujeres que no están en periodo de lactancia⁵⁹. Por otro lado los datos a partir de inmunohistoquímicas muestran que la localización de EpoR puede ser tanto citoplasmática como membranal en los tejidos estudiados, en tanto que en líneas celulares EpoR se distribuye principalmente en el citoplasma. Además se ha demostrado que algunas líneas tumorales secretan la forma soluble de EpoR. Además, la expresión de la forma truncada también se ha identificado en cáncer de mama.

En el cáncer de mama, existe en la actualidad una gran controversia con respecto al papel de Epo/EpoR. Esto se debe a varias razones, la primera de ellas gira en torno a las metodologías y anticuerpos utilizados para identificar la expresión de Epo y su receptor en líneas celulares y cortes histológicos. La mayoría de las investigaciones que reportan la presencia de EpoR en tejido canceroso se basan en la inmunohistoquímica y en la utilización del anticuerpo C-20 de Santa Cruz, el cual ha demostrado ser inespecífico⁶⁰.

En segundo lugar se tienen datos contradictorios en cuanto al efecto ejercido por Epo en líneas celulares positivas para EpoR. Actualmente existen dos posiciones en cáncer de mama; mientras que el grupo de Acs⁵⁰ sostiene que Epo estimula la proliferación en las líneas celulares MCF7 y BT-594, otro grupo, el de Jelkmann³³ y Laugsch⁵⁶ han demostrado que Epo no estimula la proliferación en la línea MCF7. Esto según lo atribuye J. Fandrey⁶¹ se debe a la utilización de líneas celulares comerciales que han

sido propagadas centenares de veces, lo cual las convierte en un modelo poco confiable debido a los cambios genéticos que van adquiriendo en cada pasaje.

Por otro lado, en 2003 un ensayo clínico⁶² en pacientes con cáncer de mama, mostró que los pacientes que recibían rHuEPO tenían menores posibilidades de sobrevivir en comparación a los pacientes que recibían un placebo. Estos estudios despertaron una controversia en cuanto a los posibles riesgos de Epo sobre las células tumorales. Esto ha llevado a una revisión exhaustiva de los métodos y los modelos utilizados, pues sólo así se podrá determinar realmente la presencia y la funcionalidad del receptor así como su efecto sobre la proliferación de células cancerígenas y el potencial invasivo de éstas.

4. SCF/c-Kit en cáncer

En cuanto a la expresión de c-Kit, ésta también se ha analizado en diferentes tipos de cáncer. La expresión aberrante de c-Kit y su ligando se ha encontrado en diferentes tipos de cáncer que incluyen tumores neurales, pulmonares, prostáticos y colorrectales.^{63,64} El receptor presenta en algunos casos mutaciones que aparecen tanto en sus dominios extracelulares como en el transmembranal e incluso en el sitio catalítico⁶⁵. Estas mutaciones ocasionan que el receptor se encuentre constitutivamente activo y se ha sugerido una correlación entre esta activación y el crecimiento tumoral. El más claro y con más evidencia de estos casos es el de los tumores del estroma gastrointestinal^{66,67} (GIST, por sus siglas en inglés), en donde formas mutantes de c-Kit se expresan en el 90% de los casos. En cáncer de colon, se ha comprobado que c-Kit ejerce un efecto antiapoptótico además de fomentar el potencial invasivo de las células⁶⁸. Otros tipos de cáncer en donde se han encontrado anomalías estructurales y funcionales de c-Kit incluyen mastocitomas, tumores de células germinales, GIST, cáncer ovárico, melanoma, cáncer de células pulmonares pequeñas (SCLC), neuroblastoma y cáncer de mama^{63,69}.

5. SCF/c-Kit en cáncer de mama

La expresión de c-Kit se ha observado en epitelio mamario⁷⁰⁻⁷² sano así como en epitelio transformado, aunque esta expresión es controversial ya que algunos estudios señalan que la expresión se pierde^{73,74} y otros reportes sugieren que c-Kit es pro-oncogénico^{75,76}.

La corriente que propone la pérdida progresiva de c-Kit señala que sólo el 20% de los pacientes con cáncer de mama expresan este receptor⁷⁷. Además de esta investigación, se tienen estudios basados en inmunohistoquímicas que señalan que la expresión de c-Kit es más frecuente en el tejido sano que en el canceroso⁷⁴. En suma estos trabajos concluyen que c-Kit se expresa abundantemente en el epitelio mamario sano, que su expresión es variable en lesiones benignas y que en carcinomas mamarios su expresión se ve considerablemente menguada. Por lo tanto se propone a la pérdida c-Kit como un marcador de progresión tumoral.

Por otro lado, hay otros grupos que atribuyen a c-Kit una función oncogénica en el cáncer de mama. Varios grupos de trabajo han encontrado una expresión variable pero considerable del receptor en pacientes con pronóstico pobre⁷⁸. En un estudio se propone a c-Kit como un posible indicador de carcinomas más agresivos, los cuales se caracterizan por presentar transiciones mesenquimatosas⁷⁹. A estos trabajos se une otro más en donde se observa que la estimulación con SCF de líneas celulares como MCF7, ZR75-1 y MDAMB231, todas ellas de cáncer de mama, conlleva a un incremento en la proliferación de éstas⁷⁷.

Todos estos datos, como en el caso del papel de Epo son contradictorios y es necesario hacer un estudio más amplio para identificar el verdadero papel tanto de c-Kit como de EpoR en el cáncer de mama. Al respecto, es preciso estandarizar mejor las técnicas de detección de los receptores y considerar la heterogeneidad intertumoral⁸⁰ e intratumoral⁸¹ la cual puede explicar que los receptores se expresen en ciertos individuos o incluso en ciertas células mientras que en otros no, lo cual hace difícil la generalización acerca de la presencia y/o ausencia de los receptores. Además, se debe considerar que los diferentes resultados obtenidos hasta el momento han sido en su mayoría, realizados en líneas comerciales que han sido sujetas a numerosos pasajes y

que probablemente hayan dado origen a subclonas de una misma línea celular, lo cual podría explicar los datos contradictorios en cuanto al posible efecto proliferativo de Epo y SCF en algunos de los trabajos citados.

II. Antecedentes

Como se mencionó previamente, un factor que no se ha tomado en cuenta es la heterogeneidad genética en las poblaciones de células cancerígenas; aunque se hayan originado de la misma célula, los tumores contienen subpoblaciones de células que difieren en su morfología, cariotipo, receptores, actividad enzimática, características inmunológicas, habilidad metastática y sensibilidad a los agentes terapéuticos⁸². Un ejemplo que ilustra este fenómeno de heterogeneidad intratumoral es el trabajo realizado de manera independiente por un grupo de la Unidad de Bioquímica Molecular del Instituto de Nutrición y Ciencias Médicas “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), el cual logró obtener dos clonas celulares provenientes de un mismo tumor de cáncer mamario ductal: una de ellas positivas para el receptor PDGFR y la otra negativa para el mismo receptor (Artículo en preparación). Estas líneas celulares fueron nombradas MBCD5(+) y MBCD5(-) de acuerdo a la presencia de PDGFR. Las características heterogéneas de estas dos sublíneas celulares las volvieron interesantes para la línea de investigación de nuestro laboratorio.

Dados estos resultados, dichas líneas celulares resultaron valiosos modelos para estudiar el efecto diferencial de la expresión de EpoR y c-Kit así como el posible efecto de cooperación entre ambos receptores.

Además en la sección precedente se expusieron dos hechos de suma importancia para la justificación de este proyecto. En primer lugar hemos visto que a pesar de que numerosos estudios han investigado el papel, en cáncer de mama, de Epo/EpoR por un lado y de SCF/c-Kit por otro lado, de los trabajos publicados hasta ahora no hay ninguno en el que el papel de ambos factores de crecimiento se estudie de manera conjunta. En segundo lugar, hemos mencionado que la heterogeneidad celular es un factor importante para determinar los posibles efectos que puedan desencadenar Epo y SCF. Tomando en cuenta las características de las líneas celulares de las cuales disponemos es posible realizar experimentos para saber qué efecto tienen en cada población diferentes combinaciones de estímulos de Epo y SCF y analizar si éstos estimulan la proliferación y/o la migración celular y si la presencia de ambos potencia la promoción de estos eventos.

Tomar en cuenta esta heterogeneidad quizás ayudará a entender mejor la resistencia a ciertos fármacos, los efectos adversos que se le atribuyen a Epo, así como también ayudará a precisar las características de las células con potencial metastático.

III. Hipótesis

Considerando que c-Kit y EpoR participan de manera conjunta en la proliferación, diferenciación, supervivencia, y migración de los progenitores eritroides y que estos receptores pueden expresarse en cáncer de mama, es posible que exista una cooperación de las vías de señalización de ambos receptores que promueva la proliferación y la migración de las células tumorales de mama en donde ambos receptores se expresen.

IV. Objetivos

A. Objetivo general

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los receptores EpoR y c-Kit para determinar su función en la proliferación y la migración de células cancerígenas de origen mamario.

B. Objetivos particulares

1. Establecer la expresión de los receptores EpoR y c-Kit en las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MBCD5 (+) y MBCD5(-).
2. Evaluar el efecto de Epo y SCF, por separado y en conjunto, sobre la proliferación celular y la migración.
3. Determinar el efecto de la inhibición de c-Kit y EpoR sobre la proliferación y la migración.
4. Estudiar algunas de las vías de señalización que participan en estos procesos.

V. Material y Métodos

A. Cultivos celulares

Las líneas celulares que se utilizaron en este trabajo fueron donadas por la Dra. María de Jesús Ibarra Sánchez del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las líneas celulares de cáncer de mama con las que se realizaron los experimentos, MBCD5(+) y MBCD5(-), se obtuvieron de dos subpoblaciones provenientes del mismo tumor con expresión diferencial en ciertos receptores membranales; mientras que la primera era positiva para PDGFR, la segunda era negativa para este mismo receptor. Las líneas celulares que se utilizaron como control fueron las líneas celulares de cáncer cérvico-uterino: HeLa —positiva para EpoR— e InBI y Calo —ambas positivas para el receptor EpoR y c-Kit—. Los cultivos celulares se hicieron en condiciones estándar: a 37°C, en condiciones normóxicas (5% CO₂) y en medio RPMI (In Vitro) suplementado con antibióticos (50000 U/μg/ml de penicilina-estreptomicina) (In Vitro) y con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone). Los cultivos se sembraban cada 48 horas cuando éstos alcanzaban una confluencia del 80%. Las células se lavaban dos veces con 10 ml de PBS y se despegaban con 0.5 ml de tripsina al 0.025 % (In Vitro), luego se les agregaba 1 ml de medio para inactivar la tripsina y se centrifugaban a 2500 rpm durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, el sobrenadante se descartaba, se añadía 1 ml de medio para resuspender y se procedía a sembrar a una proporción de 1:4.

B. Extracción de RNA y RT-PCR

El RNA total se extrajo con el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). El protocolo que se adoptó fue el siguiente. Las células se tripsinizaron, se centrifugaron y se lavaron con PBS. Después se determinó el número de células (1×10^7). Posteriormente se añadió 0.6 ml de la solución RLT Plus para provocar la lisis de las células y se mezcló con un vortex. Una vez efectuada la lisis se procedió con la homogeneización del lisado. Para esto se

transfirió el lisado a una columna QIAshredder, la cual se colocó sobre un tubo colector, y se centrifugó durante 2 min a máxima velocidad (13400 rpm). Enseguida se añadió 0.6 ml de etanol al 70% al lisado y se mezcló pipeteando. La muestra se transfirió inmediatamente después a una columna RNEasy, colocada sobre un tubo colector, y se centrifugó durante 15 s a 10000 rpm. El sobrenadante se descartó y a la columna se le agregaron 0.7 ml del Buffer RW1 y se centrifugó nuevamente durante 15 s a 10000 rpm. El sobrenadante se descartó una vez más y luego se agregaron 0.5 ml del Buffer RPE a la misma columna, la cual se centrifugó durante 15 s a 10000 rpm. Después de descartar el sobrenadante, se añadieron 0.5 ml del Buffer RPE pero esta vez se centrifugó durante 2 min a 10000 rpm. Finalmente se añadieron 50 µl de agua libre de RNasas a la misma columna y ésta se colocó sobre un nuevo vial, se centrifugó durante 1 min a 10000 rpm y se colectó el DNA. Una vez eluido el DNA se procedió a su cuantificación utilizando la tecnología NanoDrop (Thermo Scientific).

El RT-PCR para la detección del mensajero de EpoR se realizó con el kit SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Qiagen). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación fueron los siguientes: EpoR forward 5'GGC AGT GTG GAC ATA GTG GC 3' y EpoR reverse 5' AGC AGG ATG GAT TGG GCA GA3', los cuales amplifican un segmento del gen de EpoR de 497 pares de bases, el cual va del nucleótido 1304 al 1801. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50µl utilizando 10 µl del buffer 5x QIAGEN OneStep RT-PCR, 2.0µl del dNTP Mix, 0.6µM de cada oligonucleótido, 26 µl del QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix y 50 ng de RNA. La reacción de retrotranscripción tuvo lugar durante 30 minutos a 50°C. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial del DNA a 95°C durante 15 minutos, seguido de 40 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 55°C y un minuto a 72°C; la extensión final fue a 72°C durante 10 minutos. Los productos de la reacción se sometieron a una electroforesis en agarosa al 1.2%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de rayos UV. Como control positivo se utilizó RNA extraído de células HeLa, InBl y CaLo. Como control negativo se utilizó agua ultrapura (Gibco) en vez de RNA.

Para la amplificación de c-Kit las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas fueron las siguientes: c-Kit forward 5'-GTT GAG GCA ACT GCT TAT GG-3' y c-Kit reverse 5'-GCT TCT GCA TGA TCT TCC TG-3'. Estos amplifican un segmento del gen que corresponde a 289 pares de bases que van del nucleótido 1897 al 2186. La metodología y las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron las mismas que para EpoR, en tanto que para la PCR las condiciones fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C durante un minuto; alineamiento a 58°C durante minuto y medio y la extensión a 72°C por un minuto con una extensión final de cinco minutos 72°C. Los controles positivos fueron los mismos que para EpoR. El análisis de los productos se realizó también como en el caso de EpoR.

C. Extracción de proteínas y Western blot

La extracción se realizó manteniendo todo el tiempo a las células en hielo. El medio de cultivo se retiró y se realizaron dos lavados con 10 ml de PBS frío. Después de los lavados, se agregó 1 ml de PBS frío y se procedió a raspar las cajas. El raspado se recuperó en viales y se centrifugó en el cuarto frío durante 20 minutos a 13400 rpm. El sobrenadante fue retirado y se agregaron 0.5 ml de buffer de lisis (Tris pH 7.4, NaCl 100 mM, EDTA, Triton X-100 0.5%) el cual incluía inhibidores de proteasas (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) e inhibidores de fosfatasas (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma). Después de incubar durante 20 minutos en hielo, resuspendiendo constantemente, el lisado se centrifugó durante 3 minutos a máxima velocidad. El sobrenadante se colectó y se guardó a -80°C. La proteína se cuantificó usando el kit DC Protein Assay (Biorad). Para la electroforesis, se utilizó 30 µg de proteína a las que se agregó solución de Laemli (2X). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos, y se cargaron en un gel de acrilamida al 7%. La electroforesis se efectuó a 100-150 V durante hora y media. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante una hora a 100 V y luego se reveló con quimioluminiscencia (Immobilion Western HRP Chemiluminescent Substrate, Millipore). Los anticuerpos que

se utilizaron fueron: c-Kit (Ab81) de Cell Signaling; Anti-Erythropoietin Receptor E4644 de Sigma-Aldrich; beta-Actin [AC-15] (ab6276) de Abcam; PCNA (FL-261) sc-7907 de Santa Cruz; GAPDH (GTX61835), STAT5 (GTX27969), pSTAT5 (GTX61079), ERK1/2 (GTX17942) y pERK1/2(GTX24819) de Genetex. La intensidad de las bandas se analizó con el programa ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

D. Citometría de flujo

Las células se lavaron dos veces con 10 ml PBS y luego se despegaron con una solución de verseno. Se contaron 1×10^6 células y se lavaron con PBS. Posteriormente las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 500 μ l de PBS-azida de sodio al 0.1%-paraformaldehído al 2%. Luego de incubarlas durante 15 minutos en hielo, las células se lavaron 2 veces con PBS-azida y se resuspendieron en 70 μ l de PBS-azida y 30 μ l de PBS-albumina al 5%. Después de incubarlas por 10 minutos se agregaron los anticuerpos acoplados a fluoróforos para EpoR (RD Systems FAB307F) y c-Kit (RD Systems FAB332P). Las células se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad y se lavaron de nueva cuenta dos veces. Finalmente se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se procedió a la lectura en el citómetro de flujo FACS Calibur BD, Biosciences. Los datos se analizaron con el software BD FacStation.

E. Ensayos de viabilidad

El método utilizado para determinar la proliferación celular fue un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). El MTT es un compuesto de color amarillo que es reducido a formazán por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Este método se utiliza

para inferir la supervivencia y la proliferación celular; la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Para los ensayos se sembraron 50000 células por pozo en placas de 24 pozos. Pasadas 4 horas de incubación, para permitir su adhesión a la placa, las células se estimularon con diferentes concentraciones de rHuEPO (ExetinA, Laboratorios Pisa) y/o SCF (Sigma Aldrich S7901-10UG) llevándolas a un volumen total de 500 μ l por pozo. La proliferación se estimó a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas) y se procedió de la siguiente manera: después de retirar el medio, 250 μ l de la solución de MTT (0.5 mg/ml de MTT disueltos en PBS con pH 7.0-7.2) y 250 μ l de medio se añadieron a cada pozo y se incubaron dos horas a 37°C. Pasado este tiempo, se retiró el medio y los cristales de formazán se resuspendieron en 500 μ l de isopropanol y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

F. Ensayos de migración

Para evaluar la capacidad migratoria de las células, se utilizó el kit QCM™ 24 Well Colorimetric Cell Migration Assay (Millipore Corporation, Billerica, MA). Este ensayo se realizó en cámaras de migración, diseñadas con base en el principio de Boyden: las células se siembran en una cámara superior mientras que en la cámara inferior se añade la sustancia quimioatrayente. Si la sustancia tiene capacidades atrayentes, las células traspasan el poro de la cámara superior hacia la inferior. Las células que migran a través de la membrana, se incuban con una solución colorimétrica, por lo que posteriormente la tinción puede extraerse con un solvente y leerse en un lector para placas a una longitud de onda de 560 nm. El kit utilizado contenía insertos (pequeñas cámaras) con una membrana de policarbonato con poros de 8 μ m. El protocolo se detalla a continuación. Previo al ensayo, células al 80% de confluencia fueron sometidas a un ayuno de SFB durante 24 horas. Después de verificar visualmente su condición, las células se lavaron dos veces con PBS estéril. Luego las células se despegaron de su caja con 0.5 ml de tripsina, se incubaron durante 3 min a 37°C y se

centrifugaron a 2500 RPM durante 5 min. Después de agregarles 1 ml de medio RPMI con 5% BSA, las células se contaron y se llevaron a una concentración de 1×10^6 células/ml usando medio sin suero. A continuación 0.3 ml de esta suspensión se agregó a cada inserto. Luego, 0.5 ml de medio sin suero pero suplementado con Epo o SCF o Epo/SCF o SFB al 5% se añadió a la cámara inferior y las células se incubaron a 37°C. Pasadas 24 horas, se retiró el medio de los insertos y éstos se transfirieron a nuevos pozos dónde se agregó 0.4 ml/pozo del colorante Cell Stain y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Enseguida cada inserto se lavó en un vaso de precipitado con agua destilada y para eliminar el exceso de colorante cada inserto se limpió cuidadosamente con un hisopo evitando romper la membrana de policarbonato. Una vez limpios y secos los insertos se transfirieron a nuevos pozos donde se sumergieron en 0.2 ml de la solución de extracción (Extraction Buffer) durante 15 min. Finalmente se tomaron 0.1 ml de cada pozo para transferirlos a una placa de 96 pozos y se leyó a una longitud de onda de 560 nm.

G. Ensayos de silenciamiento

Para la inhibición de la expresión de EpoR y c-Kit, se utilizó el sistema de transfección de RNAs interferentes de Santa Cruz Biotechnology. Los siRNAs utilizados para silenciar la expresión de EpoR y la de c-Kit fueron (sc-37092) y (sc-37092) respectivamente. Como control negativo se utilizó una secuencia inespecífica (sc-37092) que no induce la degradación de ningún mRNA conocido. En placas de seis pozos se sembraron 2×10^5 células por pozo en un volumen de 2 ml de medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado y sin antibióticos. Las células se incubaron en condiciones estándar durante 24 horas, con el fin de que alcanzaran una confluencia de entre 60 y 80%. Después de esta incubación las células fueron lavadas con 2 ml del reactivo siRNA Transfection Medium (sc-36868). El medio se retiró. Los RNAs interferentes y el control fueron diluidos, por separado, en 0.8 ml de la solución siRNA Transfection Medium (sc-36868) mezclado con siRNA Transfection Reagent (sc-

29528) e incubados durante media hora. El contenido de cada tubo fue vertido en las células, que fueron incubadas una vez más durante 7 horas en condiciones estándares. Pasado este tiempo se agregó 1 ml de medio RPMI suplementado con 10% de SFB y antibióticos sin remover la mezcla de transfección. Las células fueron incubadas 24 horas más. Luego de esto, el medio fue aspirado y remplazado con medio normal (RPMI suplementado con 5% de SFB inactivado y antibióticos). Pasadas 48 horas, las células fueron utilizadas para extraer proteína total y realizar los ensayos de viabilidad y migración.

H. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron primero con un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para después someterlos a las pruebas post-hoc de Dunnett y Tukey usando el programa estadístico GraphPad Prism version 5.02 para Mac (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com)

VI. Resultados

A. Expresión del receptor EpoR en líneas celulares de cáncer de mama tipo ductal

En el presente estudio, caracterizamos la expresión de EpoR en dos líneas de cáncer de mama, que surgieron de dos subpoblaciones celulares del mismo tumor. Datos de nuestros colaboradores (Dra. Ibarra Sánchez, INNCMSZ) indicaron que mientras la línea denominada MBCD5(+) era positiva para el receptor PDGFR, la línea MBCD5(-) no lo expresaba.

Lo primero que se realizó fue investigar la expresión de EpoR mediante RT-PCR y se encontró que ambas líneas presentaban el transcrito (**Fig. 4A**). La expresión de EpoR fue comprobada en ambas líneas por medio de Western blots realizados a partir de extractos totales de proteína (**Fig. 4B**).

Además con el fin de corroborar la expresión membranar del receptor, se llevaron a cabo citometrías de flujo sin permeabilizar en ambas líneas celulares (**Fig. 4C**). Como se puede observar, ambas líneas celulares mostraron una expresión del receptor en la membrana plasmática. El análisis de la citometría indicó que la expresión membranar de EpoR fue similar en ambas líneas celulares: 14% en MBCD5(-) y 13% en MBCD5(+). Con esto se infiere que el receptor EpoR se expresa de un modo cuantitativamente similar en las dos líneas celulares.

B. Expresión del receptor c-Kit en líneas celulares de cáncer de mama tipo ductal

Para continuar con la caracterización de las líneas celulares se evaluó la expresión del receptor c-Kit en las dos líneas celulares. Los resultados obtenidos mediante Western blot y citometría de flujo (**Fig. 4C y 4D**) muestran que ambas líneas celulares expresan al receptor c-Kit. A partir de esto y de los resultados anteriores, decidimos limitar

nuestro estudio a una sola línea celular: la MBCD5(-). Ésta, como señalamos anteriormente había mostrado la expresión tanto de EpoR como de c-Kit pero no la de PDGFR. Esto resultó relevante para nuestro estudio ya que PDGFR es un receptor que pertenece a la misma familia que c-Kit (la ausencia de PDGFR es una ventaja en este caso, como discutiremos más adelante). A fin de evitar ambigüedades, a partir de ahora esta línea será denominada MBCD5.

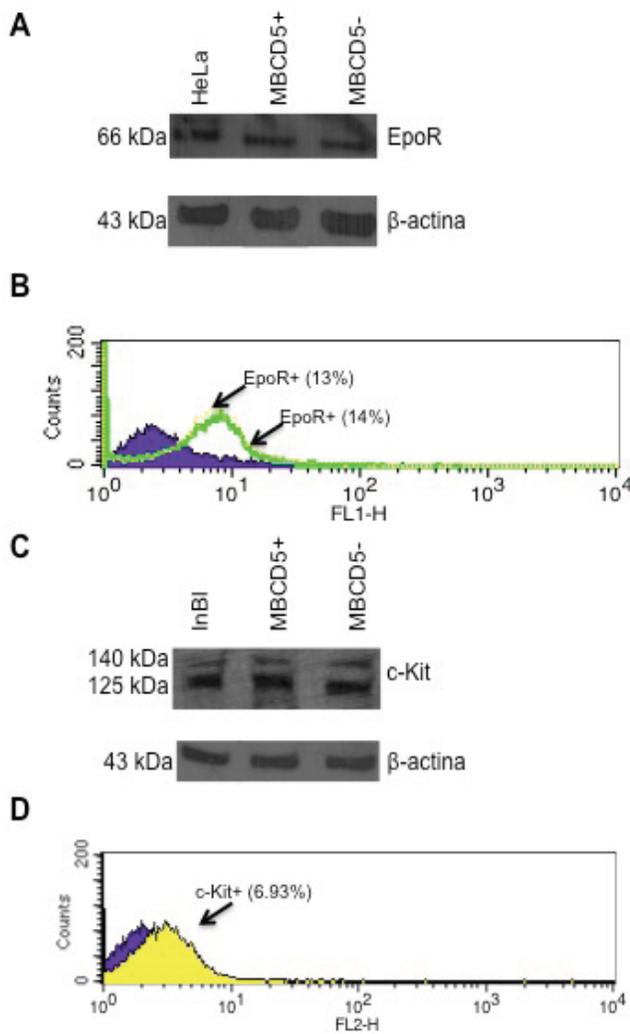


Figura 4. Caracterización de la expresión de los receptores EpoR y c-Kit en las líneas celulares de cáncer mamario MBCD5(+) y MBCD5(-)

A) Detección de EpoR mediante Western blot con extractos totales de proteína. 1) *HeLa*, control positivo para EpoR; 2) MBCD5(-); 3) MBCD5(+). **B)** Histogramas representativos del análisis por citometría de flujo que muestra la expresión superficial de EpoR. La zona morada corresponde al control negativo (células sin ningún tipo de marcaje), la línea amarilla desplazada hacia la derecha representa a la población de células MBCD5(-) positivas para el receptor EpoR (13%). La línea verde delimita a la población de células MBCD5(+), las cuales representan el 14% de la población total de células analizadas. **C)** Expresión de c-Kit analizada mediante Western blot de extractos totales. 1) Línea de cáncer cérvico uterino *InBI*, control positivo para c-Kit. 2) MBCD5(-), 3) MBCD5(+). **D)** Histogramas del análisis por citometría de flujo de la expresión superficial de c-Kit en las células MBCD5(-). El área morada corresponde a las células control, sin ningún marcaje. La zona amarilla indica las células MBCD5(-) que expresan el receptor c-Kit, las cuales representan el 6.93% de la población total de células analizadas.

C. Efecto de la eritropoyetina en la proliferación celular

En nuestro laboratorio, estudios previos⁸³ habían demostrado que la administración de Epo exógena inducía la proliferación de células cancerígenas provenientes del cuello del útero que expresaban EpoR. En nuestro caso, habiendo demostrado la expresión de EpoR en nuestra línea celular de interés, también se estudió si Epo podía potenciar la proliferación. Para los ensayos se utilizaron diferentes concentraciones de Epo (0-50 U/ml) y se estimó la viabilidad celular a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) mediante el ensayo de MTT.

Los resultados obtenidos (**Fig. 5**) y las pruebas estadísticas muestran que después de 24 horas no existen diferencias importantes entre el control y los diferentes tratamientos, sin embargo a las 48 horas sí se observan diferencias significativas entre el control y siete de los tratamientos: el de 0.5, 1, 2.5, 10, 15 y 20 U/ml. Con el tratamiento de 5 U/ml la proliferación aumentó 1.8 veces. Así mismo, con el tratamiento de 0.5 U/ml se registró un aumento de 1.7 veces. Con los tratamientos de 1, 2.5 y 10 U/ml la proliferación aumentó 1.6 veces en comparación a las células sin ningún tratamiento.

Finalmente con los tratamientos de 15 y 20 U/ml la proliferación se acrecentó en 1.3 veces. A las 72 horas también observamos un incremento en la proliferación con los mismos siete tratamientos. Esta vez las células proliferaron 1.9 veces más con el tratamiento de 10 U/ml, 1.7 veces más con el tratamiento de 1 U/ml y 1.6 veces más con los tratamientos de 0.5, 2.5, 5, 15 y 20 U/ml. Lo que observamos aquí sugiere que el estímulo con Epo promueve la proliferación en células que expresan el receptor EpoR.

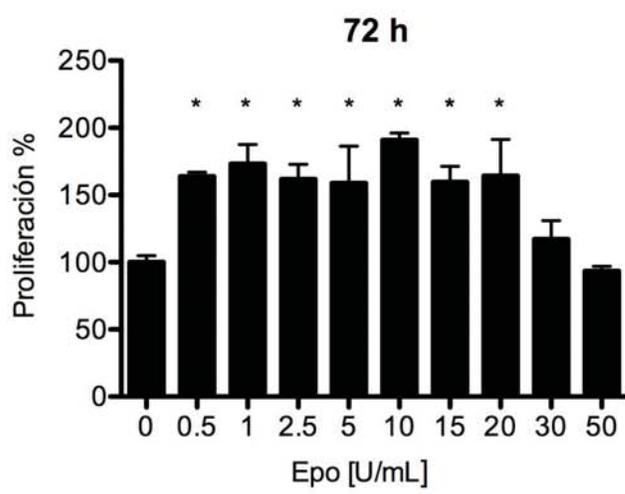
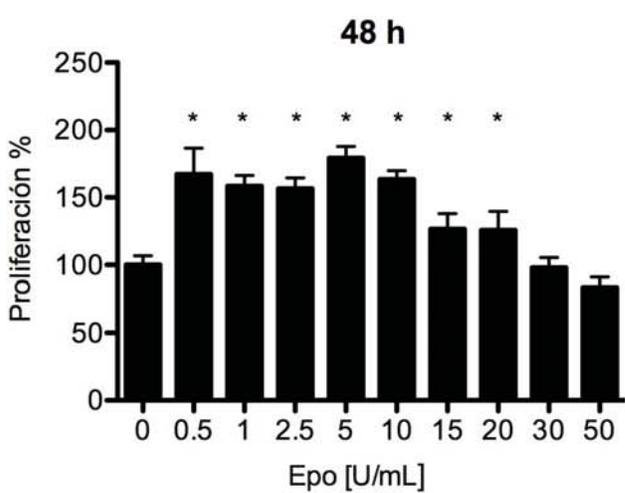
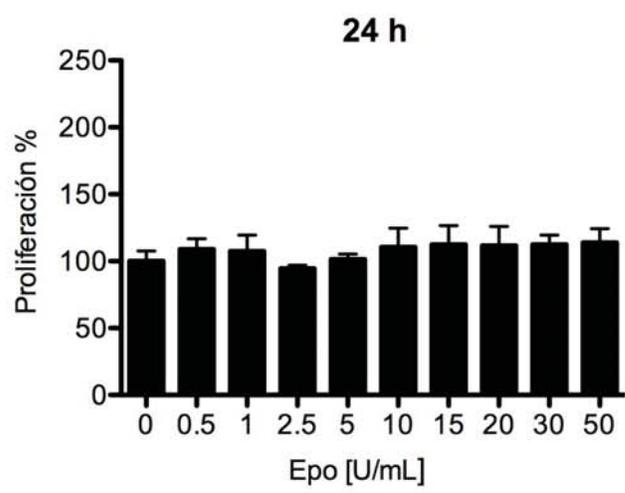


Figura. 5. Efecto de Epo sobre la proliferación de las células MBCD5. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de rHuEPO a diferentes tiempos. La viabilidad celular fue estimada con el ensayo de MTT, después de 24, 48 y 72 horas. Las células se mantuvieron con medio RPMI suplementado con 5% de SFB inactivado. Los datos son expresados como el porcentaje de células que proliferaron en comparación al control [0 U/ml EPO] y representan el promedio de 3 experimentos independientes cada uno realizado por duplicado; las columnas representan el promedio de los experimentos y las barras de error muestran la desviación estándar. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron ANOVA de un sentido y la prueba de Dunnett. * $p < 0.05$

D. Efecto del SCF en la proliferación celular

Después de analizar el efecto proliferativo de Epo, decidimos estudiar si SCF también era capaz de aumentar la expansión de las células tumorales. Siguiendo el mismo principio que para los ensayos donde se estimuló a las células con Epo, aquí también se evaluó la proliferación de la línea celular MBCD5 a diferentes tiempos (24, 48 y 72) y con diferentes concentraciones de SCF (1-100 ng/ml) utilizando el ensayo de MTT.

Los datos obtenidos (**Fig. 6**) mostraron que después de 24 horas el estímulo con SCF no induce cambio alguno en la proliferación de las células, pero a partir de las 48 horas distinguimos que la proliferación aumentó 1.1, 2, 2.1, 2.3 y 2.3 veces con concentraciones de 10, 25, 50 y 100 ng/ml de SCF respectivamente. A las 72 horas la proliferación se incrementó en 1.4 veces con el tratamiento de 25 ng/ml y en 2 veces con 50 y 100 ng/ml de SCF. Estos resultados apuntaron a que la vía activada por SCF puede estimular la proliferación de células que expresan al receptor c-Kit.

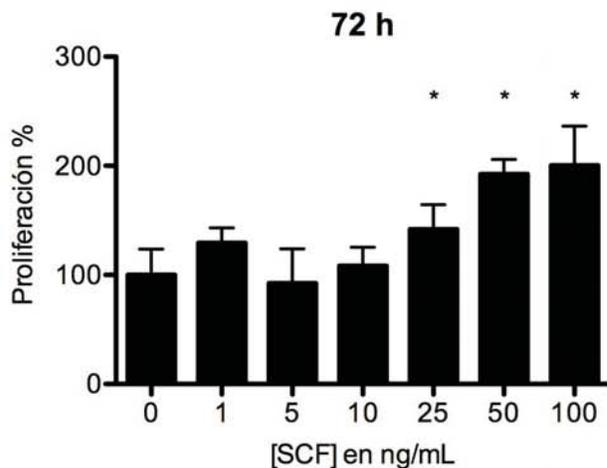
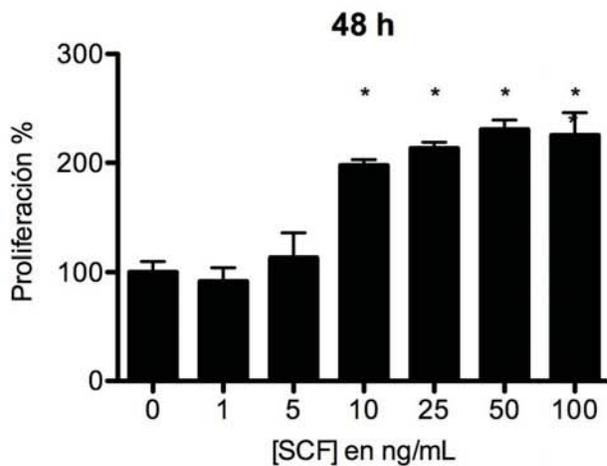
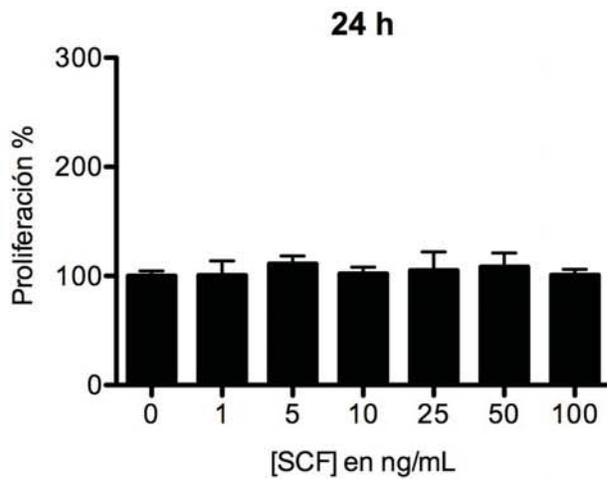


Figura. 6. Efecto de SCF sobre la proliferación de la línea MBCD5. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de SCF a diferentes tiempos. La viabilidad celular fue estimada con el ensayo de MTT, después de 24, 48 y 72 horas. Las células se mantuvieron con medio RPMI suplementado con 5% de SFB inactivado. Los datos son expresados como el porcentaje de células que proliferaron en comparación al control [0 ng/ml SCF] y representan el promedio de 3 experimentos independientes cada uno realizado por duplicado. Las columnas representan el promedio de los experimentos y las barras de error muestran la desviación estándar. * $p < 0.05$ comparado con el control. El análisis estadístico incluyó un ANOVA de un sentido con la prueba post-hoc de Dunnett.

E. Efecto conjunto de SCF y Epo en la proliferación celular

Como observamos que tanto Epo como SCF son capaces de estimular la proliferación de manera independiente (**Fig. 5 y 6**), nuestro siguiente paso fue determinar si el tratamiento de las células con ambas citocinas podría resultar en un incremento en la proliferación celular aún más importante que el observado por separado con cada una de ellas.

Las células fueron tratadas con 1 U/ml de Epo y 50 ng/ml de SCF, concentraciones con las cuales se observó previamente una proliferación acrecentada en los ensayos independientes. La viabilidad de las células se estimó a las 72 horas mediante el ensayo de reducción de MTT. Paralelamente se determinó, mediante Western blot, la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA, por sus siglas en inglés), un marcador de proliferación celular. La densidad de las bandas fue analizada para ponderar la abundancia de PCNA con el programa ImageJ.

Los datos observados en el MTT (**Fig. 7A**) indicaron que la coestimulación indujo un aumento en la proliferación celular de 1.34 veces con respecto al control pero no con respecto a los tratamientos con una sola citocina (Epo o SCF). Esto fue corroborado con el Western blot y el análisis densitométrico (**Fig. 7B**) en donde se observó que el nivel del marcador proliferativo PCNA en las células sometidas a coestimulación no cambió de manera significativa con respecto a las células estimuladas únicamente con Epo y SCF.

Esto nos dio un indicio de que la combinación de Epo y SCF no potencializa la proliferación de las células MBCD5. Esto podría deberse a una posible regulación intracelular entre las vías de señalización de Epo/EpoR y SCF/c-Kit, como se discutirá más adelante.

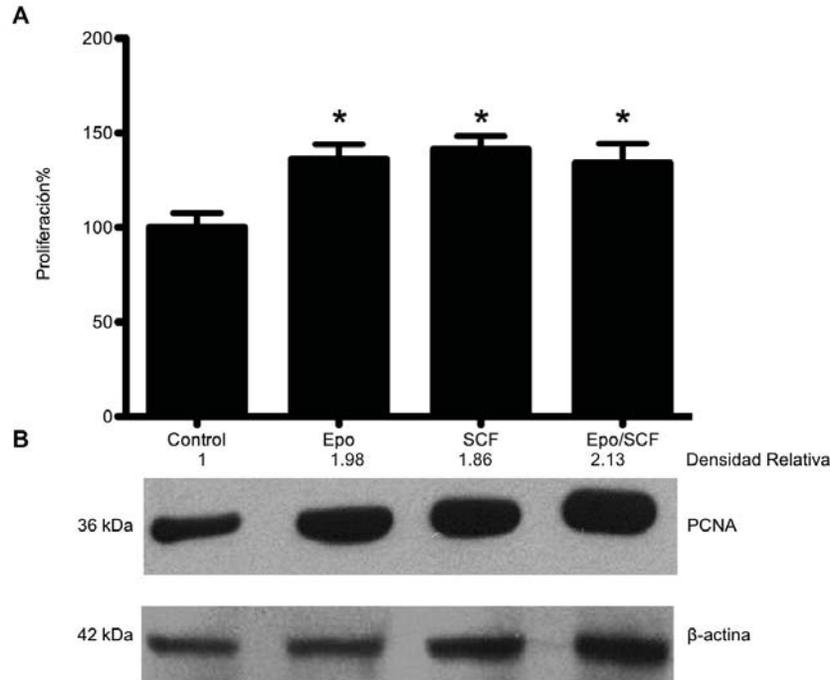


Figura. 7. Efecto conjunto de Epo y SCF sobre la proliferación celular. A. La proliferación fue determinada utilizando el ensayo MTT a las 72 horas. Las células fueron estimuladas con 1U/ml de Epo o 50ng/ml de SCF o ambas. Los datos son expresados como el porcentaje de células que proliferaron en comparación al control y representan el promedio de tres ensayos independientes de tres repeticiones cada uno. El análisis estadístico incluyó un ANOVA de un sentido con la prueba post-hoc de Tukey. Las barras indican la desviación estándar. * $P < 0.05$ comparado con el control. **B.** Western blot y análisis densitométrico para determinar la expresión del marcador de proliferación PCNA.

F. La proliferación celular inducida por Epo y SCF se reduce con el silenciamiento de los receptores EpoR y c-Kit

Para corroborar si efectivamente Epo y SCF son capaces de inducir una mayor proliferación en las células MBCD5, lo que hicimos fue reducir la expresión de estos receptores utilizando RNA interferentes específicos para cada uno de los receptores. Una vez silenciados los receptores, procedimos a evaluar la proliferación celular en respuesta a los estímulos con Epo y SCF después de 48 horas.

Como se puede observar cuando la expresión de EpoR fue interrumpida (**Fig. 8A**), en respuesta a Epo la proliferación de las células MBCD5 disminuyó 1.9 veces en comparación a las células en dónde no se silenció al receptor y que recibieron Epo (**Fig. 9A**). Así mismo, el silenciamiento de c-Kit (**Fig. 8B**), resultó en una disminución en la proliferación de 1.3 veces cuando las células recibieron SCF (**Fig. 9B**). En cuanto al doble silenciamiento (**Fig. 8C**), observamos que la proliferación celular disminuyó también considerablemente (2.3 veces) a pesar de que las células fueron estimuladas tanto con Epo como con SCF (**Fig. 9C**). Estos resultados nos permitieron establecer que, en efecto, tanto Epo como SCF son capaces de inducir una mayor proliferación en las células MBCD5.

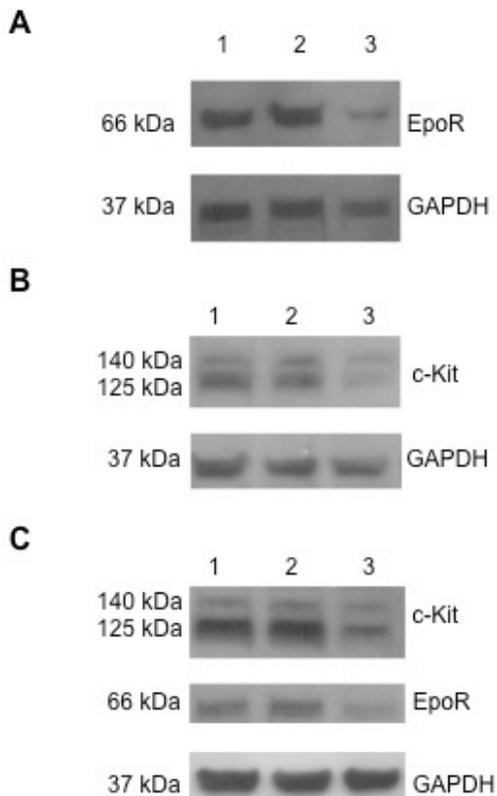


Figura 8. Silenciamiento de los receptores EpoR y C-kit mediante RNAs interferentes. La línea celular MBCD5(-) fue transfectada con siRNAs inespecíficos y siRNAs específicos para EpoR (A), c-Kit (B) y ambos (C). Para comprobar el silenciamiento de los genes, la expresión de los receptores se analizó mediante Western blot. A), B), C) 1. Células sin siRNA 2. Células con siRNA inespecífico. 3. Células con siRNA específico. Posteriormente las células fueron sometidas a ensayos de proliferación y de migración.

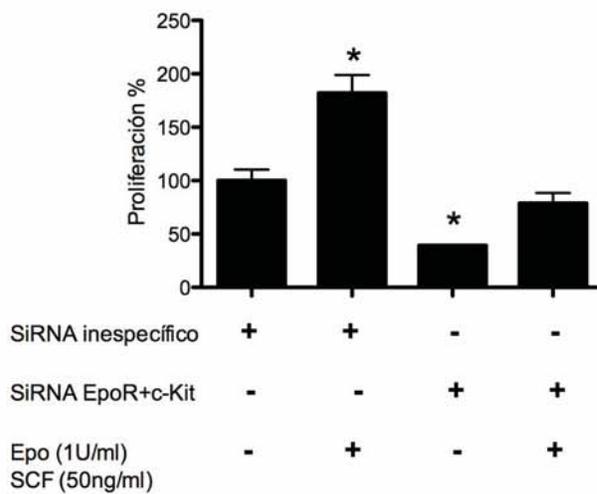
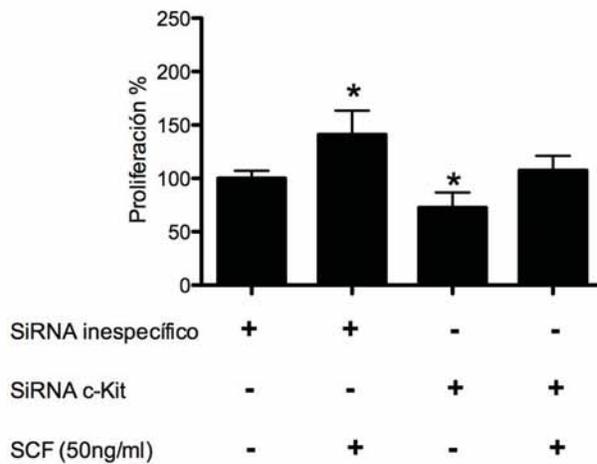
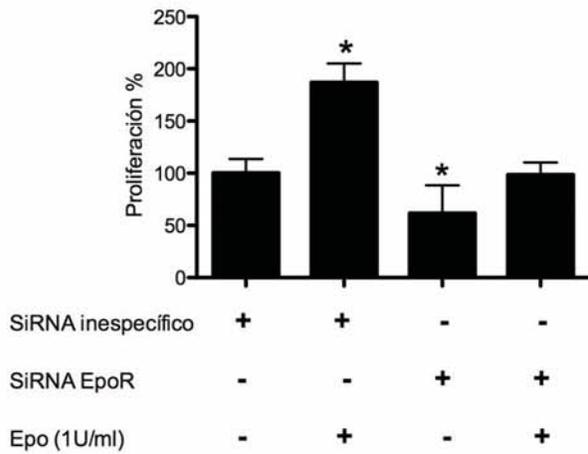


Figura. 9. Efecto del silenciamiento de los receptores EpoR y c-Kit en la proliferación celular. Después de que la línea celular MBCD5(-) se transfeció con los siRNAs inespecíficos o específicos se evaluó, mediante el ensayo de MTT a las 48 horas, la proliferación de las células en presencia y ausencia de los factores Epo (1U/ml) (A), SCF (50 ng/ml) (B) y ambos: Epo (1U/ml)+ SCF (50 ng/ml) (C).

G. Efecto de SCF y Epo en la migración celular

SCF y Epo habían sido identificados por separado como promotores de la migración celular tanto en contextos fisiológicos como patológicos. En condiciones normales se sabe que ambas citocinas orquestan en conjunto la migración de diferentes células hematopoyéticas. En condiciones patológicas, como el cáncer, se sabe también que tanto Epo como SCF pueden promover la migración, sin embargo no existían estudios en cáncer en donde las células hubieran recibido un tratamiento doble.

Es por ello que la siguiente etapa de nuestro proyecto consistió en examinar si la administración de Epo, SCF y Epo/SCF podía incrementar la capacidad migratoria de las células. Para tal efecto, examinamos la capacidad de las células de migrar en tres condiciones diferentes: con Epo (1U/ml), con SCF (50 ng/ml), en presencia de ambas (1U/ml y 50 ng/ml de Epo y SCF respectivamente). Como control positivo se utilizó medio RPMI suplementado con 5% de SFB y como control negativo se empleó medio sin suero.

Lo que observamos (**Fig. 10**) fue que la administración de Epo aumentó en 2.1 veces el número de células MBCD5 que migraron en comparación con el medio solo. Igualmente, detectamos que la administración de SCF provocó que el número de células migrantes con respecto al control negativo se incrementara 2.2 veces. Por su parte el doble estímulo (SCF+Epo) también indujo una migración celular 2.2 veces mayor al control; este incremento fue muy similar al inducido por separado por Epo y SCF. Estos resultados concordaron con los resultados de la proliferación: al parecer el tratamiento combinado no tiene efectos aditivos en la migración.

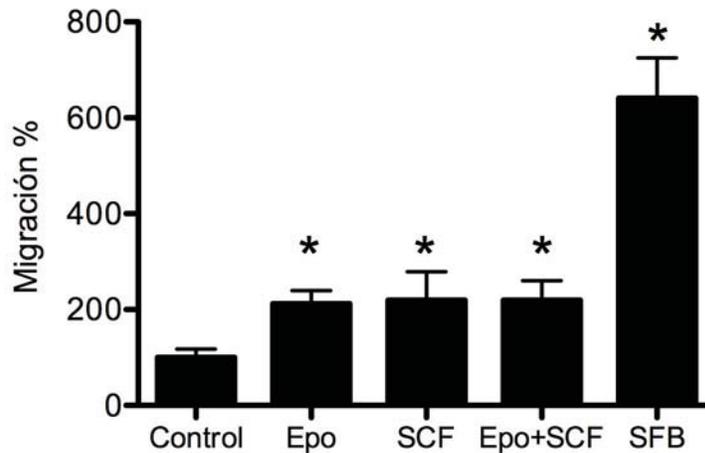


Figura. 10. Efecto de Epo y SCF sobre la migración celular. La capacidad migratoria de las células MBCD5 fue estudiada con el kit QCM™ 24 Well Colorimetric Cell Migration Assay después de 24 horas de haber sido expuestas a SFB, Epo y/o SCF. Se utilizaron 1U/ml de Epo, 50 ng/ml de SCF. Para el control negativo las células fueron incubadas únicamente con medio RPMI sin suero. Como control positivo se usó medio RPMI suplementado con 5% de SFB. Las columnas indican el porcentaje de migración de las células con respecto al control negativo (DO células tratadas/DO células control x 100). El ensayo fue repetido tres veces, cada ensayo se realizó por duplicado. Los análisis estadísticos empleados fueron la ANOVA de una vía y las pruebas de Dunnett y Tukey.*p<0.05 vs control.

H. La migración celular disminuye con el silenciamiento de los receptores EpoR y c-Kit.

Con el fin de confirmar los resultados anteriores, procedimos con el silenciamiento de la expresión de los receptores para luego evaluar el comportamiento migratorio de las células. Los resultados que obtuvimos mostraron que al interrumpir la expresión de EpoR las células MBCD5 no migran aún en presencia de Epo (**Fig. 11A**).

De manera similar, notamos que al inhibir la expresión de c-Kit no hay migración efectiva a pesar de la adición de SCF al medio (**Fig. 11B**). Finalmente, el silenciamiento concomitante de EpoR y c-Kit derivó, como en los casos anteriores, en una migración

nula de las células las cuales habían sido expuestas a Epo y SCF durante el experimento (**Fig. 11C**). Estos datos validaron nuestro resultado previo y así pudimos definir que tanto Epo como SCF , por separado, pueden promover la migración celular pero la combinación de ambas no supone un efecto aditivo en la migración. En conjunto, el efecto de Epo y SCF sobre la migración celular fue consistente con lo que observamos en los ensayos de proliferación.

I. Moléculas señalizadoras activadas por Epo y SCF

Como mencionamos en la introducción de este trabajo, al unirse a sus receptores Epo y SCF pueden desencadenar diferentes respuestas celulares —como la migración y la proliferación— gracias a las cascadas de señalización que activan por lo que el siguiente paso de nuestro proyecto consistió en determinar qué moléculas señalizadoras eran sujetas a activación cuando las células fueron estimuladas con Epo y con SCF.

En primer lugar, los resultados mostraron que en las células estimuladas con 1U/ml de Epo, Stat5 se fosforila desde el minuto 1 y la fosforilación va disminuyendo con el tiempo de tal modo que a los 60 minutos Stat5 muestra una activación mínima. En cuanto a Erk1/2, la fosforilación comienza a partir del primer minuto después del estímulo y al cabo de una hora la fosforilación alcanza un máximo (**Fig. 12A**).

En segundo lugar, observamos que al estimular con SCF no hay fosforilación de Stat5 (**Fig. 12A**), sin embargo la fosforilación de Erk1/2 es paulatina y tiene su máximo a los 10 minutos después de recibir el estímulo con SCF (**Fig. 12B**).

Finalmente cuando las células recibieron el doble estímulo observamos que Stat5 se fosforila gradualmente alcanzando un máximo de activación a los 60 minutos. Erk1/2, por su parte, muestra un comportamiento similar, pues su activación comienza a partir del minuto 1 y alcanzan una fosforilación máxima a la hora (**Fig. 12C**).

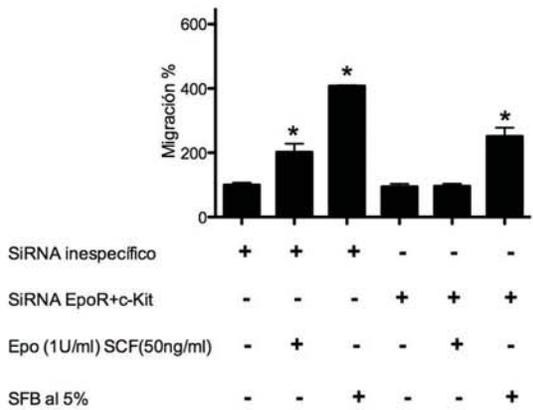
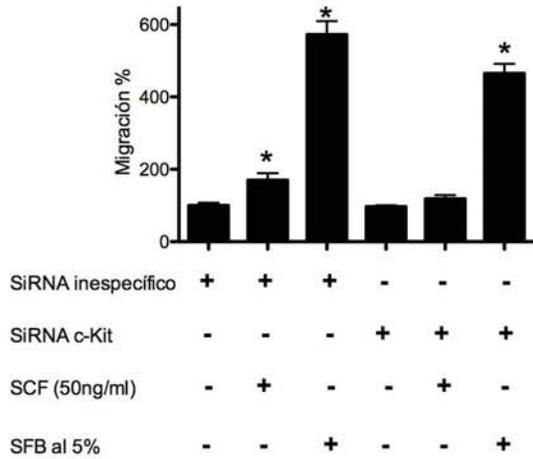
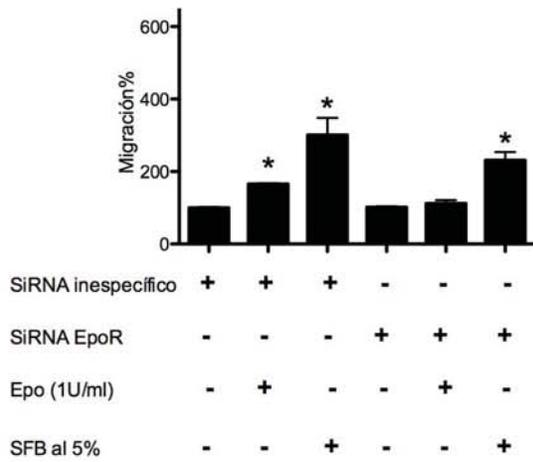


Figura. 11. Efecto del silenciamiento de los receptores EpoR y c-Kit en la migración celular. La capacidad migratoria de las células MBCD5 en presencia de Epo y/o SCF fue estudiada después de que éstas fueran silenciadas con los siRNAs inespecíficos o específicos para EpoR (A), c-Kit (B) y ambos (C).

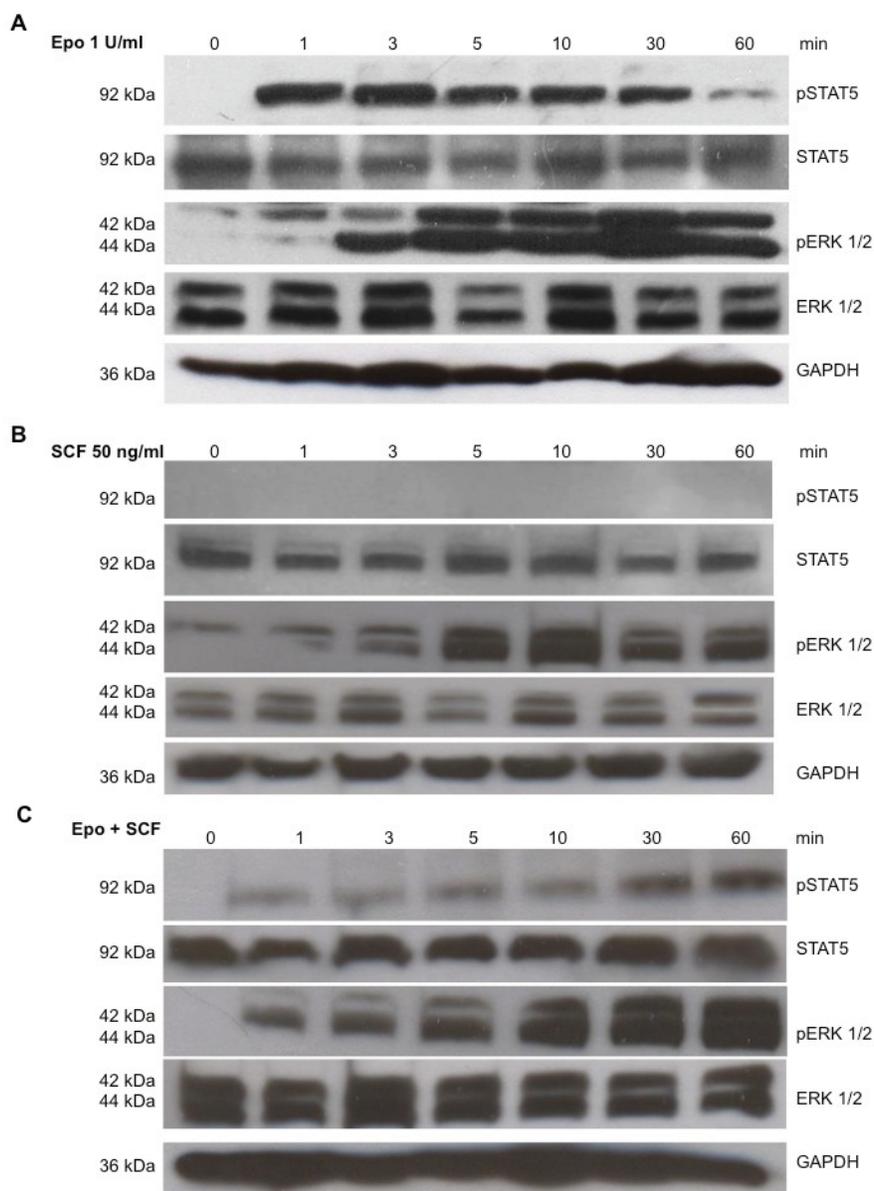


Figura. 12. Vías de señalización activadas por Epo y SCF. Las vías de señalización inducidas fueron analizadas a diferentes tiempos (0, 1, 3, 5, 10, 30 y 60 min.) en las células MBCD5 estimuladas con 1U/ml de Epo (A), con 50 ng/ml de SCF (B) y con ambos factores (C). Los lisados proteicos se analizaron mediante Western blot. Las proteínas GAPDH, STAT5, ERK1/2 así como las versiones fosforiladas de estas dos últimas fueron detectadas con anticuerpos específicos. En esta figura se muestra un blot representativo de los tres que se realizaron para cada condición

VII. Discusión

La coexpresión de EpoR y c-Kit así como la sinergia entre SCF y Epo han sido ampliamente descritas en el contexto de la eritropoyesis, en donde se sabe que ambas citocinas actúan de manera concertada para lograr la expansión de los progenitores eritroides, en particular la de los proeritroblastos³⁴.

Sin embargo, hasta ahora no se ha evaluado si esta cooperación se da también en otros escenarios ya sea en condiciones normales o en condiciones patológicas. Ahora bien, se tiene noción de que tanto c-Kit como EpoR se expresan en una serie de tejidos cancerosos y en particular existen estudios independientes que han determinado que c-kit y EpoR se expresan en algunos tipos de cáncer de mama^{57,70-73,77,79,84-90}.

Estos datos nos llevaron a preguntarnos si la expresión de estos dos receptores podía tener alguna participación sinérgica en el cáncer de mama por lo que en nuestro estudio se analizó en primera instancia la expresión de los receptores EpoR y c-Kit en células de cáncer de mama y en segundo lugar su relación con el potencial proliferativo y migratorio de estas células. Se estudió además el estatus de dos moléculas señalizadoras comunes a ambas vías para determinar el efecto en las vías de señalización comunes activadas por Epo/EpoR y SCF/c-Kit.

Nuestro resultados indicaron que en líneas celulares establecidas a partir de tumores mamarios de mujeres mexicanas hay expresión de EpoR y c-Kit. Así mismo la estimulación de estos receptores con sus respectivos ligandos puede mediar la proliferación y migración celular aunque, interesantemente, la estimulación simultánea con Epo y SCF no tiene efectos aditivos en estos procesos celulares. A nivel molecular, observamos que el coestímulo parece retardar la fosforilación de Stat5, evento que no se había reportado antes y que podría explicar la ausencia de sinergia en la proliferación y la migración. A continuación comentaremos en detalle los principales resultados de nuestra investigación.

A. La expresión de c-Kit y EpoR en cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que evoluciona mediante un proceso de múltiples etapas durante las cuales se acumulan cambios genéticos como mutaciones, rearrreglos y amplificaciones cromosómicos, pérdida de heterocigocidad y alteraciones epigenéticas⁹¹. Algunos de estas anomalías originan un patrón de expresión de proteínas que otorga ciertas características a las células cancerosas. En el cáncer de mama se ha estudiado el perfil de expresión genética y esto ha permitido establecer diferentes tipos de cáncer de mama. En particular se ha estudiado el patrón de expresión de ciertos receptores membranales como Her2/neu o los receptores para estrógenos (ER) y progesterona (PR). Estos estudios han servido en la clínica para determinar el tratamiento adecuado para los pacientes¹⁷.

Debido a la importancia clínica de los receptores membranales la expresión de los receptores c-Kit y EpoR también se ha estudiado en el cáncer de mama con el propósito de determinar si éstos pudieran servir como marcadores tumorales tempranos o como marcadores de progresión. Acerca de la expresión de c-Kit y la de EpoR en cáncer de mama, los diferentes estudios publicados han llegado a conclusiones opuestas como habíamos señalado en la introducción de este trabajo (*ver* Epo en cáncer de mama, SCF/c-Kit en cáncer de mama); para ambos receptores hay quienes afirman que los receptores se expresan y son funcionales^{88,92} mientras que otros grupos de trabajo señalan que estos receptores no se expresan^{93,94} o se expresan pobremente⁸⁶ sin ninguna relevancia funcional ni clínica.⁵⁶

Estas posiciones encontradas pueden deberse a la heterogeneidad clínica y molecular del cáncer de mama por lo cual realizamos una revisión cuidadosa de dichas publicaciones; en la mayoría de estos trabajos la expresión de estos receptores se estudió únicamente en líneas celulares comerciales. Esto llamó particularmente nuestra atención pues la utilización de estas líneas podría ser un factor determinante para la obtención de resultados dispares. Una cantidad creciente de artículos ha demostrado que el número de resiembras afecta las características de una línea celular a través el tiempo ⁹⁵⁻⁹⁷. Las líneas celulares que han sido divididas muchas veces sufren alteraciones en su morfología, tasa de crecimiento, expresión de proteínas y en su

respuesta a ciertos estímulos⁹⁵⁻⁹⁷ en comparación con las líneas celulares con un número bajo de resiembras. Por ello, nosotros decidimos estudiar la expresión de c-Kit y EpoR en una línea celular derivada de un tumor mamario de una mujer mexicana, ya que esta línea celular al ser recientemente establecida presentaba escasas resiembras. Gracias a los estudios de caracterización que efectuamos pudimos determinar que un porcentaje importante de las células expresa a los receptores c-kit y EpoR en su membrana. En efecto, se ha reportado que diversos tipos de cánceres expresan a los receptores EpoR y c-Kit pero nunca antes se había evaluado su expresión en un mismo tipo de cáncer humano. Si bien existen datos de la coexpresión de EpoR y c-Kit en progenitores eritroides⁴⁸ humanos y en eritroleucemia murina⁹⁸ hasta ahora no se tienen datos de su coexpresión en cáncer, particularmente en cáncer de mama. En nuestro estudio identificamos que 6% de las células MBCD5 expresan a c-Kit y 13% a EpoR. Este porcentaje resulta significativo comparado, por ejemplo, con el porcentaje de células madre hematopoyéticas pluripotentes de ratones que expresan a c-Kit que es de alrededor 0.006%-0.008%⁹⁹.

A pesar de la controversia que existe en cuanto a la utilización de anticuerpos inespecíficos^{60,93} para analizar la expresión de EpoR, nosotros utilizamos un anticuerpo (*Anti-Human Erythropoietin Receptor E4644 producido en cabra de Sigma-Aldrich*) con el cual habíamos demostrado antes la expresión de EpoR en cáncer cérvicouterino⁸³. Además, probamos la expresión membranal de EpoR mediante una citometría de flujo en la que las células no fueron permeabilizadas. Esto lo hicimos para asegurarnos de que la expresión del receptor no fuera intracelular ya que como lo han señalado algunos grupos de trabajo, la expresión de EpoR que se ha reportado en el cáncer se da sobre todo al interior de la célula y por ende los receptores no pueden activar vías de señalización que tengan relevancia para este proceso patológico¹⁰⁰.

Los porcentajes de expresión de c-Kit (6%) y EpoR (13%) en nuestra línea celular, aunque modestos, podrían ser de relevancia clínica sobre todo para la población mexicana. Recordemos que el receptor Her2/neu (c-erbB-2) se sobreexpresa únicamente en 30% de todos los casos de cáncer de mama, y a pesar de esto actualmente se utiliza en la clínica como biomarcador además de ser un factor importante para determinar si la supervivencia de los pacientes será reducida¹⁰¹.

Evidentemente en nuestro caso la expresión de ambos receptores debe analizarse con mayor detalle en tejidos cancerosos y en tejidos sanos para poder determinar si la expresión de c-Kit y EpoR puede ser de utilidad para el diagnóstico, el pronóstico y la terapia a implementarse.

Actualmente, nuestro grupo de trabajo se encuentra analizando cortes histológicos provenientes de biopsias de mujeres con cáncer de mama, por lo que esperamos determinar prontamente qué porcentaje de los tejidos presentan la expresión de estos receptores. Sin embargo, quizás una de las limitantes de estos estudios sería la falta de material biológico sano con el cual comparar el tejido canceroso. El tejido sano es, no obstante, difícil de obtener debido a la complejidad de las biopsias mamarias y a su escasez. Particularmente en el caso de c-Kit, donde existen reportes de que su expresión va disminuyendo paulatinamente conforme el cáncer avanza, sería interesante poder hacer esta comparación, pues quizás observamos sólo un 6% de células que expresan c-Kit debido a este fenómeno.

B. Proliferación

Ya que el objetivo principal de esta investigación era determinar si la expresión de c-Kit y EpoR en células de cáncer de mama podía promover la malignidad de éstas, después de caracterizar la expresión de los receptores nos avocamos en demostrar que el estímulo de estos receptores con sus ligandos correspondientes (SCF y Epo) influencia significativamente la proliferación y la migración de las células MBCD5 *in vitro*. En cuanto a los resultados que obtuvimos al estimular a las células con Epo, observamos que Epo puede inducir la proliferación celular con concentraciones de 0.5 U/ml y hasta 20 U/ml. La literatura señala que la concentración plasmática basal de Epo va de 6 hasta 32 U/l¹⁰², por lo cual las concentraciones que nosotros empleamos serían, en principio, suprafisiológicas, sin embargo en algunos estudios en los que se administró Epo a pacientes con cáncer de mama, se han reportado dosis de hasta 40000 U administradas cada semana^{103,104} por lo que comparadas con éstas las concentraciones con la cual trabajamos están dentro del rango de lo que se utiliza en la

clínica y por lo tanto los fenómenos que observamos *in vitro* emulan las condiciones a las cuales estarían sometidas las células tumorales en la vida real. El efecto proliferativo que Epo ejerce sobre las células fue corroborado con el silenciamiento del receptor y ensayos de proliferación subsecuentes en donde se observó que las células con el receptor silenciado no respondían al estímulo de Epo del mismo modo que las células que fueron transfectadas con un interferente inespecífico. Estas últimas proliferaron de manera similar a las células que no fueron transfectadas con ningún interferente.

Este resultado concuerda con otros trabajos que han encontrado que Epo puede inducir la proliferación de células tumorales mamarias *in vitro*^{55,84} pero también contrasta con otros trabajos en donde se ha encontrado que Epo no es capaz de inducir proliferación^{56,94}. La oposición de estos resultados ha generado controversia en el seno de la comunidad científica lo que ha llevado no sólo a revisar las metodologías empleadas si no también a revisar minuciosamente los ensayos clínicos y los meta análisis. La diferencia en los resultados puede deberse a la utilización de líneas celulares comerciales las cuales, como ya hemos comentado, presentan variabilidad genética y epigenética¹⁰⁵ debido a su uso continuo en cultivo celular. Estas variaciones pueden afectar la respuesta de las células a ciertos estímulos⁹⁶ e incluso a que vías de señalización se activen de manera diferente⁹⁷.

Por su parte SCF también es capaz de inducir un incremento en la viabilidad celular en la línea de nuestro interés (MBCD5) después de 48 y 72 horas en concentraciones que van desde 10 ng/ml hasta 100 ng/ml. Tal como se ha reportado en otros tipos de cáncer como el de páncreas¹⁰⁶, el de colon¹⁰⁷, SCF puede inducir la proliferación de células malignas que expresan al receptor c-Kit en concentraciones que van de 1ng/ml a 100ng/ml. El fenómeno observado es claramente mediado por c-Kit puesto que el silenciamiento del receptor resultó en una atenuación importante de la proliferación en presencia de SCF comparado con los controles.

Sin embargo, a pesar de que la expresión de c-Kit se ha identificado en diferentes tipos de cáncer, los resultados experimentales en cuanto a la expresión y la función de c-Kit en el cáncer de mama son aún un tema controversial. Algunos estudios han propuesto que la pérdida de la expresión de c-Kit estaría asociada con la progresión tumoral^{73,90},

mientras que otros trabajos han probado no sólo la expresión del receptor sino también su implicación en el cáncer de mama incrementando la proliferación⁷⁷ o correlacionándolo con la agresividad del cáncer⁷⁹.

Nuestros resultados indican que si bien c-Kit puede mediar la proliferación de células cancerígenas debemos tomar en cuenta el porcentaje de células que expresan al receptor, que es del 6%, ya que éste podría ser un indicativo de la pérdida de la expresión puesto que únicamente 10% de los carcinomas invasivos e in situ son positivos para c-Kit de acuerdo a varias investigaciones^{72,73,90}. Claramente nuestro trabajo tiene que ser reforzado con estudios hechos en tejido sano y en líneas celulares derivadas de tumores benignos para hacer las comparaciones pertinentes.

Ahora bien estos resultados son consistentes con otros estudios en donde se ha probado que tanto Epo como SCF, ambas por separado, pueden inducir la proliferación de células tumorales de distintos orígenes. Por otro lado la sinergia entre SCF y Epo se tiene bien descrita en la eritropoyesis^{34,108} y dado que en el cáncer de mama se ha encontrado la expresión tanto de c-Kit como EpoR, nosotros nos propusimos investigar si esta sinergia también podía observarse en el contexto del cáncer de mama y si esto podía traducirse en una mayor proliferación. Sorpresivamente cuando coestimulamos a las células con SCF y Epo, observamos una proliferación en niveles similares a los que indujeron SCF y Epo por separado, esto fue corroborado con el análisis densitométrico de la expresión del marcador de proliferación PCNA, por lo que no puede hablarse de un efecto proliferativo sinérgico como se ha descrito en los precursores eritroides¹⁰⁸ o en eritroleucemias¹⁰⁹. Este resultado fue interesante ya que nosotros esperábamos que el efecto sobre la proliferación fuera aditivo como se ha reportado en células troncales hematopoyéticas¹¹⁰ y en progenitores eritroides^{34,111,112}. Sin embargo el hecho de no haber observado sinergia mitogénica nos lleva a pensar que existe un mecanismo de regulación, que aun se desconoce, entre las vías de señalización SCF/c-Kit y Epo/EpoR el cual se refleja en un control de la proliferación.

C. Migración

Los resultados de la proliferación fueron consistentes con nuestras observaciones en los ensayos de migración. En presencia de Epo, las células migraron 1.12 veces más que las células control; además la migración de las células MBCD5 inducida por Epo fue inhibida con el silenciamiento del receptor, lo cual evidenció que Epo actúa como un quimioatrayente ya que induce la quimiotaxis de células tumorales y que la activación de EpoR media la movilidad de las células. La amplificación de la migración celular inducida por Epo ya había sido descrita antes en el linaje eritroide que migra de la médula ósea hacia el bazo en ratones¹¹³ y en células endoteliales¹¹⁴. Pero no sólo en escenarios fisiológicos Epo actúa como quimioatrayente pues también hay estudios en cáncer de cuello y cabeza¹¹⁵ así como en cáncer de mama⁵⁵ en donde se ha demostrado que Epo estimula la migración celular.

Por su parte SCF también se ha identificado como un potente quimioatrayente de mastocitos¹¹⁶, melanocitos, células del endotelio del cordón umbilical¹¹⁷, e incluso en células troncales neuronales¹¹⁸. En cáncer, también se ha demostrado que SCF estimula el potencial invasivo de las células malignas de páncreas⁴² y de colon¹⁰⁷ pero hasta nuestra investigación no se había demostrado que SCF pudiera promover la migración celular en cáncer de mama. De manera similar a Epo, SCF es capaz de incrementar 1.2 veces la migración de las células MBCD5 por lo que SCF actúa también como quimioatrayente de células tumorales de origen mamario.

A pesar de la quimioatracción producida por Epo y SCF por separado, en presencia de ambas citocinas constatamos que la migración de las células no aumentó en comparación a la migración de las células estimuladas únicamente con Epo o con SCF. Aunado a esto, los experimentos de inhibición de los receptores validaron este fenómeno. Este hecho coincidió con lo observado en los ensayos de proliferación. En conjunto, estos datos prueban que la coestimulación de las células con Epo y SCF no potencializa ni la proliferación ni la migración de las células MBCD5.

Todo lo anterior nos llevó a analizar las vías de señalización activadas por Epo y SCF para tratar de entender los mecanismos que rigen el comportamiento de las células.

D. Señalización

Tanto la proliferación como la migración son eventos que están controlados finamente a nivel molecular; su regulación y ejecución dependen de la activación e interacción de proteínas señalizadoras por lo que identificar qué proteínas se activan es de gran utilidad para entender ambos procesos. En nuestro estudio evaluamos las vías de Stat5 y la de las cinasas MAPK (ERK1/2), que son comunes a Epo y SCF, en las tres condiciones de nuestros experimentos (con Epo, con SCF y con ambos factores). Nuestros resultados al evaluar la vía de señalización de Stat5 indicaron que esta proteína se fosforila exclusivamente en presencia de Epo y no en presencia de SCF. Estos resultados son congruentes con lo publicado en progenitores eritroides en donde se ha observado en general que sólo Epo induce la activación de Stat5⁴⁹. Esta activación de Stat5 inducida por Epo también se ha descrito en cáncer cérvico uterino⁸³, en cáncer de mama⁸⁹ y en cáncer de próstata¹¹⁹ por lo que podemos observar que este evento de señalización se conserva en el contexto del cáncer. Por otro lado, al estimular a las células tanto con Epo como con SCF, observamos que Stat5 tardó más tiempo para fosforilarse. Esto indica que SCF podría estar retardando los eventos de señalización desencadenados por Epo. Este retardo, de hecho, no sería extraño ya que en progenitores eritroides humanos ya se había descrito que SCF retarda ciertos eventos de diferenciación inducidos por Epo^{110,120}. No obstante para establecer que efectivamente SCF retarda la fosforilación de Stat5 sería necesario realizar experimentos en los cuales se inhibieran los dos elementos iniciales de la cascada de señalización, SCF y c-Kit. Existen anticuerpos neutralizantes que pueden inhibir la unión de SCF a su receptor, y por otro lado se podría bloquear la expresión del receptor c-Kit utilizando la tecnología de secuencias específicas de RNA pequeño interferente.

Por otro lado observamos que la vía de las cinasas Erk1/2 también se activó de manera progresiva en presencia de ambos factores tanto solos y como combinados. Esta vía controla diferentes procesos celulares que incluyen la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la progresión del ciclo celular. En el cáncer de mama la activación de la vía Ras/Erk1 ha sido asociada a los procesos de proliferación y migración⁸⁴. Además

previamente se había demostrado en un modelo de progenitores eritroides que SCF y Epo eran capaces de activar sinérgicamente la vía de las cinasas MAPK y que este evento era imprescindible para asegurar el progreso de la eritropoyesis⁴⁴. Sin embargo en el presente estudio no se observó un aumento en la activación de Erk1/2 por lo que es probable que SCF y Epo convergen en esta molécula y por ello no pueda haber una activación sinérgica de estas cinasas.

A partir de este trabajo podemos concluir que Epo induce la proliferación y migración de células de cáncer de mama, activando de manera gradual la vía de señalización Jak2/Stat5. De igual manera SCF promueve tanto la proliferación como la migración de este tipo de células tumorales. Sin embargo, el efecto observado no es sinérgico. Por lo que se propone que existen mecanismos subyacentes que impiden la sumatoria de los efectos.

VIII. Conclusiones

La realización de este trabajo nos permitió demostrar que:

1. Las células cancerígenas de origen mamario (MBCD5) expresan los receptores EpoR y c-Kit. Aunque la proporción de células que expresan a EpoR y c-Kit es modesta, la expresión de ambos receptores tiene relevancia en el desarrollo del cáncer mamario.
2. Al ser estimulados con sus respectivos ligandos, los receptores EpoR y c-Kit pueden promover la proliferación y la migración de las células MBCD5. Sin embargo, la coestimulación con ambos factores no potencia ni la proliferación ni la migración celular. Esto sugiere la existencia de un mecanismo de regulación entre Epo y SCF que sería interesante de caracterizar en un futuro.
3. En las células MBCD5 el estímulo con Epo induce la activación de las vías de señalización de Stat5 y de las MAPKs (ERK1/2).
4. Al estimular estas mismas células con SCF, únicamente se observa la activación de la vía de MAPKs. Esto sugiere que los eventos proliferativos y migratorios observados en este trabajo estarían regulados por la activación de estas vías de señalización.
5. El coestímulo de las células MBCD5 con SCF y Epo activa gradualmente la vía de las MAPKs y retrasa la fosforilación de Stat5. Esta observación podría ser parte de un mecanismo de convergencia entre EpoR y c-Kit que explica que sus ligandos no potencien los efectos proliferativos y migratorios.

IX. Referencias

- 1 Donegan, W. L. in *Breast Cancer* (ed D.P. David) (BC Decker Inc, 2006).
- 2 Olson, J. S. *Bathsheba's Breast: Women, Cancer, and History* (2005).
- 3 WHO. in *Global status report on noncommunicable diseases 2010. Description of the global burden of NCDs, their risk factors and determinants* (ed World Health Organization) (2011).
- 4 GLOBOCAN. (2008).
- 5 INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer. . (2012).
- 6 INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer. (2010).
- 7 INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer. . (2011).
- 8 Chavarri-Guerra, Y. *et al.* Breast cancer in Mexico: a growing challenge to health and the health system. *Lancet Oncol* **13**, e335-343, doi:10.1016/S1470-2045(12)70246-2 (2012).
- 9 Knaul, F. M. Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública Mex.* **51**, S335-S344 (2009).
- 10 Tavassoéli, F. A. (World Health Organization; 1 edition (September 2003), 2003).
- 11 Brendan, V. Detección del cáncer de Mama: Estado de la mamografía en México. *Cancerología* **1**, 147-162 (2006).
- 12 Dillon DA, G. A., Schnitt SJ. in *Diseases of the Breast*, (ed Lippman ME Harris JR, Morrow M, Osborne CK.) (Lippincott Williams & Wilkins, 2010.).
- 13 (ed Secretaría de Salud) (Diario Oficial de la Federación, 2002).
- 14 Chaney, A. W. *et al.* Primary treatment of cystosarcoma phyllodes of the breast. *Cancer* **89**, 1502-1511 (2000).
- 15 Edge, S. B. & Compton, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology* **17**, 1471-1474, doi:10.1245/s10434-010-0985-4 (2010).
- 16 Yeatman, T. J. *et al.* Tumor biology of infiltrating lobular carcinoma. Implications for management. *Annals of surgery* **222**, 549-559; discussion 559-561 (1995).
- 17 van 't Veer, L. J. *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**, 530-536, doi:10.1038/415530a (2002).
- 18 Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752, doi:10.1038/35021093 (2000).
- 19 Baumgarten, S. C. & Frasor, J. Minireview: Inflammation: an instigator of more aggressive estrogen receptor (ER) positive breast cancers. *Molecular endocrinology* **26**, 360-371, doi:10.1210/me.2011-1302 (2012).
- 20 Burstein, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *The New England journal of medicine* **353**, 1652-1654, doi:10.1056/NEJMp058197 (2005).
- 21 Jorge R Uribe, C. A. H., Francisco Menolascino, Joel E Rodríguez, Linda M Istúriz, María E Márquez, Ramón E Rodríguez, Jorge L Uribe. Clasificación molecular del cáncer de mama y su correlación clínica. *Revista Venezolana de Oncología* **v.22 n.2** 109-116 (2010).

- 22 Ornelas-Aguirre, J. M. y. P. r.-M. L. M. a. d. l. A. n. Clasificación molecular del cáncer de mama: relación con las características clínico-patológicas y el grado histológico en mujeres del noroeste de México. *Cirugía y Cirujanos* **81**, 496-507 (2013).
- 23 Banin Hirata, B. K. *et al.* Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. *Disease markers* **2014**, 513158, doi:10.1155/2014/513158 (2014).
- 24 Secretaría de Salud. (Mexico, 2009).
- 25 American Cancer Society. (2012).
- 26 Spivak, J. L. Anemia in the elderly: time for new blood in old vessels? *Archives of internal medicine* **165**, 2187-2189, doi:10.1001/archinte.165.19.2187 (2005).
- 27 Knight, K., Wade, S. & Balducci, L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *The American journal of medicine* **116 Suppl 7A**, 11S-26S, doi:10.1016/j.amjmed.2003.12.008 (2004).
- 28 Ludwig, H. *et al.* The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *European journal of cancer* **40**, 2293-2306, doi:10.1016/j.ejca.2004.06.019 (2004).
- 29 Osterborg, A. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of recombinant human erythropoietin, epoetin Beta, in hematologic malignancies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 2486-2494 (2002).
- 30 Hardee, M. E., Arcasoy, M. O., Blackwell, K. L., Kirkpatrick, J. P. & Dewhirst, M. W. Erythropoietin biology in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 332-339, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1771 (2006).
- 31 Bradshaw. (ed Academic Press) (2003).
- 32 Nowrousian. Recombinant Human Erythropoietin (rhEpo) in Clinical Oncology. . (2008).
- 33 Jelkmann, W., Bohlius, J., Hallek, M. & Sytkowski, A. J. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Critical reviews in oncology/hematology* **67**, 39-61, doi:10.1016/j.critrevonc.2008.03.006 (2008).
- 34 Munugalavadla, V. & Kapur, R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Critical reviews in oncology/hematology* **54**, 63-75, doi:10.1016/j.critrevonc.2004.11.005 (2005).
- 35 Bradshaw. *Handbook of cell signaling.*, (2003).
- 36 Edling, C. E. & Hallberg, B. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 1995-1998, doi:10.1016/j.biocel.2006.12.005 (2007).
- 37 Linnekin, D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **31**, 1053-1074 (1999).
- 38 Sperling, C., Schwartz, S., Buchner, T., Thiel, E. & Ludwig, W. D. Expression of the stem cell factor receptor C-KIT (CD117) in acute leukemias. *Haematologica* **82**, 617-621 (1997).
- 39 Hirota, S. *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **279**, 577-580 (1998).
- 40 Mayani, H. Hematopoiesis. *Cancerología* **2**, 95-107 (2007).
- 41 Uoshima, N. *et al.* Changes in c-Kit expression and effects of SCF during differentiation of human erythroid progenitor cells. *British journal of haematology* **91**, 30-36 (1995).
- 42 Kosmider, O., Buet, D., Gallais, I., Denis, N. & Moreau-Gachelin, F. Erythropoietin down-regulates stem cell factor receptor (Kit) expression in the leukemic proerythroblast: role of Lyn kinase. *PloS one* **4**, e5721, doi:10.1371/journal.pone.0005721 (2009).

- 43 Geslain, R. *et al.* Distinct functions of erythropoietin and stem cell factor are linked to activation of mTOR kinase signaling pathway in human erythroid progenitors. *Cytokine* **61**, 329-335, doi:10.1016/j.cyto.2012.10.017 (2013).
- 44 Sui, X., Krantz, S. B., You, M. & Zhao, Z. Synergistic activation of MAP kinase (ERK1/2) by erythropoietin and stem cell factor is essential for expanded erythropoiesis. *Blood* **92**, 1142-1149 (1998).
- 45 Wu, H., Klingmuller, U., Besmer, P. & Lodish, H. F. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* **377**, 242-246, doi:10.1038/377242a0 (1995).
- 46 Wu, H., Klingmuller, U., Acurio, A., Hsiao, J. G. & Lodish, H. F. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1806-1810, doi:10.1160/TH08-08-0556 (1997).
- 47 Hong, L. *et al.* KIT associated intracellular tyrosines play an essential role in EpoR co-signaling. *Cellular signalling* **20**, 1513-1520, doi:10.1016/j.cellsig.2008.04.005 (2008).
- 48 Kapur, R. & Zhang, L. A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *The Journal of biological chemistry* **276**, 1099-1106, doi:10.1074/jbc.M007442200 (2001).
- 49 Boer, A. K., Drayer, A. L. & Vellenga, E. Stem cell factor enhances erythropoietin-mediated transactivation of signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) via the PKA/CREB pathway. *Experimental hematology* **31**, 512-520 (2003).
- 50 Acs, G. *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer research* **61**, 3561-3565 (2001).
- 51 Farrell, F. & Lee, A. The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *The oncologist* **9 Suppl 5**, 18-30, doi:10.1634/theoncologist.9-90005-18 (2004).
- 52 Leo, C. *et al.* Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in cervical cancer and relationship to survival, hypoxia, and apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**, 6894-6900, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1285 (2006).
- 53 Acs, G. *et al.* Autocrine erythropoietin signaling inhibits hypoxia-induced apoptosis in human breast carcinoma cells. *Cancer letters* **214**, 243-251, doi:10.1016/j.canlet.2004.04.027 (2004).
- 54 Arcasoy, M. O., Jiang, X. & Haroon, Z. A. Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochemical and biophysical research communications* **307**, 999-1007 (2003).
- 55 Arcasoy, M. O. *et al.* Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **82**, 911-918 (2002).
- 56 Laugsch, M., Metzen, E., Svensson, T., Depping, R. & Jelkmann, W. Lack of functional erythropoietin receptors of cancer cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **122**, 1005-1011, doi:10.1002/ijc.23201 (2008).
- 57 Mannello, F. & Tonti, G. A. Erythropoietin and its receptor in breast cancer: putting together the pieces of the puzzle. *The oncologist* **13**, 761-768, doi:10.1634/theoncologist.2008-0110 (2008).
- 58 Juul, S. E. *et al.* Origin and fate of erythropoietin in human milk. *Pediatric research* **48**, 660-667, doi:10.1203/00006450-200011000-00018 (2000).
- 59 Mannello, F., Fabbri, L., Ciandrini, E. & Tonti, G. A. Increased levels of erythropoietin in nipple aspirate fluid and in ductal cells from breast cancer patients. *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* **30**, 51-61 (2008).

- 60 Elliott, S. *et al.* Identification of a sensitive anti-erythropoietin receptor monoclonal antibody allows detection of low levels of EpoR in cells. *Journal of immunological methods* **352**, 126-139, doi:10.1016/j.jim.2009.10.006 (2010).
- 61 Fandrey, J. in *Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology* (ed Nowrousian) (SpringerWienNewYork, 2008).
- 62 Leyland-Jones, B., Investigators, B. & Study, G. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. *Lancet Oncol* **4**, 459-460 (2003).
- 63 Kitamura, Y. & Hirotab, S. Kit as a human oncogenic tyrosine kinase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **61**, 2924-2931, doi:10.1007/s00018-004-4273-y (2004).
- 64 Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D. & Shivakrupa, R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem cells* **23**, 16-43, doi:10.1634/stemcells.2004-0117 (2005).
- 65 Longley, B. J., Jr. *et al.* Activating and dominant inactivating c-KIT catalytic domain mutations in distinct clinical forms of human mastocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1609-1614 (1999).
- 66 Zhu, M. J. *et al.* KIT oncoprotein interactions in gastrointestinal stromal tumors: therapeutic relevance. *Oncogene* **26**, 6386-6395, doi:10.1038/sj.onc.1210464 (2007).
- 67 Ali, S. & Ali, S. Role of c-kit/SCF in cause and treatment of gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Gene* **401**, 38-45, doi:10.1016/j.gene.2007.06.017 (2007).
- 68 Bellone, G. *et al.* Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer research* **61**, 2200-2206 (2001).
- 69 Lennartsson, J. & Ronnstrand, L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological reviews* **92**, 1619-1649, doi:10.1152/physrev.00046.2011 (2012).
- 70 Diallo, R. *et al.* C-KIT expression in ductal carcinoma in situ of the breast: co-expression with HER-2/neu. *Human pathology* **37**, 205-211, doi:10.1016/j.humpath.2005.10.015 (2006).
- 71 Ulivi, P. *et al.* c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue. *Breast cancer research and treatment* **83**, 33-42, doi:10.1023/B:BREA.0000010694.35023.9e (2004).
- 72 Yared, M. A., Middleton, L. P., Meric, F., Cristofanilli, M. & Sahin, A. A. Expression of c-kit proto-oncogene product in breast tissue. *The breast journal* **10**, 323-327, doi:10.1111/j.1075-122X.2004.21351.x (2004).
- 73 Natali, P. G. *et al.* Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **52**, 713-717 (1992).
- 74 Tsutsui, S. *et al.* A loss of c-kit expression is associated with an advanced stage and poor prognosis in breast cancer. *British journal of cancer* **94**, 1874-1878, doi:10.1038/sj.bjc.6603183 (2006).
- 75 Chui, X. *et al.* Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *British journal of cancer* **73**, 1233-1236 (1996).
- 76 Eroglu, A. & Sari, A. Expression of c-kit proto-oncogene product in breast cancer tissues. *Medical oncology* **24**, 169-174 (2007).
- 77 Roussidis, A. E., Theocharis, A. D., Tzanakakis, G. N. & Karamanos, N. K. The importance of c-Kit and PDGF receptors as potential targets for molecular therapy in breast cancer. *Current medicinal chemistry* **14**, 735-743 (2007).
- 78 Palmu, S., Soderstrom, K. O., Quazi, K., Isola, J. & Salminen, E. Expression of C-KIT and HER-2 tyrosine kinase receptors in poor-prognosis breast cancer. *Anticancer research* **22**, 411-414 (2002).

- 79 Tsuda, H. *et al.* Correlation of KIT and EGFR overexpression with invasive ductal breast carcinoma of the solid-tubular subtype, nuclear grade 3, and mesenchymal or myoepithelial differentiation. *Cancer science* **96**, 48-53, doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00009.x (2005).
- 80 Polyak, K. Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of clinical investigation* **121**, 3786-3788, doi:10.1172/JCI60534 (2011).
- 81 Swanton, C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer research* **72**, 4875-4882, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2217 (2012).
- 82 Tannock, I. F., Tannock, I., Hill, R., Bristow, R. & Harrington, L. *Basic Science of Oncology, Fifth Edition.* (McGraw-Hill Education, 2013).
- 83 Lopez, T. V. *et al.* Autocrine/paracrine erythropoietin signalling promotes JAK/STAT-dependent proliferation of human cervical cancer cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **129**, 2566-2576, doi:10.1002/ijc.25935 (2011).
- 84 Fu, P., Jiang, X. & Arcasoy, M. O. Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **379**, 696-701, doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.146 (2009).
- 85 Kashiwagi S, Y. M., Takashima T, Aomatsu N, Kawajiri H, Ogawa Y, Onoda N, Ishikawa T, Wakasa K, Hirakawa K. c-Kit expression as a prognostic molecular marker in patients with basal-like breast cancer.
- 86 Kondi-Pafiti, A. *et al.* Expression of c-kit in common benign and malignant breast lesions. *Tumori* **96**, 978-984 (2010).
- 87 Lester, R. D., Jo, M., Campana, W. M. & Gonias, S. L. Erythropoietin promotes MCF-7 breast cancer cell migration by an ERK/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway and is primarily responsible for the increase in migration observed in hypoxia. *The Journal of biological chemistry* **280**, 39273-39277, doi:10.1074/jbc.M509446200 (2005).
- 88 Regan, J. L. *et al.* c-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brca1-mutation-associated breast cancer. *Oncogene* **31**, 869-883, doi:10.1038/onc.2011.289 (2012).
- 89 Shi, Z. *et al.* Erythropoietin-induced activation of the JAK2/STAT5, PI3K/Akt, and Ras/ERK pathways promotes malignant cell behavior in a modified breast cancer cell line. *Molecular cancer research : MCR* **8**, 615-626, doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0264 (2010).
- 90 Simon, R. *et al.* KIT (CD117)-positive breast cancers are infrequent and lack KIT gene mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 178-183 (2004).
- 91 Jones, P. A. Overview of cancer epigenetics. *Seminars in hematology* **42**, S3-8 (2005).
- 92 Liang, K. *et al.* Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer cell* **18**, 423-435, doi:10.1016/j.ccr.2010.10.025 (2010).
- 93 Elliott, S. *et al.* Epo receptors are not detectable in primary human tumor tissue samples. *PloS one* **8**, e68083, doi:10.1371/journal.pone.0068083 (2013).
- 94 Swift, S. *et al.* Absence of functional EpoR expression in human tumor cell lines. *Blood* **115**, 4254-4263, doi:10.1182/blood-2009-10-248674 (2010).
- 95 Briske-Anderson, M. J., Finley, J. W. & Newman, S. M. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **214**, 248-257 (1997).

- 96 Esquenet, M., Swinnen, J. V., Heyns, W. & Verhoeven, G. LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **62**, 391-399 (1997).
- 97 Lin, H. K. *et al.* Suppression versus induction of androgen receptor functions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer LNCaP cells with different passage numbers. *The Journal of biological chemistry* **278**, 50902-50907, doi:10.1074/jbc.M300676200 (2003).
- 98 Cervi, D. *et al.* Phosphorylation status of c-Kit and Epo receptors, and the presence of wild-type p53 confer in vitro resistance of murine erythroleukemic cells to Celecoxib. *Oncogene* **23**, 2305-2314, doi:10.1038/sj.onc.1207400 (2004).
- 99 Doi, H. *et al.* Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit^{low}. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2513-2517 (1997).
- 100 LaMontagne, K. R. *et al.* Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models. *Molecular cancer therapeutics* **5**, 347-355, doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0203 (2006).
- 101 Wilson, K. S., Roberts, H., Leek, R., Harris, A. L. & Geradts, J. Differential gene expression patterns in HER2/neu-positive and -negative breast cancer cell lines and tissues. *The American journal of pathology* **161**, 1171-1185, doi:10.1016/S0002-9440(10)64394-5 (2002).
- 102 Jelkmann, W. Regulation of erythropoietin production. *The Journal of physiology* **589**, 1251-1258, doi:10.1113/jphysiol.2010.195057 (2011).
- 103 Chang, J., Couture, F., Young, S., McWatters, K. L. & Lau, C. Y. Weekly epoetin alfa maintains hemoglobin, improves quality of life, and reduces transfusion in breast cancer patients receiving chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 2597-2605, doi:10.1200/JCO.2004.12.027 (2005).
- 104 Leyland-Jones, B. *et al.* Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 5960-5972, doi:10.1200/JCO.2005.06.150 (2005).
- 105 O'Driscoll, L. *et al.* Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells. *The Journal of endocrinology* **191**, 665-676, doi:10.1677/joe.1.06894 (2006).
- 106 Yasuda, A. *et al.* The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Molecular cancer* **5**, 46, doi:10.1186/1476-4598-5-46 (2006).
- 107 Yasuda, A. *et al.* Stem cell factor/c-kit receptor signaling enhances the proliferation and invasion of colorectal cancer cells through the PI3K/Akt pathway. *Digestive diseases and sciences* **52**, 2292-2300, doi:10.1007/s10620-007-9759-7 (2007).
- 108 Panzenbock, B., Bartunek, P., Mapara, M. Y. & Zenke, M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood* **92**, 3658-3668 (1998).
- 109 Broudy, V. C. *et al.* Stem cell factor influences the proliferation and erythroid differentiation of the MB-02 human erythroleukemia cell line by binding to a high-affinity c-kit receptor. *Blood* **82**, 436-444 (1993).
- 110 Joneja, B., Chen, H. C., Seshasayee, D., Wrentmore, A. L. & Wojchowski, D. M. Mechanisms of stem cell factor and erythropoietin proliferative co-signaling in FDC2-ER cells. *Blood* **90**, 3533-3545 (1997).

- 111 Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C. & Wickrema, A. Distinct roles of erythropoietin, insulin-like growth factor I, and stem cell factor in the development of erythroid progenitor cells. *The Journal of clinical investigation* **94**, 34-43, doi:10.1172/JCI117327 (1994).
- 112 Wang, W. Synergy Between Erythropoietin and Stem Cell Factor During Erythropoiesis Can Be Quantitatively Described Without Co-Signaling Effects. *Biotechnology and Bioengineering* **99** (2008).
- 113 Pantel, K., Loeffler, M., Bungart, B. & Wichmann, H. E. A mathematical model of erythropoiesis in mice and rats. Part 4: Differences between bone marrow and spleen. *Cell and tissue kinetics* **23**, 283-297 (1990).
- 114 Anagnostou, A., Lee, E. S., Kessimian, N., Levinson, R. & Steiner, M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 5978-5982 (1990).
- 115 Lai, S. Y. *et al.* Erythropoietin-mediated activation of JAK-STAT signaling contributes to cellular invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* **24**, 4442-4449, doi:10.1038/sj.onc.1208635 (2005).
- 116 Jeong, H. J., Na, H. J., Hong, S. H. & Kim, H. M. Inhibition of the stem cell factor-induced migration of mast cells by dexamethasone. *Endocrinology* **144**, 4080-4086 (2003).
- 117 Matsui, J., Wakabayashi, T., Asada, M., Yoshimatsu, K. & Okada, M. Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **279**, 18600-18607, doi:10.1074/jbc.M311643200 (2004).
- 118 Sun, L., Lee, J. & Fine, H. A. Neuronally expressed stem cell factor induces neural stem cell migration to areas of brain injury. *The Journal of clinical investigation* **113**, 1364-1374, doi:10.1172/JCI20001 (2004).
- 119 Feldman, L. *et al.* Erythropoietin stimulates growth and STAT5 phosphorylation in human prostate epithelial and prostate cancer cells. *The Prostate* **66**, 135-145, doi:10.1002/pros.20310 (2006).
- 120 Muta, K., Krantz, S. B., Bondurant, M. C. & Dai, C. H. Stem cell factor retards differentiation of normal human erythroid progenitor cells while stimulating proliferation. *Blood* **86**, 572-580 (1995).