



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD METASTÁSICA DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO TRIPLE NEGATIVO QUE EXPRESAN EL MARCADOR C-KIT”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
JOSÉ ANDRÉS LÓPEZ MEJÍA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Leticia Rocha Zavaleta
[Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Elizabeth Langley McCarron
[Instituto Nacional de Cancerología](#)

Dra. Claudia González Espinosa
[Cinvestav, IPN](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Mayo, 2017



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.

AGRADECIMIENTOS

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

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAPIIT – Clave IN209613 y PAPIIT – Clave IN204816) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Ciencia básica – Clave 152492).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas (CVU-613237, Becario-574822).

Agradezco a la M. en C. Ma. Cecilia Aguilar Zacarías por el apoyo técnico brindado para la realización de este proyecto.

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Cáncer de mama	2
2.2 Cáncer de mama triple negativo	5
2.3 c-Kit	9
2.4 Factor de células troncales (SCF)	10
2.5 Transducción de señales de c-kit	12
2.6 c-Kit en cáncer	13
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVO GENERAL	17
5.1 Objetivos particulares	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	18
6.1 Líneas celulares	18
6.1.1 Cultivo celular	19
6.2 Expresión del receptor c-Kit	19
6.2.1 Análisis de la presencia de mRNA de c-Kit por RT-PCR	19
6.2.2 Análisis de la presencia de c-Kit por Western blot	20
6.2.3 Análisis de la presencia de c-Kit por citometría de flujo	21
6.3 Ensayos de viabilidad celular	22
6.4 Análisis de la migración celular en respuesta al ligando de c-Kit	23
6.5 Ensayos de crecimiento independiente de anclaje	24
6.6 Análisis estadístico de los datos	24
7. RESULTADOS	25
7.1 El receptor c-Kit en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo	25
7.2 Efecto de la estimulación de c-kit en la viabilidad celular de líneas de CMTN	27
7.3 Efecto del SCF sobre la migración celular	33
7.4 Efecto de la activación de c-kit por su ligando SCF en el crecimiento independiente de anclaje	37
8. DISCUSIÓN	40
9. CONCLUSIONES	47
10. REFERENCIAS	48

1. RESUMEN

El cáncer de mama triple negativo se caracteriza por la ausencia de los receptores a estrógeno, progesterona, y del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. Este tipo de tumores presentan un comportamiento clínico agresivo y un pronóstico asociado a metástasis temprana. El manejo clínico actualmente consiste únicamente en cirugías y quimioterapias sistémicas que son poco eficientes, por lo que es necesaria la caracterización de marcadores celulares específicos involucrados en la progresión y metástasis de esta enfermedad que puedan ser utilizados como blancos en terapias dirigidas. Con base en estudios de expresión génica, se han sugerido diversas moléculas, entre ellas el receptor c-Kit, que podrían ser utilizadas como marcadores de subtipos específicos de este tipo de cáncer abriendo la posibilidad hacia el uso de terapias dirigidas en este padecimiento.

Con la finalidad de entender el papel que juega c-Kit en procesos vinculados a la metástasis, en este trabajo se evaluó la expresión de este receptor por RT-PCR, western blot y citometría de flujo, en las líneas celulares HCC1806, HCC1937, HCC70, MDA-MB-468 y DU4475 correspondientes a distintas etapas clínicas de cáncer de mama triple negativo. Además, se evaluó mediante ensayos *in vitro* el efecto de la activación de c-Kit por unión a su ligando el factor de células troncales (SCF) en la proliferación, migración y crecimiento independiente de anclaje.

Se demostró que cuatro de las cinco líneas presentan al receptor c-Kit en membrana celular, aunque en las líneas celulares correspondientes a etapas clínicas tempranas se presenta en una menor proporción de la población celular, comparado con las líneas de etapas más avanzadas. En los ensayos funcionales no pudimos determinar un cambio en la proliferación celular al estimular c-Kit con SCF en ninguna de las líneas celulares evaluadas. En lo referente a la migración celular, se observó una respuesta quimiotáctica hacia SCF únicamente en las líneas HCC1806 y HCC1937 correspondientes a etapas clínicas tempranas. La capacidad de formar colonias en agar suave incrementó en las líneas celulares HCC1806, HCC1937 y HCC70 (de una etapa clínica intermedia) de forma dosis dependiente al SCF. Interesantemente en las líneas celulares correspondientes a etapas clínicas avanzadas MDA-MB-468 y DU4475 no se observó un cambio en la migración celular o la formación de colonias al estimular las células con SCF.

Estos datos sugieren que c-Kit puede tener un papel importante en etapas tempranas de la progresión de la enfermedad, lo que abre la posibilidad que, con base en estudios posteriores, pueda catalogarse a este receptor como un blanco terapéutico en etapas tempranas de un subtipo de cáncer de mama triple negativo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Cáncer de mama

El cáncer de mama es actualmente la neoplasia que se desarrolla con mayor frecuencia en mujeres alrededor del mundo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), un estimado de 1.67 millones de casos nuevos fueron diagnosticados en el 2012, lo que correspondería aproximadamente al 25% de todos los tipos de cáncer diagnosticados en ese año (WHO, 2012). Por cada 100 000 mujeres en México, el cáncer de mama tiene una incidencia del 24.8%, una mortalidad del 14.2% y una prevalencia a 5 años del 34.3%, siendo con ello la neoplasia más frecuente y con el mayor número de defunciones en la población femenina (INEGI, 2011; WHO, 2012).

El diagnóstico tardío y el difícil acceso a los tratamientos son las principales causas que han convertido a este tipo de cáncer en un tema importante de salud nacional (Bhikoo, Srinivasa, Yu, Moss, & Hill, 2011; Chávarri-Guerra et al., 2012). La mayoría de las defunciones asociadas a este padecimiento ocurren debido al desarrollo de quimioresistencia y a metástasis. Los mecanismos moleculares que guían estos procesos en la enfermedad aún no se entienden bien, originando un reto en cuanto a mejores diagnósticos, tratamientos y mejores manejos de la enfermedad (Goh et al., 2016).

El cáncer de mama puede originarse en diversos tejidos de la glándula mamaria. Las mamas están formadas por tejido conjuntivo, adiposo, linfático y epitelial; este último conforma a las dos principales estructuras de la mama: los lóbulos y los ductos, que son los encargados de producir y transportar la leche hacia el pezón (figura 1). En estas dos estructuras es donde se desarrollan la mayoría de las neoplasias, mientras que son poco frecuentes aquellas originadas de los demás tejidos de la mama (Instituto nacional de salud, NIH).

Un carcinoma *in situ* es la condición en la que las células anormales se encuentran confinadas a los ductos o a los lóbulos, el momento en el que las células han comenzado a dispersarse de su lugar de origen hacia los tejidos cercanos, se denomina ya como carcinoma invasivo (Figura 1). Estos carcinomas se clasifican histológicamente con base en la cuenta mitótica, el tamaño del tumor, el estado de los nódulos linfáticos regionales y la diseminación del tumor a sitios distantes metastásicos (Vuong, Simpson, Green, Cummings, & Lakhani, 2014).

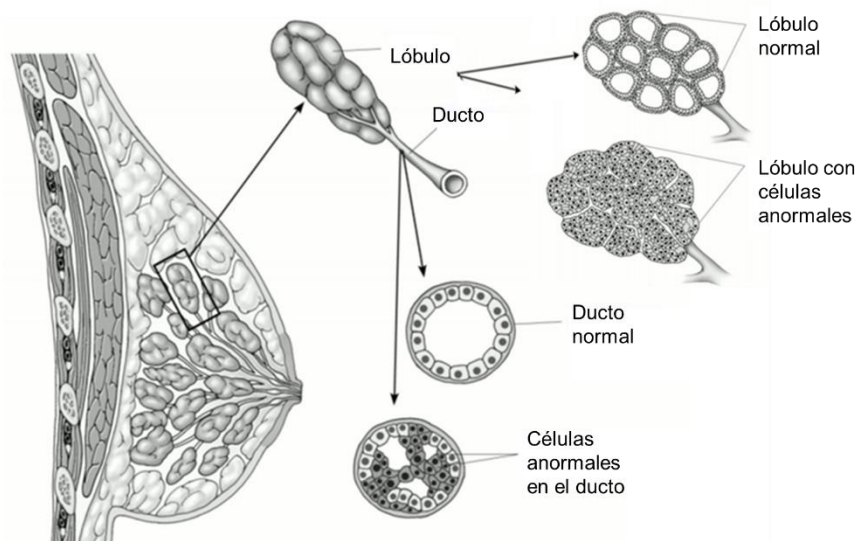


Figura 1. Anatomía del seno femenino y esquema de tejido sano y carcinoma ductal y lobular (Modificado de la Guía de Cáncer de Mama de la American Cancer Society).

Sumado a lo anterior, como consecuencia de los avances en biología molecular, el diagnóstico de la enfermedad se complementa con la detección de ciertos biomarcadores tumorales. La presencia o ausencia de éstos pueden sugerir un estado clínico general del paciente, o bien, determinar la efectividad de terapias específicas. Las alteraciones en la estructura y expresión de ciertas hormonas o receptores a factores de crecimiento han sido tomadas como importantes biomarcadores en el cáncer de mama. Con base en esto, el cáncer de mama se clasifica inmunohistoquímicamente dependiendo de la presencia, ausencia o nivel de expresión de tres biomarcadores: el receptor alfa de estrógenos (ER), el receptor beta de progesterona (PR) y el receptor 2 para el factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Previati et al., 2013).

El ER y el PR son miembros de la familia de receptores nucleares activados por hormonas esteroideas (como el estradiol, el estrógeno y la progesterona) y están involucrados en procesos que incluyen la proliferación celular, la angiogénesis y la invasión, entre otros (Heldring et al., 2007). Los tumores positivos a ER y PR están bien diferenciados, son poco agresivos y tienen un mejor pronóstico, ya que muestran una buena respuesta a terapias hormonales (Calhoun & Collins, 2015).

Las terapias endócrinas se dividen principalmente en dos grupos de acuerdo a las clases de fármacos empleados: los “moduladores” selectivos que inhiben a receptores de estrógenos (tamoxifeno, raloxifeno y toremifeno), y los inhibidores de aromatasas, que bloquean la síntesis de estrógenos (exemestano, letrozol y anastrozol) (De Abreu, Schwartz, Wells, & Tsongalis, 2014).

Por su parte, el receptor HER2 pertenece a una familia de receptores con actividad de cinasa de tirosinas que incluye al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), los cuales también están involucrados en funciones celulares como supervivencia y proliferación (Awada, Bozovic-Spasojevic, & Chow, 2012). En el cáncer de mama HER2 positivo existe una amplificación del gen que ocasiona su sobreexpresión, ésta se presenta entre el 15 y el 20% de los casos de cáncer de mama y se asocia a un fenotipo más agresivo que las formas luminales (ER+/PR+). El tratamiento dirigido a este receptor se basa en el bloqueo de HER2 mediante anticuerpos monoclonales como trastuzumab (herceptin) y pertuzumab dirigidos a la parte extracelular del receptor (Hernández-Blanquissett et al., 2016).

A los patrones de expresión del receptor a estrógenos y el receptor a progesterona (ER+/PR-, ER-/PR+) se suma el estado de expresión de HER2 (HER2+, HER2-), dando como resultado tumores positivos a receptores de estrógenos con o sin la expresión de HER2 (ER+/PR+/ HER2+, ER+/PR+/ HER2-); tumores negativos a estrógenos y positivos a HER2 (ER-/PR-/ HER2+); y, por último, tumores negativos a los tres marcadores (ER-/PR-/HER2-), conociéndose estos últimos como el cáncer de mama triple negativo (figura 2) (Rivenbark, O'Connor, & Coleman, 2013).

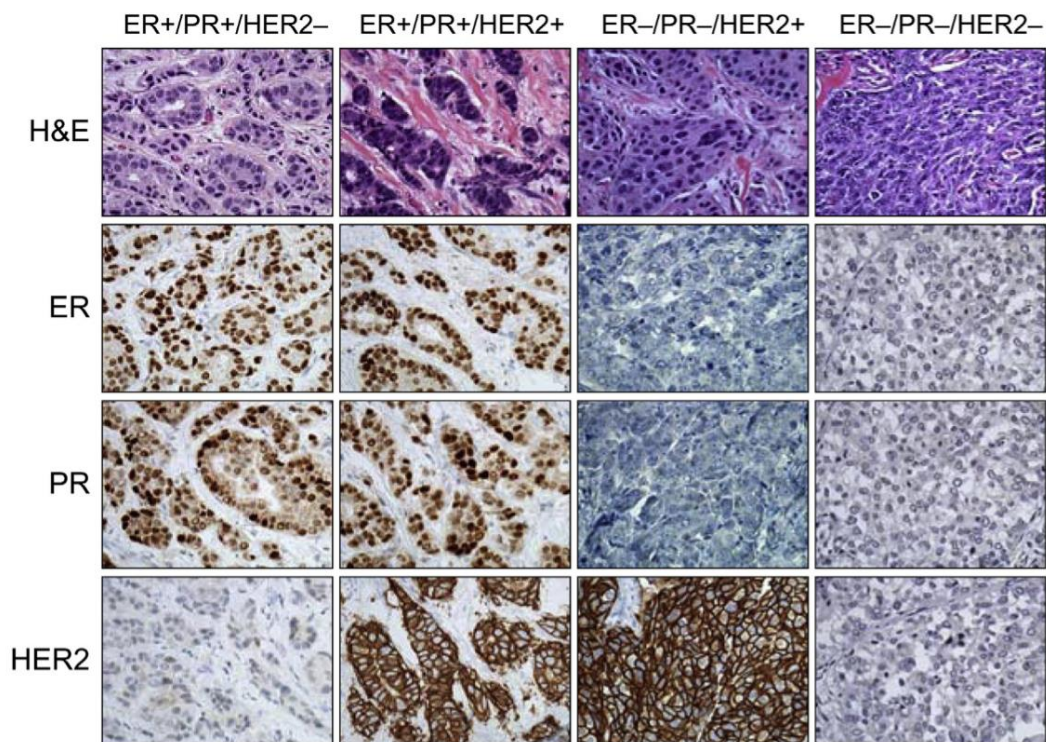


Figura 2. Clasificación inmunohistoquímica basada en la expresión de ER, PR y HER2. La histología de las células cancerosas se observa con la tinción de hematoxilina-eosina (H&E) en la fila superior. Nótese en la columna extremo derecha el subtipo negativo a los tres marcadores celulares, es decir, el cáncer de mama triple negativo. Tomado de (Rivenbark et al., 2013).

Con el desarrollo de nuevas tecnologías como los microarreglos se comenzaron a identificar distintos perfiles de expresión molecular de los tumores. Esta información permitió una mejor caracterización biológica para el entendimiento, clasificación y estudio del cáncer de mama. Perou y colaboradores fueron los primeros en proponer una clasificación molecular del cáncer de mama que actualmente se denomina PAM50 (Perou et al., 2000). Los subtipos moleculares sugeridos con base en el análisis de expresión génica se asocian con distintos comportamientos clínicos, y a su vez, con un perfil de expresión ER/PR/HER2 (Taherian-Fard, Srihari, & Ragan, 2014).

En el consenso actual de PAM50 los grupos fundamentales del cáncer de mama propuestos son: 1) luminal A (ER+ PR+ HER2-) que muestra un pronóstico excelente, 2) luminal B (ER+/- PR+/- HER2+/-) con un pronóstico intermedio, 3) HER+ (ER- PR- HER2+) con un pronóstico reservado, 4) tipo normal (ER-/+ HER2-) con un pronóstico intermedio, 5) bajo en claudina (ER- PR- HER2-) con un pronóstico malo, y 6) tipo basal (ER- PR- HER2-) con un pronóstico malo, sugiriendo también que los tumores triple negativos son los que muestran el peor pronóstico para esta enfermedad (Eroles, Bosch, Alejandro Pérez-Fidalgo, & Lluch, 2012).

La clasificación molecular del cáncer de mama identifica a sub-tipos biológicos sustancialmente diferentes en la que los carcinomas luminales comparados con los de tipo basal presentan etiologías distintas y por consecuencia se consideran enfermedades totalmente diferentes. Debido a estas diferencias, es necesaria la estratificación para el desarrollo de estudios clínicos y preclínicos para identificar características en la tumorigénesis que puedan ser usadas en la selección de terapias específicas contra cada subtipo biológico de cáncer de mama, en especial aquellos con el peor pronóstico (Engebraaten, Vollan, & Børresen-Dale, 2013).

2.2 Cáncer de mama triple negativo

El subtipo de cáncer de mama más agresivo, con la tasa de mortalidad más alta es el denominado cáncer de mama triple negativo (CMTN). Este sub-tipo de cáncer muestra una alta recurrencia, una supervivencia a la enfermedad muy corta y, además, un diagnóstico emitido generalmente a temprana edad. Por definición, los CMTN son aquellos que resultan negativos a la expresión de ER, PR y HER2; sin embargo, los tumores agrupados bajo éste término presentan una gran variedad de patrones histológicos, manifiestan una alta heterogeneidad clínica y patológica, así como distintos perfiles mutacionales y de expresión

génica, lo que conlleva a distintas respuestas a las quimioterapias actuales aplicadas a este subtipo de cáncer de mama (B. D. Lehmann & Pietenpol, 2015).

El 80% de los CMTN muestran una morfología de tipo basal y una alta expresión de citoqueratinas 5, 6, 14, 17 (CK 5/6/14/17) y P-caderina, así como una alta cuenta mitótica (Arnes et al., 2005; Cheang et al., 2008; L. G. Fulford et al., 2006; Laura G Fulford et al., 2007; Makretsov et al., 2004). También se han observado alteraciones en genes asociados con la reparación del DNA como TP53 (Turner et al., 2013) y BRCA1 (Stefansson et al., 2011), así como en genes supresores de tumores como RB1. Otra de las características a notar, es la activación de la vía PI3K debida a la pérdida de reguladores negativos tales como algunas fosfatasas (PTEN e INPP4B) y la presencia de mutaciones en moléculas señalizadoras de la red de mTOR, ERK, AKT, RAS y NF- κ B (Abramson, Lehmann, Ballinger, & Pietenpol, 2015; Shapira, Lee, Vora, & Budman, 2013; Vogelstein & Kinzler, 2004; Yang, Polley, & Lipkowitz, 2016).

Los CMTN en conjunto corresponden a aproximadamente el 15% de todos los casos de cáncer de mama diagnosticados. Algunos estudios sugieren que la incidencia y prevalencia en este tipo de cáncer es incluso mayor en mujeres hispanas y afroamericanas, y generalmente se presenta en mujeres jóvenes de menos de 40 años (Lara-Medina et al., 2011; Vaca-Paniagua et al., 2015; Villarreal-Garza et al., 2015).

El manejo clínico de estos tumores incluye cirugía, técnicas de radioterapia y quimioterapias sistémicas; ya que aún no existen terapias dirigidas disponibles (Becker, 2015). La quimioterapia sistémica se basa principalmente en fármacos inductores de apoptosis como las antraciclinas (doxorrubicina), o combinaciones como FEC (5-fluorouracilo, epirrubicina, ciclofosfamida), EC (epirrubicina y ciclofosfamida), CMF (ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo), DC (docetaxel y capecitabina), GT (gemcitabina y paclitaxel), ixabepilona con capecitabina y en algunos casos también carboplatinos (Anders, Zagar, & Carey, 2013; Telli et al., 2015; Vollebergh et al., 2011).

Debido a la inespecificidad de la quimioterapia y a las complicaciones propias de la enfermedad, los tumores triple negativos muestran un pronóstico muy pobre asociado con metástasis temprana, que ocurre en promedio a los tres años posteriores al diagnóstico. La metástasis originada por los carcinomas mamarios suele presentarse en hueso, pulmón e hígado principalmente (Weigelt, Peterse, & van 't Veer, 2005). El que exista metástasis en diferentes nichos depende de cambios en los perfiles de expresión, por ejemplo, la metástasis en pulmón muestra específicamente una sobreexpresión de epiregulina, metaloproteasa de matriz 1 (MMP1), ciclooxigenasa 2 (COX-2) y CXCL1; que no se observa en la metástasis de hueso o hígado (Minn et al., 2005; Ramaswamy, Ross, Lander, & Golub, 2003).

La metástasis se origina cuando ciertas células del tumor primario adquieren capacidades migratorias y cambian hacia un fenotipo invasivo con la capacidad de colonizar nuevos nichos lejos del tumor primario (Chan et al., 2015; Hanahan & Weinberg, 2011). Para poder atravesar por este proceso, las células necesitan un conjunto diferente de moléculas de adhesión, o bien disminuir la cantidad de algunas proteínas, como la E-caderina (que se considera un marcador epitelial) y algunas integrinas (Thiery, 2002); también puede existir una mayor expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el cual es una citocina con efectos en la proliferación celular y la invasión (Blobe, Schieman, & Lodish, 2000); y otras como la osteopontina (OPN) que es una glicofosfoproteína que secretan diferentes tipos celulares, entre ellas las células epiteliales de la mama, y que actúa como una señal reguladora en la sobrevivencia celular de una manera tanto autócrina como parácrina, y en el caso del cáncer, puede actuar tanto en el tumor primario, así como mostrar una influencia en el desarrollo y mantenimiento de nichos metastásicos (McAllister et al., 2008).

La integración del conocimiento generado por los estudios sobre estos marcadores de pronóstico, la generación de nuevos modelos metastásicos, etc., han sugerido que los carcinomas con un potencial metastásico pueden distinguirse de aquellos que muestran una poca probabilidad de desarrollar metástasis con base en sus perfiles de expresión génica (Weigelt et al., 2005).

En el caso específico de los tumores de CMTN, a pesar de la extensa heterogeneidad intrínseca que presentan, la identificación de perfiles de expresión génica y sus características moleculares muestra un doble propósito: establecer una completa sub-clasificación biológica de los mismos y buscar el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas para cada subtipo (Engebraaten et al., 2013).

Actualmente existen dos clasificaciones basadas en perfiles de expresión génica que determinan subtipos de CMTN. La primera, dada por Lehman y colegas (B. D. B. Lehmann et al., 2011) divide a los CMTN en 6 subtipos: tipo basal 1 y 2 (BL1 y BL2), inmunomodulador (IM), mesenquimal (M), mesenquimal tipo troncal (MSL), y el último subtipo como receptor de andrógenos luminal (LAR). Sin embargo, una de las críticas que se le hace a esta clasificación es que los seis subtipos propuestos no pueden ser detectados cuando la subtipificación se limita a los tumores que solo presentan la información de inmunohistoquímica para ER/PR/HER2. De igual manera, los tumores de subtipos tipo basal 1 y 2 no son fácilmente distinguibles cuando se usa la firma de genes dada por Lehmann en los agrupamientos jerárquicos de los sets de datos públicos de CMTN (Carolina & Reserve, 2011).

La segunda y más reciente clasificación molecular de los CMTN se le atribuye a Burstein y colegas, en la que se identifican cuatro subtipos de CMTN: 1) luminal AR (LAR), 2)

mesenquimal (MES), 3) tipo basal inmunosupresor (BLIS), y 4) tipo basal inmunoactivador (BLIA) (Burstein et al., 2015).

Tanto en la clasificación en subtipos de CMTN de Lehmann y Bauer como en la de Burstein y colegas, existe una fuerte segregación basada en una firma referente a la activación de cascadas de señalización involucradas con la respuesta inmunológica. Este componente de la alteración de la respuesta inmune se ha tomado como un importante factor en la predicción del pronóstico clínico (Teschendorff, Miremadi, Pinder, Ellis, & Caldas, 2007).

Los cuatro subtipos de CMTN que proponen Burstein y colegas además de tener la firma de expresión génica intrínseca a cada subgrupo, se caracterizan por tener un pronóstico clínico distinto. En concordancia con el párrafo anterior, un perfil de expresión génica en el que se regule negativamente la respuesta inmune podría sugerir un fenotipo tumoral más agresivo. Ahora bien, dentro de los cuatro subtipos de tumores de CMTN, aquellos pertenecientes al subgrupo tipo basal inmunosupresor (BLIS), son los que muestran el peor resultado clínico, mostrando una sobrevida libre de enfermedad muy corta en comparación con los otros subtipos (Burstein et al., 2015).

Burstein y colegas también realizaron análisis de DNA que mostraron amplificaciones de genes específicos en cada subtipo de tumores CMTN que proponen, lo que abre la posibilidad de caracterizar la relevancia que tienen los genes sobreexpresados en la progresión de la enfermedad, y de encontrar alguna asociación podrían utilizarse como blancos terapéuticos específicos a cada subtipo de tumores CMTN, ya que existen fármacos dirigidos hacia algunos de los productos de estos genes. Específicamente en tumores del subtipo basal inmuno-supresor (BLIS), que es el que presenta el pronóstico clínico más pobre, los genes sobreexpresados son: ELF5, HORMAD1, SOX10, SERPINB5, FOXC1, SOX8, TUBB2B, VTCN1, SOX6, KIT y FGFR2, los cuales pueden estar relacionados con la mala prognosis, la recaída y el desarrollo de metástasis característica de este subgrupo. KIT es de gran relevancia para el presente estudio ya que existen fármacos dirigidos a inhibir la actividad de la proteína para la que codifica este gen (Burstein et al., 2015).

El asignar blancos terapéuticos a los diferentes subtipos de tumores de triple negativos puede ayudar al desarrollo de terapias más eficientes, con una mayor cantidad de tratamientos disponibles y a establecer criterios para la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas, todo esto con el fin de aumentar la tasa de sobrevida libre de enfermedad de los pacientes y el pronóstico clínico en general (Bose, 2015; McDonald, Clark, Tchou, Zhang, & Freedman, 2016; Prat et al., 2015).

2.3 c-Kit

KIT es un receptor con actividad de cinasa de tirosina (RTK) de tipo III. También es conocido como CD117. Los RTK's de tipo III incluyen al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1) y al receptor de la citocina FI (Flt3). La clase III de RTK's se caracteriza por la presencia de 5 dominios tipo inmunoglobulina en la porción extracelular y tienen un solo segmento transmembranal y uno citoplásmico que contiene el dominio con actividad de cinasa de tirosina (figura 3). Esta familia cuenta con una inserción de 70-100 aminoácidos cerca de la mitad del dominio de cinasa. En el caso de c-Kit, esta interrupción tiene una longitud de 80 aminoácidos (Johan Lennartsson & Rönstrand, 2012a).

El gen se encuentra en el locus *White Spotting* del cromosoma 4q11-q12. Al transcrito lo conforman 21 exones, y su transcripción está regulada por medio de factores de transcripción y por miRNAs. La proteína inmadura de c-Kit tiene una longitud de 976 aa, y pesa aproximadamente 110kDa, sin embargo, la proteína madura ya glicosilada pesa entre 145 y 160 kDa (Igoucheva & Alexeev, 2009).

Existen descritas 4 isoformas de c-Kit debido al splicing alternativo (Lev, Blechman, Givol, & Yarden, 1994). Dos isoformas difieren por la presencia o ausencia de una secuencia tetrapeptídica (GNNK) en la región juxtamembranal extracelular. Las otras isoformas corresponden a la ausencia o presencia de un residuo de serina en la región de inserción del dominio de cinasa de tirosina (Wypych et al., 1995). También existe una versión trunca del receptor (tr-Kit), esta forma contiene únicamente la segunda parte del dominio de cinasa y la cola del extremo carboxilo terminal. Esta forma trunca no tiene actividad de cinasa, sin embargo, puede actuar como una proteína de andamiaje (Rossi et al., 1992).

La activación de c-Kit necesita de la dimerización por unión a su ligando (figura 3). Su cinética de activación es rápida, los dímeros pueden detectarse minutos después de la adición del ligando, éste se une en el segundo y tercer dominio tipo inmunoglobulina, mientras que el cuarto dominio juega un papel en la dimerización (Reber, Da Silva, & Frossard, 2006). La señalización dada por la activación de Kit es importante en la eritropoyesis, linfopoyesis, la función y desarrollo de las células cebadas, la megacariopoyesis, la gametogénesis y la melanogénesis. Variaciones en la transducción de señales pueden originarse debido a mutaciones de las que suelen ser blanco el dominio de cinasa y la región membranal cercana al dominio de dimerización (Johan Lennartsson & Rönstrand, 2012a).

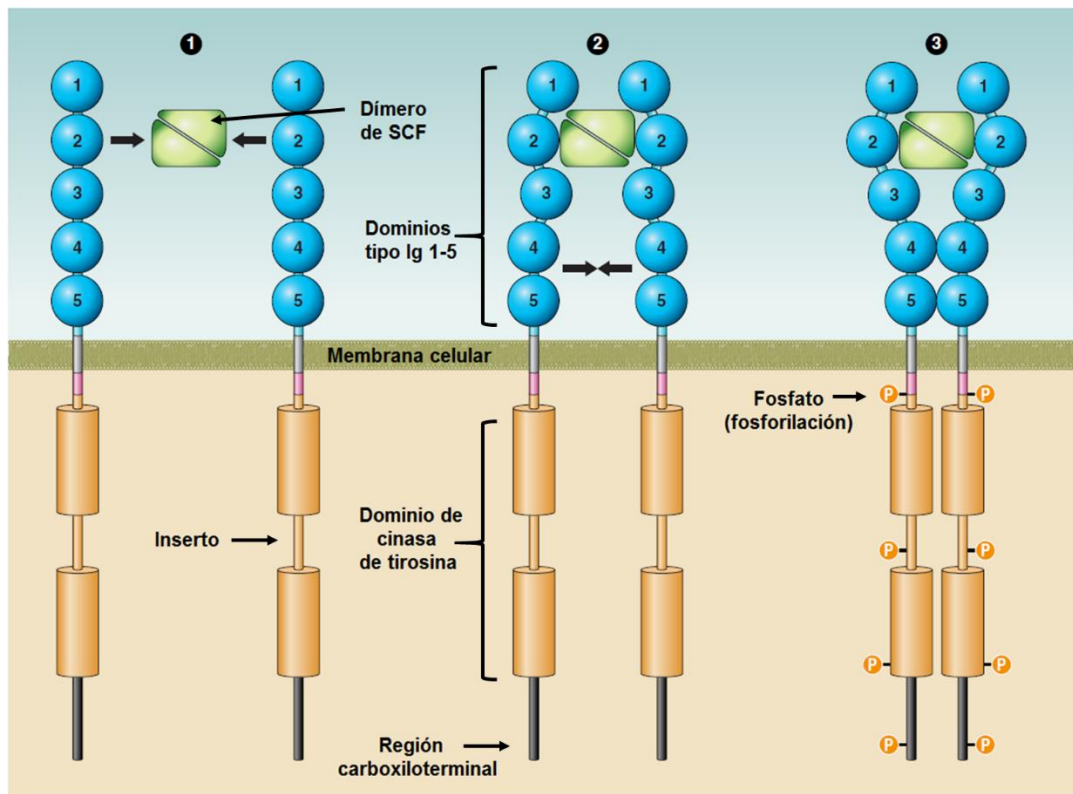


Figura 3. Representación esquemática de c-Kit, sus dominios estructurales y su dimerización por unión del ligando. En amarillo se observan la región intracelular con el dominio de cinasa de tirosina separados por un inserto. La parte extracelular muestra los dominios tipo inmunoglobulina en donde se une el dímero de su ligando (SCF) y que conlleva a la dimerización del receptor, a un cambio conformacional en el mismo (2) y a su activación por fosforilación (3). Tomado de Johan Lennartsson & Rönnstrand, 2012a.

El receptor c-kit se encuentra ampliamente distribuido en las células hematopoyéticas, células germinales, mastocitos, células progenitoras linfopoyéticas y células del tracto digestivo. C-Kit también se encuentra involucrado en el mantenimiento de la vasculatura cardíaca y en la integridad del tejido pulmonar. Además, este receptor también se ha encontrado en células epiteliales del seno y en neuronas pequeñas (Liang et al., 2013).

2.4 Factor de células troncales (SCF)

El factor de células troncales (SCF) también se conoce como *steel factor* o ligando de KIT. Se encuentra codificado en el cromosoma 12 y lo conforman nueve exones. Es un factor de crecimiento que presenta una isoforma soluble de 31 kDa y otra unida a la membrana celular de 45 kDa. La expresión de las isoformas se encuentra regulada a nivel de mRNA y a nivel proteico (figura 4) (Johan Lennartsson & Rönnstrand, 2012b).

El transcrito contiene la información para un dominio extracelular, uno transmembranal y una región intracelular. Ambas isoformas difieren en el exón 6, la isoforma que carece de este exón permanece unida a la membrana, ya que la metaloproteínasa 9 (MM9) corta a la proteína en esta región haciéndola soluble (figura 4). Las dos isoformas se unen a c-Kit y pueden desencadenar diferentes cascadas de señalización, o bien ser esta transducción de señal cuantitativa y cualitativamente distinta (Liang et al., 2013).

La expresión del SCF es inducida principalmente por HIF en respuesta a estímulos como la hipoxia, la radiación por luz UVB, entre otros (Han et al., 2008). El factor se expresa en fibroblastos y células endoteliales a través de todo el cuerpo, y su concentración basal en suero humano es 3.3 ng/ml (Langley et al., 1993). Este factor de crecimiento promueve la proliferación, la migración, la sobrevivencia y la diferenciación de progenitores hematopoyéticos, melanocitos y células germinales.

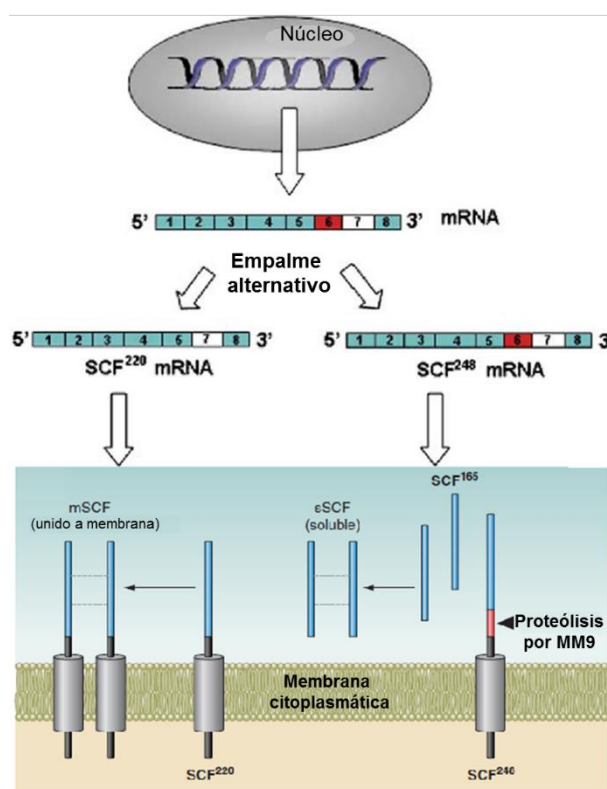


Figura 4. Representación esquemática del factor de células troncales (SCF), sus isoformas soluble y unida a membrana; y su regulación a nivel de empalme alternativo y proteólisis postraduccional. En el exón 6 se encuentra un sitio de proteólisis que genera la isoforma soluble por medio de la MM9. La proteína monomérica necesita dimerizarse (en ambas isoformas) para unirse al receptor c-Kit. Modificado de (Johan Lennartsson & Rönstrand, 2012a; Reber et al., 2006).

2.5 Transducción de señales de c-kit

Como ya se mencionó anteriormente, la activación de c-Kit regula funciones celulares como la proliferación, la supervivencia y la migración celular, principalmente implicadas en procesos de diferenciación celular como la eritropoyesis, linfopoyesis, megacariopoyesis, gametogénesis, melanogénesis, e incluso en el mantenimiento del músculo cardíaco. Estas características celulares se encuentran reguladas por las vías de señalización de PI3K/Akt, MAPK, JAK/STAT, PLC γ , con proteínas de la familia de Src y con algunas otras cascadas relacionadas con proteínas con dominios SH2 como la proteína adaptadora Grb7 (figura 5) (J Lennartsson et al., 1999; Samayawardhena, Hu, Stein, & Craig, 2006; Sun, Pedersen, & Rönstrand, 2008; Timokhina, Kissel, Stella, & Besmer, 1998; Trieselmann, Soboloff, & Berger, 2003).

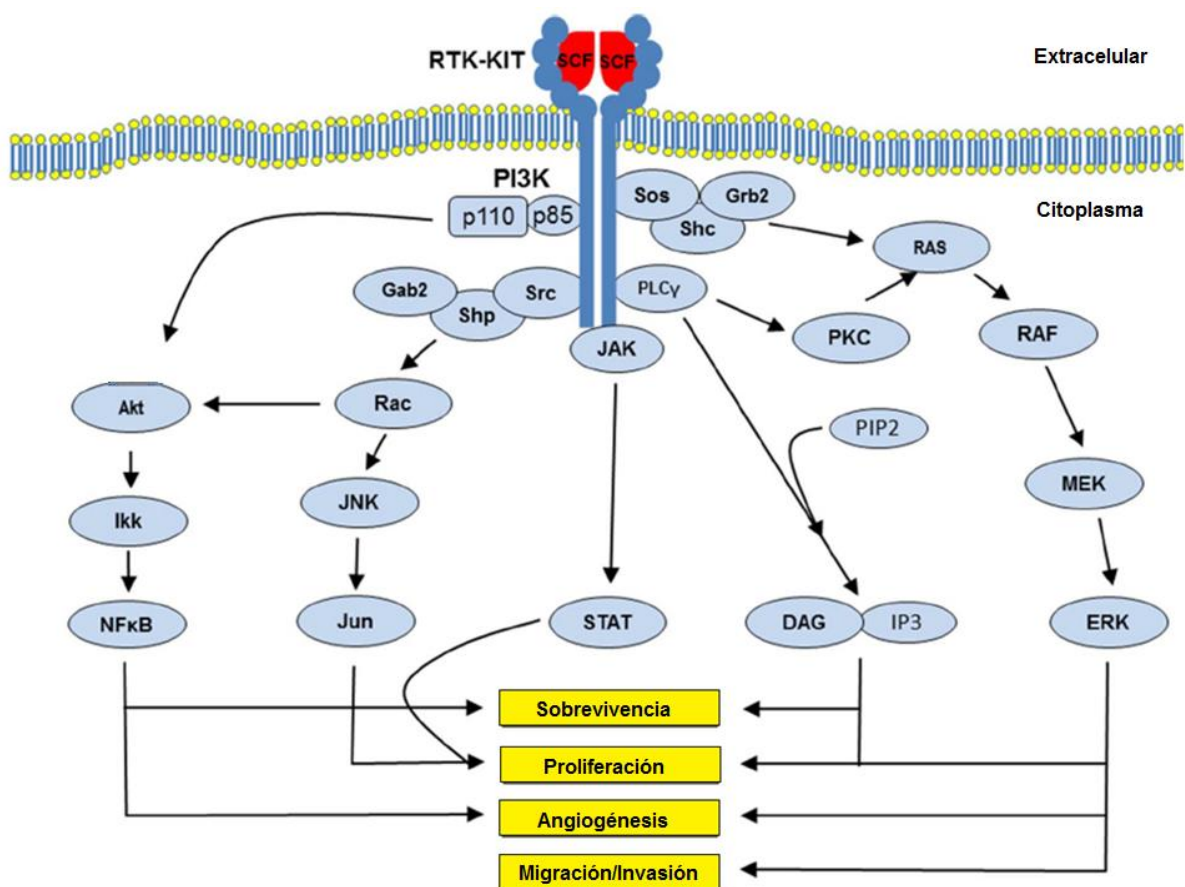


Figura 5. Vías de señalización activadas por c-Kit. Tomado de (Roberts & Govender, 2015).

Entre las diversas vías de señalización que pueden activarse por c-Kit, RAS/ERK tiene un papel directo en la proliferación celular, la angiogénesis, la migración celular y la invasión, siguiendo en orden la activación de las moléculas señalizadoras RAS, RAF, Mek1/Mek2 y ERK1/ERK2 (T. Yasuda & Kurosaki, 2008).

Al activar el eje PI3K/Akt, c-Kit promueve la sobrevivencia celular, la evasión de la apoptosis, la angiogénesis, y promueve la tumorigenesis, a través de la activación de Ikk por Akt y la posterior activación de NFκB. En el caso de la fosfolipasa c gamma, por medio de la acción del diacilglicerol y del inositol 1,4,5-trifosfato, c-Kit promueve también la proliferación y sobrevivencia celular (Takahashi & Shibuya, 1997).

Cuando c-Kit interactúa con otras enzimas citoplasmáticas como JAK, ésta activa a factores de transcripción STAT, los cuales se dimerizan después de una fosforilación y viajan al núcleo donde promueven la proliferación y diferenciación celular, así como la evasión de la apoptosis. Por último, las cinasas Src, bajo la activación de c-Kit, muestran una compleja interacción con las vías de RAS/ERK, PI3K/Akt y PLCγ, lo que se traduce en una respuesta celular proliferativa y de angiogénesis (Silva, 2004).

2.6 c-Kit en cáncer

Las cinasas de proteínas son enzimas que tienen un papel regulatorio clave en prácticamente todos los aspectos de la biología celular. Estas proteínas pueden regular la apoptosis, la progresión del ciclo celular y la proliferación, el rearrreglo del citoesqueleto, la diferenciación, el desarrollo, la respuesta inmune, la movilidad, la transcripción y algunas funciones del sistema nervioso (Roskoski, 2005). El que estén involucradas en todos estos procesos, significa que deben de tener una estrecha regulación ya que una actividad aberrante de estas enzimas puede verse involucrada en diversas enfermedades como el cáncer, la diabetes, enfermedades autoinmunes, cardiovasculares, etc. Es por ello que el campo de estudio de estas proteínas es muy importante, haciendo que estas enzimas sean atractivos blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos (Cohen, 2002).

En un contexto patológico, se han descrito mutaciones en el gen de c-Kit. Aquéllas con una pérdida de función se han asociado a patologías como el piebaldismo, en donde se producen zonas sin pigmentación debido a la ausencia de melanocitos (Spritz, Holmes, Itin, & Kuster, 1993). Por el contrario, mutaciones con ganancia de función se han descrito en diversas neoplasias: en tumores estromales gastrointestinales (GISTs), se han descrito estas mutaciones en el 80% de los casos (Hemmings & Yip, 2014); en el carcinoma de células

pequeñas de pulmón (SCLC) se ha observado una sobreexpresión del receptor en el 70% de los pacientes con esta patología, en la que además se ha observado una activación parácrina de c-Kit (Suyama & Ariyoshi, 1991); en la mastocitosis sistémica (acumulación y sobre activación de células cebadas y sus precursores) las mutaciones se presentan en el 90% de los casos, mientras que en la leucemia mieloide aguda (AML) se han descrito en el 85% (Sangle & Perkins, 2011). También en aproximadamente 20-25% de los melanomas (Woodman & Davies, 2010) y de los seminomas (tumores de las líneas germinales testiculares), se observa una desregulación asociada a c-Kit (Oosterhuis & Looijenga, 2005). Algunas de estas mutaciones en KIT han sido identificadas como factores de un pronóstico pobre, en los que se asocia una supervivencia disminuida comparada con los casos negativos a c-Kit en GISTs, melanomas y AML. En adición, se ha observado una inmunorreactividad en muchas neoplasias malignas como carcinomas císticos adenoideos, carcinomas de células renales, etc. (Went et al., 2004).

En cáncer de mama, los reportes de expresión de c-Kit varían desde una alta expresión hasta la pérdida de la misma (Talaiezadeh, Jazayeri, & Nateghi, 2012; Ulivi et al., 2004). Sin embargo, muchos de estos estudios han sido realizados sin tomar en cuenta la alta heterogeneidad intrínseca del cáncer de mama. Siendo que la sub-clasificación es de suma importancia para este tipo de estudios debido a la etiología y pronóstico clínico tan diverso que presentan los diferentes subtipos de cáncer de mama. Aun así, la prevalencia de la expresión del receptor se ha visto que es mayor en los tumores que muestran características de tipo basal y también en los clasificados como triple negativo, por lo que el receptor c-Kit prevalece como un importante candidato como marcador tumoral para algunos subtipos de cáncer de mama (figura 6) (Jansson et al., 2014a; Kashiwagi et al., 2013; Vennapusa, Oman, Parasher, & Cerilli, 2010).

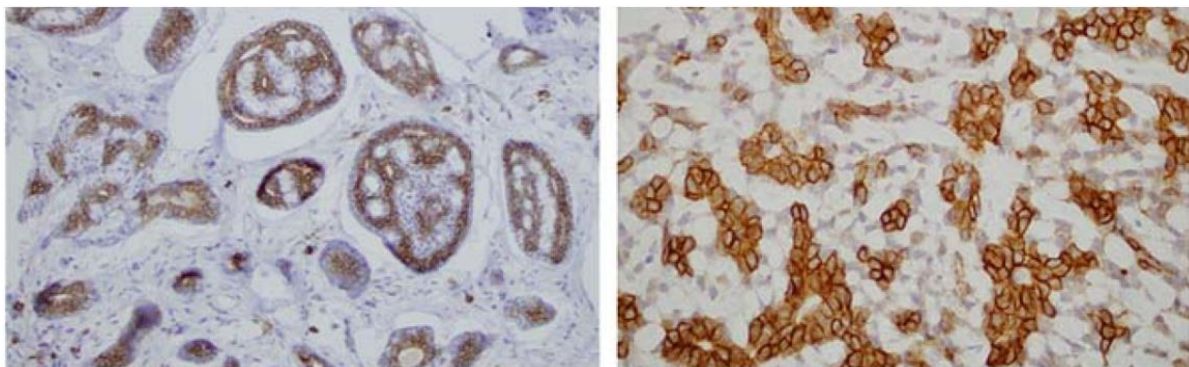


Figura 6. Expresión de c-Kit en cáncer de mama. Tinción Inmunohistoquímica. Carcinoma adenoide quístico (izquierda) y Adenocarcinoma polimorfo (derecha). Modificado de (Reyes, Jorda, & Gomez-Fernandez, 2013).

Como se mencionó anteriormente y debido a la alta prevalencia de la desregulación de este receptor y otros RTKs en diversas neoplasias, se han desarrollado inhibidores selectivos de la actividad de cinasa de tirosina. Muchos de estos fármacos se encuentran en pruebas o incluso ya se usan en la práctica clínica. Entre los inhibidores de este tipo de receptores se encuentran moléculas pequeñas que compiten con el ATP por el sitio activo del receptor, uno de estos fármacos es el Imatinib, el cual se usa para tratar ciertos tipos de leucemias y GISTs. Otros inhibidores de RTKs son: Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib, Ponatinib, Erlotinib, Lapatinib, Sorafenib, Sunitinib, Regorafenib, Crizotinib, entre otros (Matthews & Gerritsen, 2015; Szalek et al., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama triple negativo es un problema de salud tanto a nivel mundial como en la población mexicana que se presenta principalmente en mujeres jóvenes. La única terapia disponible actualmente para este padecimiento es a base de quimioterapia, la cual muestra reacciones adversas importantes, además de que no es efectiva en un alto porcentaje de casos, debido a la generación de resistencia. Por ello es necesario caracterizar marcadores moleculares involucrados en la progresión y metástasis de esta enfermedad que puedan ser considerados como blancos para terapias dirigidas.

El receptor c-Kit se ha asociado a la migración, proliferación y sobrevivencia de diversos linajes celulares, se ha visto involucrado en diversas patologías entre ellas algunas leucemias, tumores gastrointestinales y otros tipos de cáncer, y, además existen actualmente terapias dirigidas hacia los RTKs, incluyendo a c-Kit, en dichas patologías. Sin embargo, el papel que juega este receptor en cáncer de mama, en específico, en subtipos de triple negativo aún se desconoce. Debido a que se ha detectado la alta expresión de c-Kit en un subtipo particular de cáncer de mama triple negativo con peor pronóstico; es importante estudiar el papel que juega este receptor en los mecanismos que llevan a la metástasis.

Es por ello que el presente trabajo se plantea estudiar la expresión de c-Kit en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, determinar si su activación participa en procesos involucrados con el desarrollo de metástasis, y si su inhibición con fármacos dirigidos puede reducir el potencial metastásico de dichas células.

4. HIPÓTESIS

La presencia del receptor c-Kit y su activación por unión a su ligando incrementará de manera diferencial las respuestas celulares de proliferación, migración y crecimiento independiente de anclaje en las diferentes líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar *in-vitro* el efecto de la estimulación de c-Kit con su ligando SCF en procesos celulares asociados al desarrollo de metástasis en células de carcinoma mamario triple negativo.

5.1 Objetivos particulares

- Evaluar la presencia del receptor c-Kit en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo DU4475, MDA-MB-468, HCC70, HCC1937 Y HCC1806 por RT-PCR, *western blot* y citometría de flujo.
- Determinar si existen cambios en la viabilidad celular como consecuencia de la administración de concentraciones crecientes de SCF.
- Estudiar el efecto de la adición de concentraciones crecientes del ligando del receptor c-Kit en la migración de células de cáncer de mama triple negativo.
- Analizar si existen cambios en el crecimiento independiente de anclaje de células de cáncer de mama triple negativo al adicionar el ligando del receptor c-Kit.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares DU4475 (ATCC® HTB-123™), MDA-MB-468 (ATCC® HTB-132™), HCC70 (ATCC® CRL-2315™), HCC1937 (ATCC® CRL-2336™) y HCC1806 (ATCC® CRL-2335™). Estas cinco líneas celulares se encuentran catalogadas en el panel 1 de cáncer de mama triple negativo con morfología tipo basal (ATCC® TCP-1001™) y fueron adquiridas de la *American Type Culture Collection* (ATCC®).

Estas líneas celulares son representativas de distintas etapas del cáncer de mama. Las líneas DU4475 y MDA-MB-468 son derivadas de sitios metastásicos y las tres líneas celulares restantes pertenecen a tumores primarios en la glándula mamaria. La línea HCC70 corresponde a una etapa IIIA, grado 3; HCC1937 pertenece a una etapa IIB, grado 2; y, por último, HCC1806 pertenece a una etapa IIB, grado 2. Las líneas celulares muestran un crecimiento *in vitro* de características adherentes, a excepción de la línea DU4475, la cual crece en agregados multicelulares en suspensión (tabla 1).



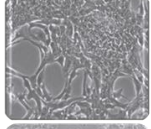
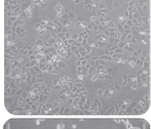
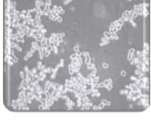
Línea celular	Estadio clínico	Histología	Tejido de origen	Propiedades de crecimiento	Medio de cultivo	Micrografía 10x
HCC1806	IIB – grado 2 Etapa temprana	Carcinoma de células escamosas acantolítico	Epitelial	Adherente	RPMI 10% SFB	
HCC1937	IIB – grado 3 Etapa temprana	Carcinoma ductal	Epitelial	Adherente	RPMI 10% SFB	
HCC70	IIIA – grado 3 Etapa intermedia	Carcinoma ductal	Epitelial	Adherente	RPMI 10% SFB	
MDA-MB-468	Metástasis	Carcinoma ductal	Epitelial	Adherente	RPMI 10% SFB	
DU4475	Metástasis	Carcinoma ductal	Epitelial	Suspensión, agregados multicelulares	RPMI 10% SFB	

Tabla 1. Líneas celulares de cáncer de mama triple negativo utilizadas en este trabajo y sus principales características.

6.1.1 Cultivo celular

En todas las líneas celulares se utilizó medio de crecimiento completo RPMI-1640 (Invitro) suplementado con suero fetal bovino inactivado (SFB) al 10% (GIBCO), y 1% de antibióticos (10.000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de antimicótico anfotericina B Fungizone®, GIBCO). El medio de cultivo se renovó cada 2 o 3 días. Todos los cultivos fueron mantenidos a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂. Para los experimentos se utilizaron cultivos al 80% de confluencia.

Para resembrar las líneas celulares MDA-MB-468, HCC70 y HCC1937 y HCC1806 se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS estéril (NaCl 137mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4) y se incubaron 5 minutos con solución de verseno estéril (EDTA 1mM, NaCl 0.17 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, pH 7.7) a 37°C 5%CO₂. Para HCC70 se utilizó Tripsina (0.25%, GIBCO). Seguido se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante, se añadió medio fresco y se resembró a una proporción de 1:4. Para realizar subcultivos de la línea DU4475, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se añadió medio fresco resembrando a una proporción de 1:4.

6.2 Expresión del receptor c-Kit

6.2.1 Análisis de la presencia de mRNA de c-Kit por RT-PCR

Extracción y cuantificación de RNA. Se extrajo el RNA total de las células con ayuda del kit *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen). En breve, se realizaron 3 lavados con PBS y se lisó con 600 µl del buffer RLT. Se recuperó el lisado con ayuda de un raspador de células de plástico. El lisado celular se homogenizó con una jeringa estéril con una aguja de 0.9mm de diámetro. Enseguida se transfirió el lisado a una columna azul *QIAshredder* y se centrifugó 2 minutos (13400 rpm) para eliminar el DNA cromosómico, el efluente se recuperó y se le añadieron 600 µl de etanol al 70%, mezclando por pipeteo.

La mezcla se transfirió a una columna *RNeasy* y se centrifugó por 15 segundos a 10000 rpm, desechando el efluente. Se realizó un lavado con 700 µl de buffer RW1, posteriormente dos lavados con 500 µl del buffer RPE y se centrifugó adicionalmente durante un minuto a 10000 rpm para eliminar residuos de etanol. Finalmente, se obtuvo el RNA añadiendo a la columna

40 µl de agua libre de RNasas, centrifugando 1 minuto a 10000 rpm. La cuantificación de la concentración (ng/µl) de RNA se realizó en el equipo *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*).

RT-PCR. Esta reacción se realizó con el kit *SuperScript One-Step RT-PCR Platinum Taq* (*Qiagen*). La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl (10 µl de buffer 5x *Qiagen*, 2 µl de dNTPs, 0.6 µM oligonucleótidos, 2 µl mix de enzimas *Qiagen OneStep RT-PCR* y 50 ng de RNA por muestra).

Para la detección del mensajero de c-Kit se utilizaron los oligonucleótidos 5'GTTGAGGCAACTGCTTATGG3' como *Forward* y el 5'GCTTCTGCATGATCTTCCTG3' como *Reverse* (Ulivi et al., 2004). Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 289pb del gen de c-Kit correspondientes a los nucleótidos 1897-2186 del mRNA. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: retro transcripción 30 minutos a 50°C, activación inicial a 95°C por 15 minutos, 40 ciclos (desnaturalización 94°C por 1 minuto, alineamiento 58°C por 1.5 minutos y extensión 72°C por 1 minuto); y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Como control de expresión se utilizó un set de primers para β-globina que amplifica una región de 268 pb (Saiki et al., 1988). Se utilizó el primer GH20 como *Forward* 5'GAAGAGCCAAGGACAGGTAC3' y el primer PC04 como *Reverse* 5'CAACTTCATCCACGTTACACC3'. El programa para la RT-PCR fue el siguiente: retro transcripción 30 minutos a 50°C, activación inicial a 95°C por 15 minutos, 30 ciclos (desnaturalización 94°C por 1 minuto, alineamiento 55°C por 2 minutos y extensión 72°C por 1 minuto); y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Electroforesis en Agarosa. Para analizar los productos de la reacción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (0.6 g de Agarosa, aforar a 30 mL con buffer SB (1 L: ácido bórico 2.25 g, NaOH 0.4 g, pH 8.5 (Brody & Kern, 2004)) con alícuotas de 3 µl de cada muestra. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL del gel) y se visualizó en un transiluminador de luz UV. Se utilizó la escalera de DNA de 100 bp de *Invitrogen* para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos en la reacción de RT-PCR.

6.2.2 Análisis de la presencia de c-Kit por *Western blot*

Extracción y cuantificación de la proteína. Se realizó la extracción de proteínas con buffer de lisis RIPA (Tris 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 1% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche*) y de fosfatasa (*Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma Aldrich*). Se incubó

durante 20 minutos en hielo con agitación constante. El lisado se centrifugó 3 minutos a 13400 rpm y se recuperó el sobrenadante. La proteína se almacenó a -20°C para su posterior análisis. La concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) se cuantificó por el método de Lowry modificado (kit *DC Protein Assay* (BIO-RAD™)), se utilizó albúmina sérica bovina como estándar para hacer la curva patrón.

Electroforesis y Western Blot. Para analizar la expresión de las proteínas de interés, se cargaron 30 μg de proteína total con buffer de carga (Tris 60mM pH 6.8, 10.5% glicerol, 10% SDS, 0.05% azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol) en un gel de SDS-poliacrilamida al 6%. La electroforesis se realizó a 110V durante 1.5 horas. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de PVDF (Millipore™) a 250mA por una 1 hora. En seguida, la membrana se bloqueó a temperatura ambiente durante 2 horas y en agitación constante con buffer de bloqueo (leche sin grasa al 5% en TBS-T (1L: 2.4 g Trizma HCl, 8 g NaCl, 1 mL tween20, pH 7.6)).

La membrana se incubó con los anticuerpos primarios de interés toda la noche a 4°C con agitación constante, en buffer de bloqueo. Los anticuerpos secundarios se incubaron 2 horas a temperatura ambiente en buffer de bloqueo con agitación constante. En su caso, las condiciones de incubación con estreptavidina fueron las mismas que los anticuerpos secundarios. Posterior a cada incubación se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: para c-Kit (Ab81 Mouse mAb #3308, CellSignalling) 1:1000. Secundario Biotinilado (Dako) 1:2000 y posteriormente Estreptavidina/HRP 1:3000. Para GAPDH, que se incluyó como un control de carga, se utilizó el anticuerpo Rb-GTX-100118, 1:30000, secundario anti-Rb IgG/HRP (sc-2004, 1:20000). Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia con Inmobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore).

6.2.3 Análisis de la presencia de c-Kit por citometría de flujo

Las células se lavaron dos veces con PBS y se recolectaron 1×10^6 células. Enseguida se fijaron (PBS, 0.1% Azida de sodio, 1% paraformaldehído) durante 15 minutos en hielo. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con buffer de tinción (PBS, 0.1% azida de sodio, 0.5% BSA). Se añadieron 90 μl de buffer de tinción para resuspender las células y se agregó el anticuerpo para c-Kit acoplado a ficoeritrina (RD Systems FAB332P).

Las muestras se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron dos lavados más y se resuspendió en 500 µl de buffer de tinción. Las muestras se colocaron en hielo y oscuridad hasta su lectura. Como control negativo se utilizaron células con el mismo tratamiento sin la tinción (sin anticuerpo hacia c-Kit). Se utilizó el citómetro de flujo *FACS Calibur BD, Biosciences*. El programa utilizado para analizar los datos fue *BD FacStation*. El porcentaje de células positivas a c-Kit se determinó con base en el número de eventos positivos de la muestra menos los eventos positivos del control negativo y se dividió entre el total de eventos por lectura del citómetro (10000 eventos).

6.3 Ensayos de viabilidad celular

Ensayo de MTT. Este ensayo se basa en la reducción del tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol) a cristales de formazan por la succinato-deshidrogenasa. En condiciones óptimas de cultivo, la cantidad de formazan producido es directamente proporcional al número de células viables.

En breve, se sembraron 5000 células por pozo en placas de 96 pozos con un volumen final de medio completo de 200 µl. Las células fueron estimuladas con diferentes concentraciones de SCF (0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml, Preprotech) y se incubaron por 24, 48, 72 y 96 horas. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se retiró el medio del pozo, posteriormente se añadieron 100 µl de medio fresco a cada pozo y 50 µl de solución de MTT (2.4mM en PBS). Se incubó a 37°C 5% CO₂ por 2 horas. Pasado el tiempo, se retiró el medio y se resuspendieron los cristales de formazan en 150 µl de isopropanol. Se midió la absorbancia del compuesto a 570nm en el espectrofotómetro *BioTek ELx800*.

Para la línea DU4475, se resuspendieron las células en cada pozo y se traspasaron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, se centrifugó 5 minutos a 3 000 rpm, se descartó el sobrenadante. Posteriormente se añadieron 100 µl de medio fresco a cada tubo y 50 µl de solución de MTT (2.4mM en PBS), se resuspendió. Se incubó a 37°C 5% CO₂ por 2 horas. Una vez completada la incubación se centrifugó por 3 minutos a 6 000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió con 150 µl de isopropanol, enseguida se centrifugó de nuevo 3 minutos a 6 000 rpm y el sobrenadante se traspasó a placas de 96 pozos en donde se midió la absorbancia del compuesto a 570nm en el espectrofotómetro *BioTek ELx800*.

Los porcentajes de células viables se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF (Control) y se evaluó la significancia

estadística de esta con las lecturas obtenidas en las muestras evaluadas para cada tiempo en cada línea celular.

6.4 Análisis de la migración celular en respuesta al ligando de c-Kit

La migración celular utilizando como quimioatrayente el ligando de c-kit, SCF, se midió con el kit *QCM™ 24 Well Colorimetric Cell Migration Assay (Millipore)*, basado en el principio de Boyden, en el que las células en ayuno deben atravesar una membrana porosa hacia un compartimiento con una concentración definida del quimioatrayente a evaluar. Los insertos utilizados contenían una membrana de PET con poros de 8 µm de diámetro (*BD Falcon™*) y se colocaron en placas de 24 pozos. Para el ensayo, se utilizó un cultivo celular el cual se mantuvo en ayuno durante 4 horas (Medio sin SFB).

Las células se lavaron 1 vez con solución quelante (50 ml: 2.5 g albúmina sérica bovina, 12.32 mg MgSO₄·7H₂O, medio RPMI-1640 sin SFB) y se resuspendieron en RPMI sin SFB a una concentración de 1x10⁶ células/ml. En la cámara de Boyden, en el inserto se sembraron 300000 células. En la parte inferior de la cámara se añadieron 500 µl de medio con la concentración deseada del quimioatrayente. Se utilizó SCF a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml; como control negativo a la migración se utilizó medio sin suero ni SCF, y, como control positivo de migración se utilizó medio suplementado con 10% de SFB. La placa se incubó a 37°C 5% CO₂ durante 24 horas.

Para evaluar la migración celular, se agregó a un pozo nuevo 400 µl de colorante *Cell Stein* del kit y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se limpió la parte interna del inserto que contenía a las células no migratorias con un hisopo de algodón, retirando a su vez el exceso de colorante con agua destilada. El inserto se colocó en un pozo nuevo con 200 µl del buffer de extracción del Kit y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se tomaron 100 µl y se midió la absorbancia a 570nm. Los porcentajes de migración se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF ni SFB (Control negativo a migración) y se evaluó la significancia estadística de esta con las lecturas obtenidas en las muestras evaluadas para cada condición en cada línea celular.

6.5 Ensayos de crecimiento independiente de anclaje

Para monitorear el crecimiento independiente de anclaje y transformación celular, se utilizó el kit *CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay (CBA-135, Cell Biolabs, Inc.)* basado en la formación de colonias en agar suave. En este ensayo las células crecen aisladas en un medio semisólido adverso, en el que para sobrevivir y formar colonias, las células deben mostrar un fenotipo transformante, el cual está asociado con la agresividad de las células tumorales (Mori et al., 2009). El procedimiento se realizó de acuerdo a las condiciones del fabricante.

En breve, en placas de 96 pozos, se colocó una capa base de agar, sobre la que se añadieron 5000 células en una suspensión de medio completo con la matriz de agar. Enseguida se añadió medio de cultivo con SCF a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml, además de un pozo con medio sin SCF como control negativo. La placa se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 7 días. Para cuantificar la formación de colonias, la matriz de agar se disolvió con la solución solubilizadora del Kit y se prosiguió a una cuantificación de la viabilidad celular por MTT con una solución provista en el kit, midiendo la absorbancia a 570nm. Los porcentajes de formación de colonias se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF (Control) y se evaluó la significancia estadística de esta con las lecturas obtenidas en las muestras evaluadas para cada concentración de SCF en cada línea celular.

6.6 Análisis estadístico de los datos

Los resultados de los ensayos de proliferación, migración y crecimiento independiente de anclaje fueron normalizados respecto al control sin tratamiento como 100%. Para los ensayos de proliferación y crecimiento independiente de anclaje se muestra el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. En los ensayos de migración celular se muestran el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las diferencias significativas entre las condiciones de los ensayos se analizaron mediante una ANOVA de una vía y se realizó una prueba *post hoc* de Dunnet para comparar todos los tratamientos con respecto al control, y fueron consideradas cuando $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa *Graph Pad Prism 6*.

7. RESULTADOS

7.1 El receptor c-Kit en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo

Para analizar la presencia del receptor c-Kit en las líneas celulares propuestas de cáncer de mama triple negativo, se analizó la presencia de su mRNA mediante RT-PCR. Como control positivo de la presencia del mRNA del receptor se utilizó RNA extraído de la línea celular K562 derivada de una leucemia mieloide crónica, ya que en estudios previos del grupo de trabajo se ha utilizado como control positivo a la presencia del receptor c-Kit (Jiménez Sánchez, 2014).

El fragmento amplificado es de un tamaño de 289 pb, indicando la presencia del transcrito para c-Kit. Al realizar el RT-PCR en las cinco líneas celulares de CMTN y la línea control K562 se observó la presencia del transcrito de c-Kit, en otro gel la amplificación de un fragmento de 268 pb correspondiente al transcrito de β -Globina se utilizó como control interno (figura 7A).

Después de haber comprobado la presencia del transcrito de c-Kit, se analizó la presencia de la proteína por medio de *Western blot* en extractos totales de proteína. En estas determinaciones se observó que la proteína c-Kit se encuentra presente en las 5 líneas de cáncer de mama con un peso molecular esperado de 145 kDa (figura 7B).

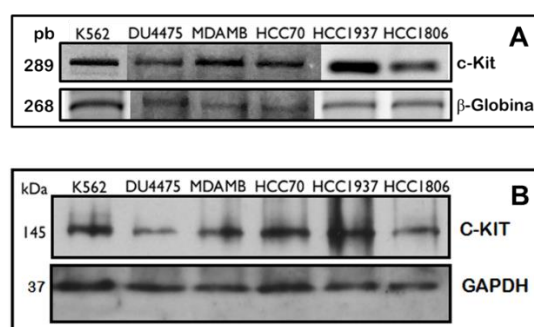


Figura 7. c-Kit en líneas celulares de CMTN. A) RT-PCR para una región del transcrito de c-Kit de 289 pb, el cual se observa en todas las líneas celulares, en la franja inferior se observa un fragmento de 268 pb el cual corresponde a un fragmento del gen de β -Globina utilizado como control interno. B) Western blot de extractos totales de proteína en el que se observa la presencia de la proteína c-Kit en las cinco líneas celulares de TNBC y en K562, se observa además GAPDH como control de carga.

Después de corroborar la proteína c-Kit en extractos totales, se analizó su presencia en la membrana citoplasmática por citometría de flujo, procedimiento que se realizó sin llevar a cabo una permeabilización de las células. Estos análisis nos llevaron a conocer la proporción de células de la población total que muestra a el receptor c-Kit en la membrana.

El porcentaje de células que presentó a c-kit en la membrana citoplasmática corresponde al 0.93% en la línea DU4475, 86.96% en MDA-MB-468, 88.92% en HCC70, 72.13% en HCC1937 y, por último, un 43.17% en HCC1806, con este análisis se infiere que la presencia del receptor c-Kit en la membrana citoplasmática se da de un modo cuantitativamente diferencial en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (figura 8).

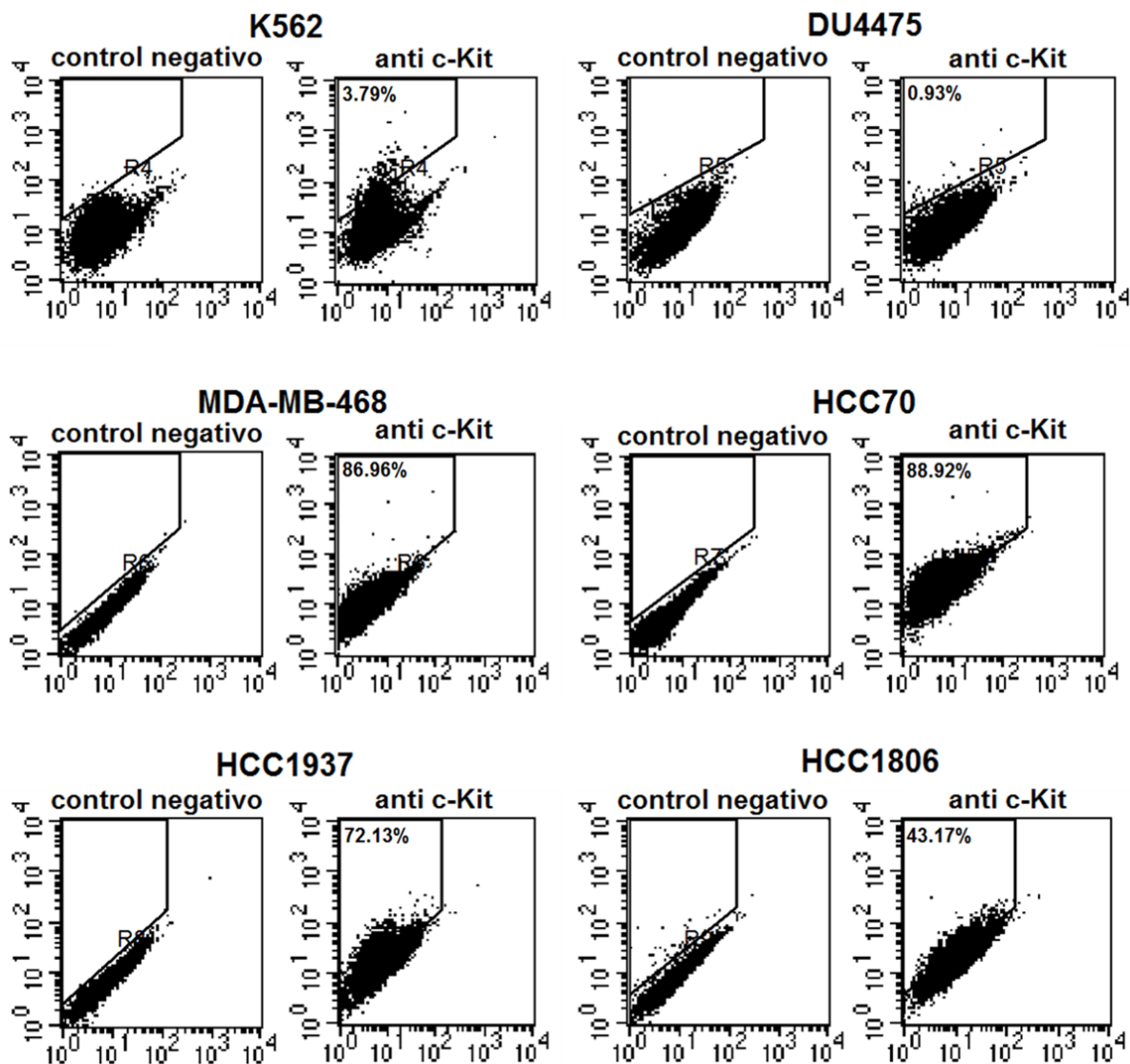


Figura 8. Dot plots de c-Kit en la membrana plasmática de las cinco líneas CMTN. Para cada línea celular, el control negativo corresponde a células sin tinción y la gráfica de la derecha corresponde a células con el anticuerpo acoplado a ficoeritrina anti-c-Kit. El porcentaje celular que expresa a el receptor se determinó en base al número de eventos positivos entre el total de eventos medidos.

Debido a el porcentaje de células positivas a c-Kit de 0.93% de la línea DU4475, esta línea celular se utilizó en los ensayos posteriores como comparativo en la respuesta a los distintos fenómenos celulares como viabilidad, migración y crecimiento independiente de anclaje ya que representa un modelo de cáncer de mama triple negativo que no tiene al receptor c-Kit en la membrana celular.

7.2 Efecto de la estimulación de c-kit en la viabilidad celular de líneas de CMTN

Posterior a la determinación de la presencia del receptor c-Kit en las diferentes líneas estudiadas de CMTN, se decidió determinar si la estimulación de c-Kit con SCF tendría algún efecto en la viabilidad celular, para ello se adicionó SCF a concentraciones de 0 (como control negativo al tratamiento), 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml. La viabilidad celular se analizó a las 24, 48, 72 y 96 horas con ensayos de MTT.

En los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad por MTT, el aumento de la concentración de SCF, así como los tiempos evaluados de 24, 48, 72 y 96 horas, no mostraron cambios estadísticamente significativos en la viabilidad en ninguna de las líneas celulares evaluadas, ni siquiera en la concentración más alta utilizada de SCF que fue de 100 ng/ml independientemente del porcentaje de células con c-Kit exportado a membrana correspondiente a cada línea celular (figuras 9-13).

Estos resultados sugieren que no existen cambios en la viabilidad celular al adicionar SCF a las líneas de cáncer de mama triple negativo, sin embargo no conocemos si se activó el receptor, o si las células no respondieron al SCF debido a las condiciones óptimas de crecimiento en las que se encontraban, sin una limitación del SFB en el medio de cultivo al momento de realizar la incubación con el SCF.

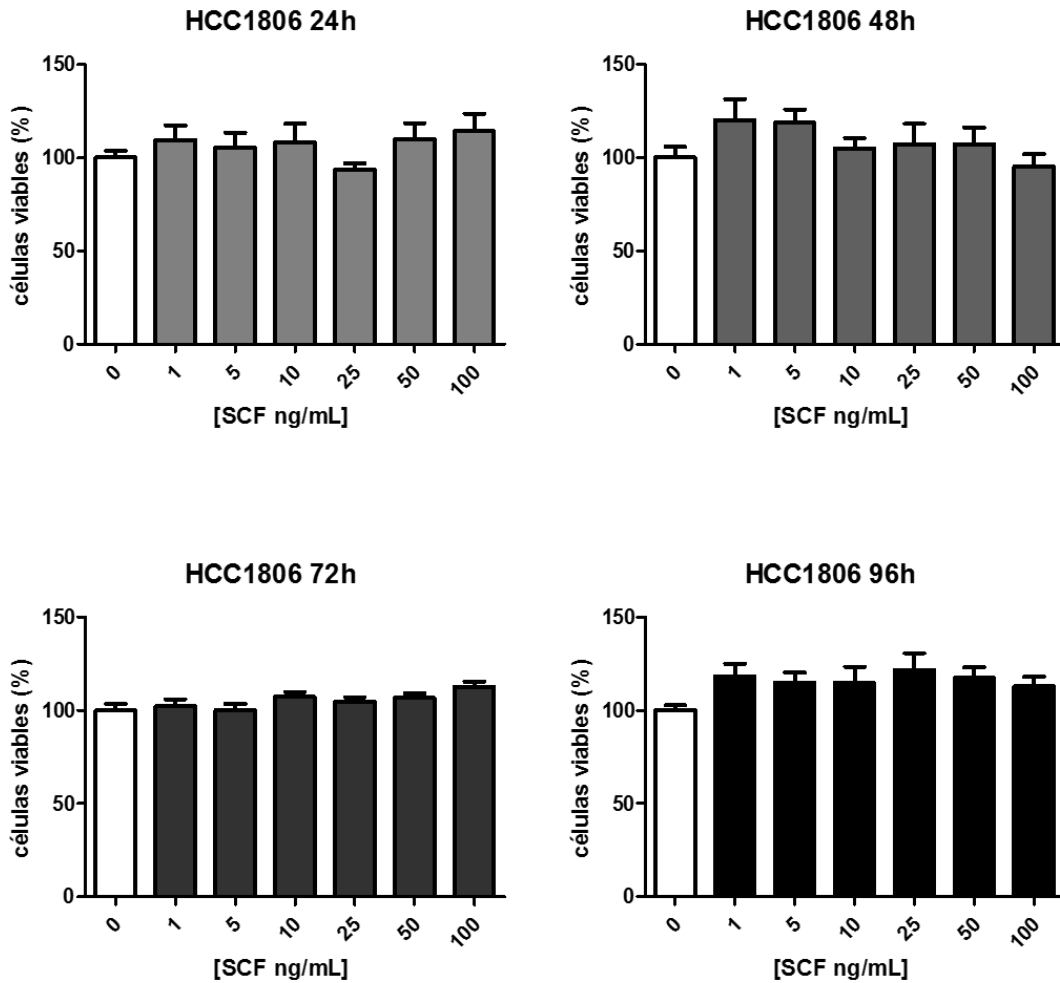


Figura 9. Porcentaje de células viables de la línea HCC1806. Se sembraron 5000 células por pozo y se añadió SCF a concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml. Se realizó un ensayo de MTT a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la adición de SCF, no se observó cambio estadísticamente significativo a ninguna concentración de SCF o tiempo evaluado. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado, los porcentajes de proliferación se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF (Columna blanca) y se evaluó la significancia estadística de esta con las lecturas obtenidas para cada concentración de SCF, los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$.

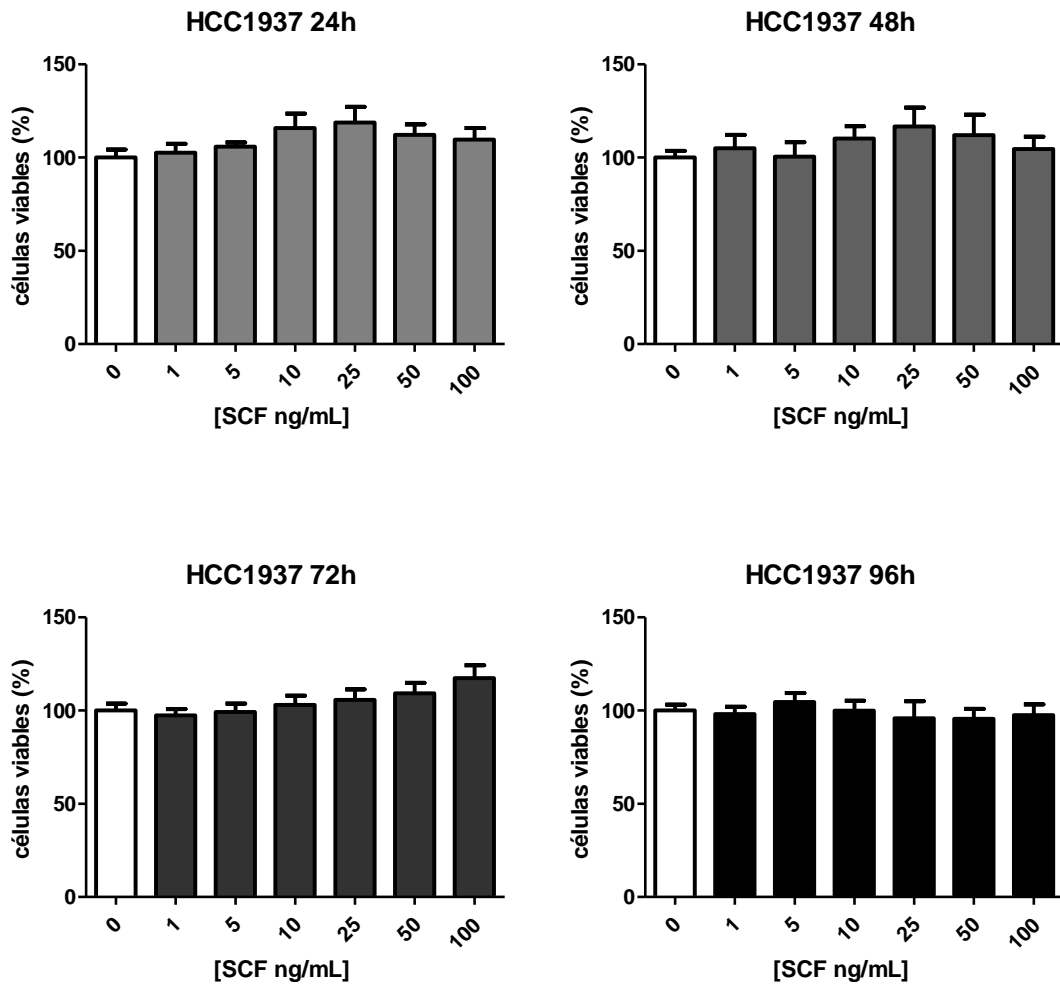


Figura 10. Porcentaje de células viables de la línea HCC1937. Se sembraron 5000 células por pozo y se añadió SCF a concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml. Se realizó un ensayo de MTT a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la adición de SCF, no se observó cambio estadísticamente significativo a ninguna concentración de SCF o tiempo evaluado. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado, los porcentajes de proliferación se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF (Columna blanca) y se evaluó la significancia estadística de esta con las lecturas obtenidas para cada concentración de SCF, los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$.

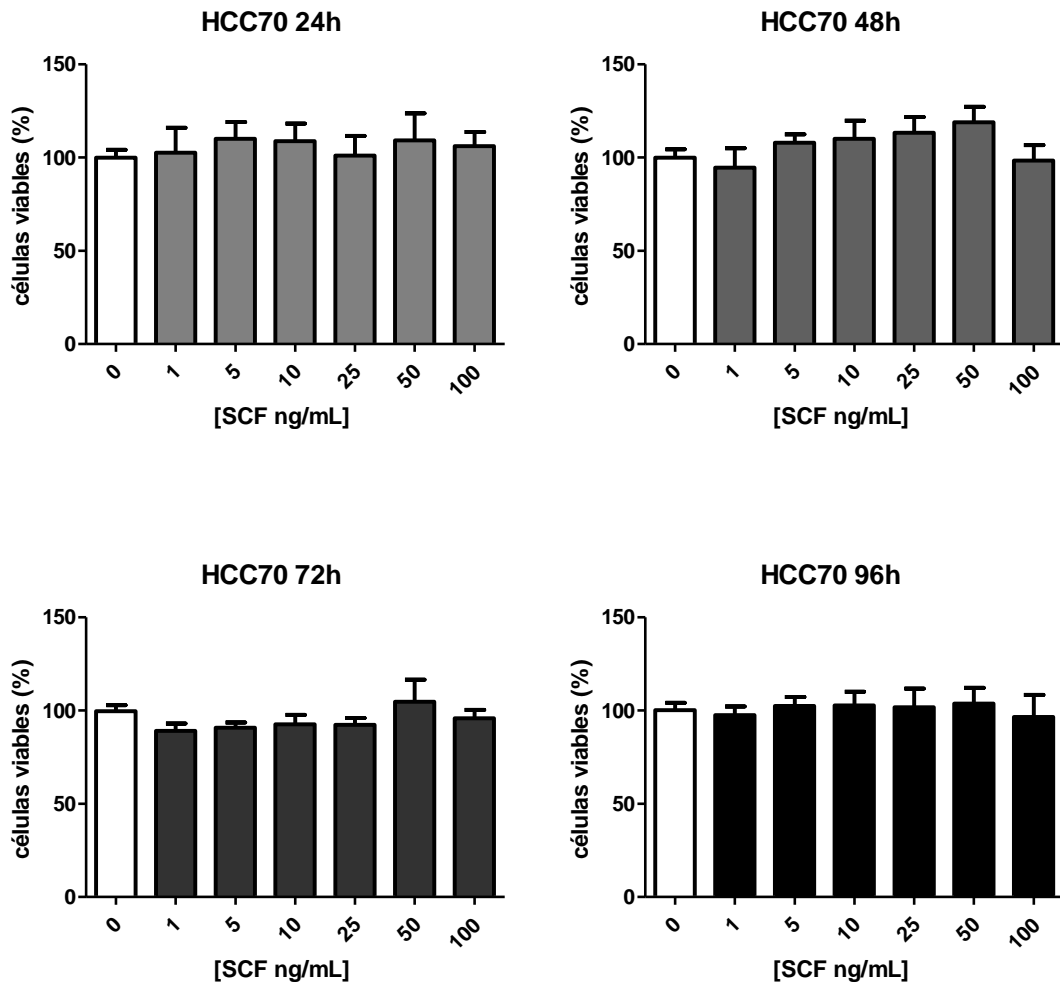


Figura 11. Porcentaje de células viables de la línea HCC70. Se sembraron 5000 células por pozo y se añadió SCF a concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml. Se realizó un ensayo de MTT a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la adición de SCF, no se observó cambio estadísticamente significativo a ninguna concentración de SCF o tiempo evaluado. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado, los porcentajes de proliferación se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF (Columna blanca) y se evaluó la significancia estadística de esta con las lecturas obtenidas para cada concentración de SCF, los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$.

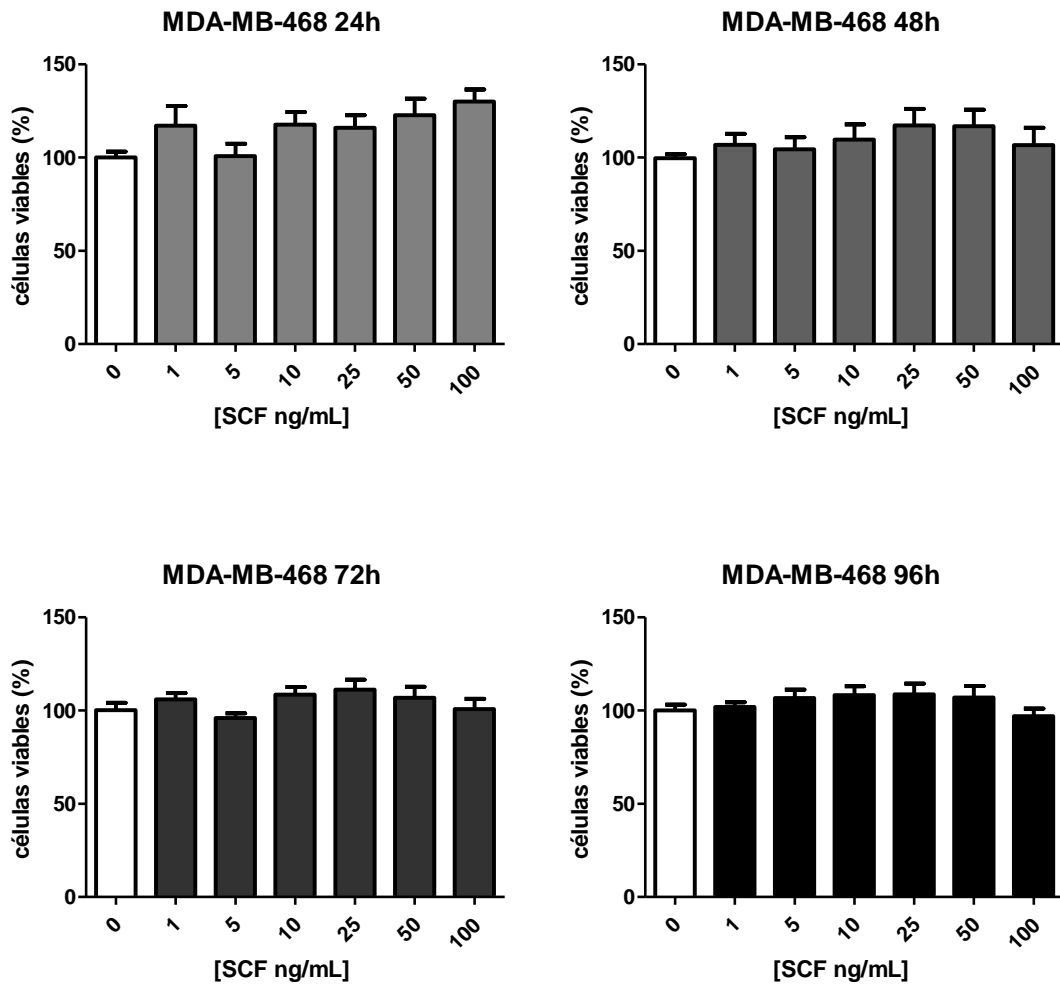


Figura 12. Porcentaje de células viables de la línea MDA-MB-468. Se sembraron 5000 células por pozo y se añadió SCF a concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml. Se realizó un ensayo de MTT a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la adición de SCF, no se observó cambio estadísticamente significativo a ninguna concentración de SCF o tiempo evaluado. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado, los porcentajes de proliferación se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF (Columna blanca) y se evaluó la significancia estadística de esta con las lecturas obtenidas para cada concentración de SCF, los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$.

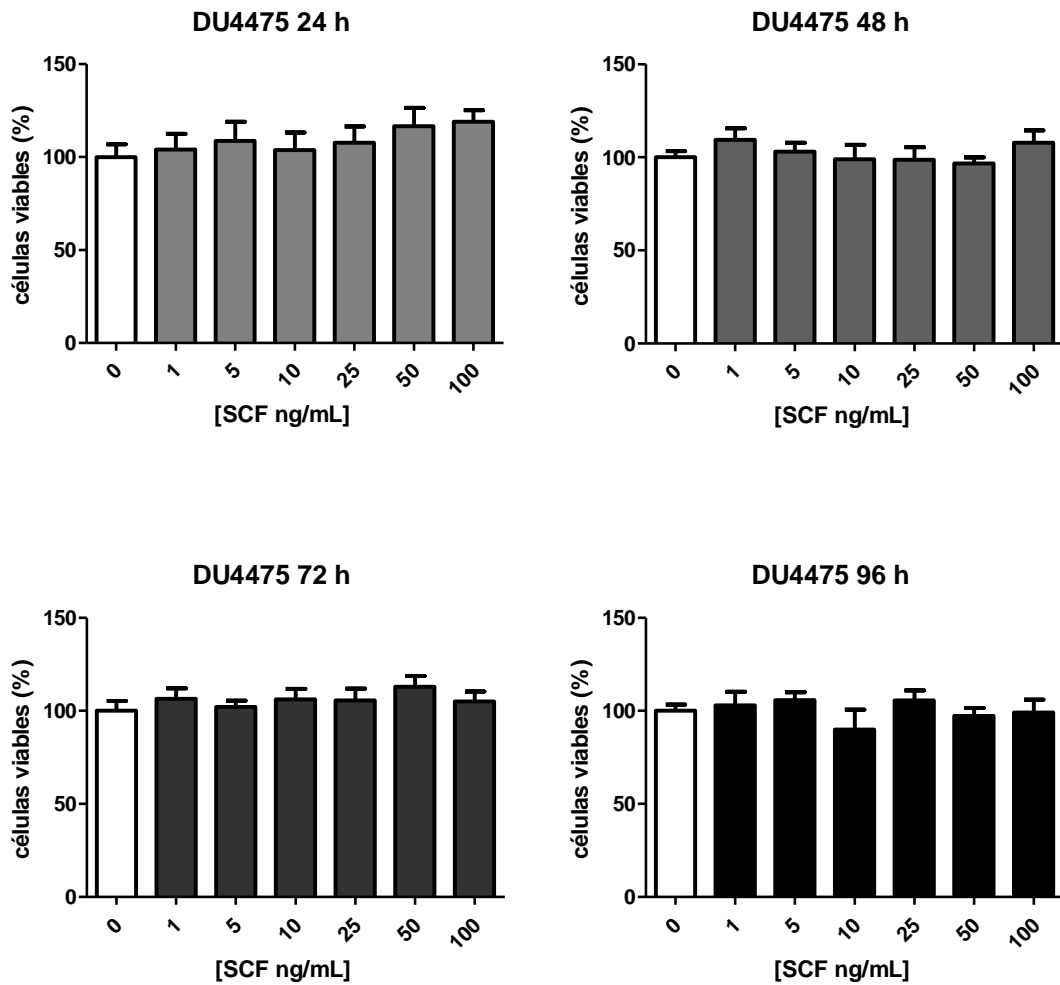


Figura 13. Porcentaje de células viables de la línea DU4475. Se sembraron 5000 células por pozo y se añadió SCF a concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/ml. Se realizó un ensayo de MTT a las 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la adición de SCF, no se observó cambio estadísticamente significativo a ninguna concentración de SCF o tiempo evaluado. Las gráficas representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado, los porcentajes de proliferación se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF (Columna blanca) y se evaluó la significancia estadística de esta con las lecturas obtenidas para cada concentración de SCF, los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$.

7.3 Efecto del SCF sobre la migración celular

El SCF es ampliamente identificado como un promotor de la migración celular, y los estudios se extienden tanto a condiciones fisiológicas como es el caso de la migración de los progenitores de los linajes hematopoyéticos; así como a contextos fisiopatológicos de diversos tipos de cáncer. Teniendo en cuenta que las líneas celulares utilizadas en este trabajo presentan en membrana al receptor c-Kit en diferentes proporciones, se prosiguió a evaluar el efecto que tiene el SCF como quimio-atrayente y la activación del receptor c-Kit en el incremento de la capacidad migratoria de estas líneas celulares.

Para evaluar esta característica celular se realizaron ensayos *in vitro* basados en el principio de la cámara de Boyden en el que las células deben de mostrar cambios en la dinámica del citoesqueleto y otras respuestas celulares para poder desplazarse por los poros de una membrana de PET. Para tal efecto, se examinó la respuesta a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF, el control negativo para este ensayo fue medio fresco sin ningún tipo de suplemento ni quimio atrayente, y como control positivo a la migración se utilizó RPMI suplementado con SFB al 10%, el cual contiene diversos nutrientes que lo convierten en un quimio-atrayente por excelencia para cualquier tipo celular.

La línea metastásica DU4475 (en la que menos del 1% de la población presentaba c-Kit en la membrana) no mostró efecto migratorio alguno en respuesta a las dosis crecientes del SCF. Y, aunque la migración celular de estas células hacia el SFB no fue tan exacerbada como en otras líneas celulares, el control positivo resultó en una migración celular del 25.33% mayor en comparación con las células sin quimio-atrayente (figura 14a).

En el caso de la línea metastásica MDA-MB-468, la cual mostró en la citometría la presencia de c-Kit en una alta proporción de la población (86.96%), no se observó migración celular en respuesta al SCF, por lo que el alto porcentaje de c-Kit en membrana no se correlacionó con una respuesta activa de migración celular (figura 14b). La capacidad intrínseca de migrar fue de 193% (figura 14b, columna SFB 10%), sugiriendo que los mecanismos involucrados en la migración se encuentran regulados por la activación de estímulos distintos al SCF.

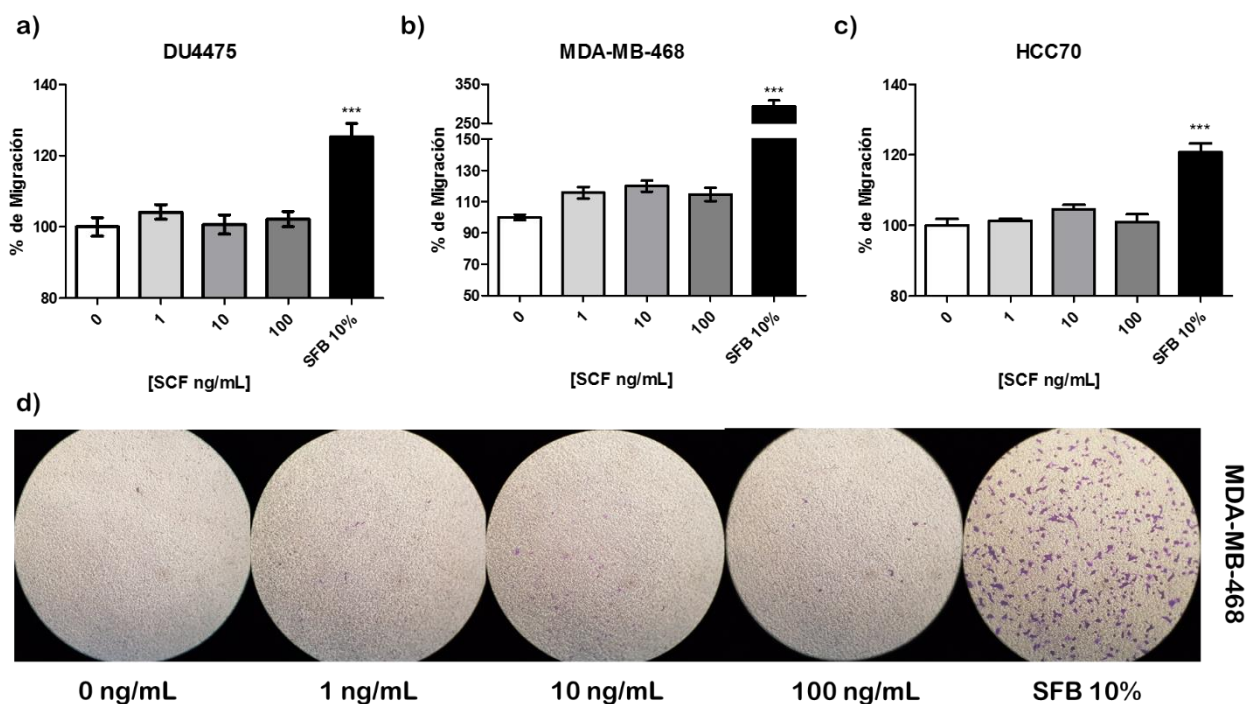


Figura 14. Efecto del SCF en la migración celular de las líneas DU4475 (a), MDA-MB-468 (b) y HCC70 (c). En ninguna de estas líneas celulares se observó migración estadísticamente significativa hacia ninguna concentración de SCF. En d se muestran microfotografías representativas de las membranas de la cámara de Boyden en las que se observan las células MDA-MB-468 que migraron hacia el SFB, teñidas con cristal violeta, mientras que, en las concentraciones de 0, 1, 10 y 100 ng/ml de SCF no se observan células en la membrana de PET. Los porcentajes de migración se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF ni SFB (Control negativo a migración) y representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Los porcentajes fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$, $***p < 0.001$.

En la línea celular correspondiente a una etapa intermedia de TNBC, HCC70, los datos observados indicaron que el SCF a concentraciones de 1, 10 o 100 ng/ml no son suficientes para fomentar la migración en un tiempo de 24 horas (figura 14c).

En líneas celulares correspondientes a etapas tempranas del carcinoma mamario, sí se observó migración celular en respuesta a SCF, a diferencia de lo observado en líneas representativas de etapas más avanzadas o metastásicas.

La línea de etapa temprana HCC1806 mostró un incremento estadísticamente significativo del 17% en la migración celular en la concentración de 100ng/ml de SCF. En concentraciones más bajas de SCF, 1 y 10 ng/ml, se observó un aumento en la migración celular del 7% y del 12% respectivamente, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo, lo que sugiere una posible respuesta migratoria dosis dependiente hacia el SCF (figura 15a).

Por último, los resultados mostraron que la respuesta quimio-táctica de las células HCC1937 hacia el SCF fue la más amplia. Comparados con el control negativo, la migración hacia

concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF fue 20%, 22% y 28.5% mayor, respectivamente (figura 15b). La migración observada corresponde con una relación dosis dependiente hacia el SCF, al igual que en la otra línea celular de etapa temprana HCC1806.

En la Figura 15c se muestran micrografías de las membranas de la cámara de Boyden donde se puede observar en la parte superior las micrografías de las células HCC1937, mientras que en la parte inferior se observan las de las células HCC1806. Ambas líneas muestran en el control positivo con SFB una alta cantidad de células que migraron a través de los poros de la membrana de PET hacia el estímulo quimio-táctico y se encuentran teñidas con cristal violeta, mientras que en las distintas concentraciones de SCF se observa la respuesta quimiotáctica de las células hacia dicho estímulo.

Interesantemente, aunque el porcentaje poblacional de estas líneas celulares que presenta a c-Kit en membrana es de 72.13% y 43.17% para HCC1937 y HCC1806 respectivamente, los cuales son menores comparados con el porcentaje poblacional de las líneas representativas de etapas avanzadas, fueron las células que mostraron una activación en la migración celular dependiente de c-Kit.

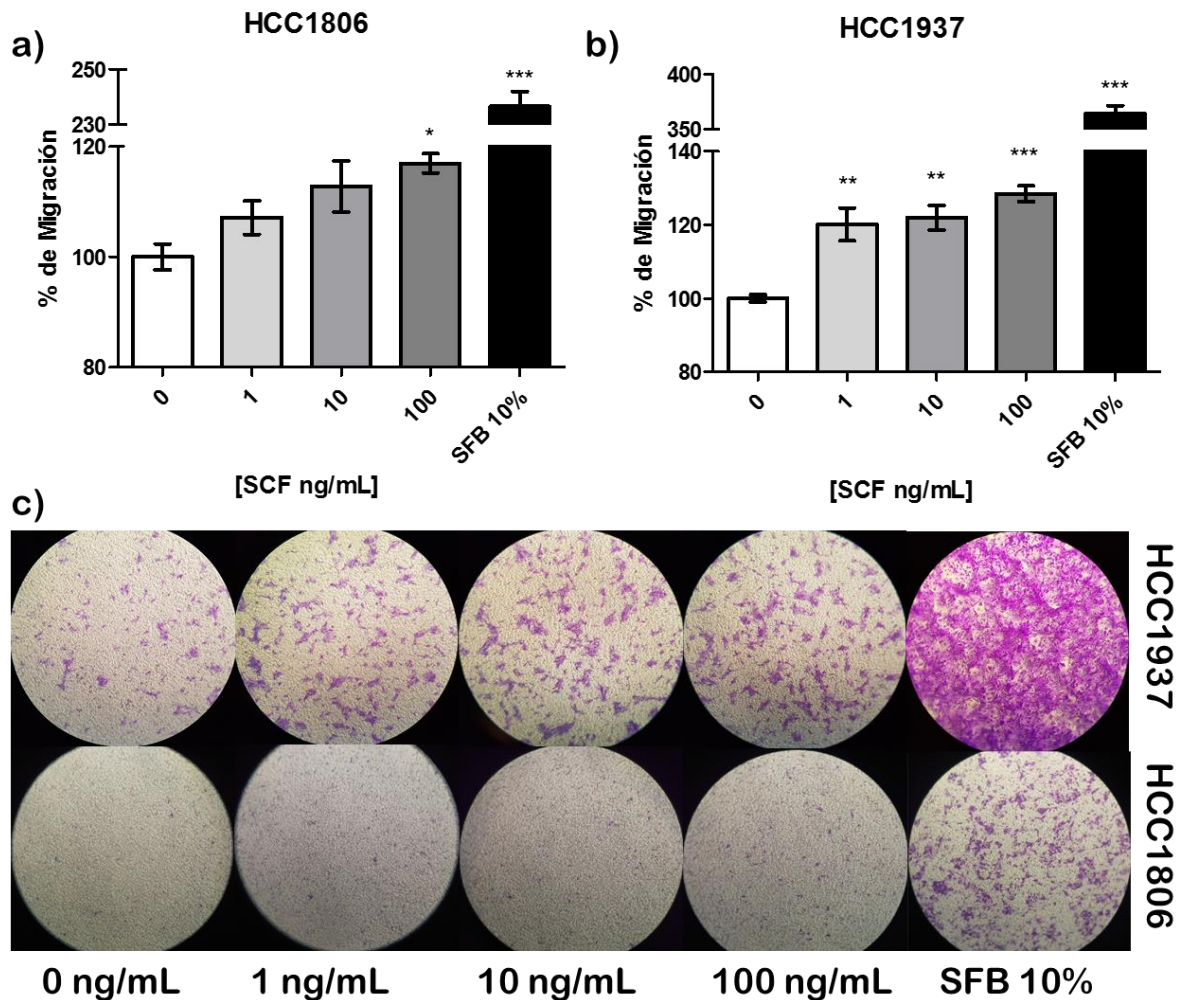


Figura 15. Efecto del SCF en la migración celular en las líneas de etapas tempranas HCC1937 y HCC1806. a) La línea celular HCC1806 mostró un aumento en la migración celular del 7%, 12% y 17% hacia concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF respectivamente. b) La línea celular HCC1937 mostró un aumento en la migración celular del 20%, 22% y 28.5% hacia concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF respectivamente. En ambas líneas celulares el patrón de migración mostró un comportamiento dosis dependiente. c) Micrográficas representativas de las membranas de PET de las cámaras de Boyden en donde se observan teñidas con cristal violeta las células que mostraron quimiotáxis hacia las distintas concentraciones de SCF o hacia el SFB. Los porcentajes de migración se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF ni SFB (Control negativo a migración) y representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Los porcentajes fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

Los resultados de los ensayos de migración sugieren que en las líneas celulares correspondientes a etapas tempranas de TNBC existe un efecto de quimiotáxis hacia el SCF de una manera dosis dependiente, mientras que en las líneas representativas de etapas tardías no se observa dicho comportamiento.

7.4 Efecto de la activación de c-kit por su ligando SCF en el crecimiento independiente de anclaje

Una de las principales características de la transformación de las células a un fenotipo maligno es precisamente el crecimiento independiente de anclaje, el cual es una característica esencial para el desarrollo de metástasis. El método tradicional para evaluar dicho fenómeno es la formación de colonias en un medio semisólido (agar suave).

En las líneas de CMTN se investigó si la activación de c-Kit por su ligando a concentraciones crecientes de 1, 10 y 100 ng/ml tenía algún efecto en la capacidad de formar colonias en un medio con agar suave, como control negativo se sembraron células a las que no se añadió SCF y los resultados se obtuvieron cuantitativamente por el método de reducción de sales de tetrazolio MTT.

En los datos obtenidos para las líneas celulares metastásicas DU4475 y MDA-MB-468 no se observaron cambios significativos en la capacidad de formación de colonias en agar suave al ser estimuladas con SCF en concentraciones crecientes comparados con el control sin tratamiento (figura 16).

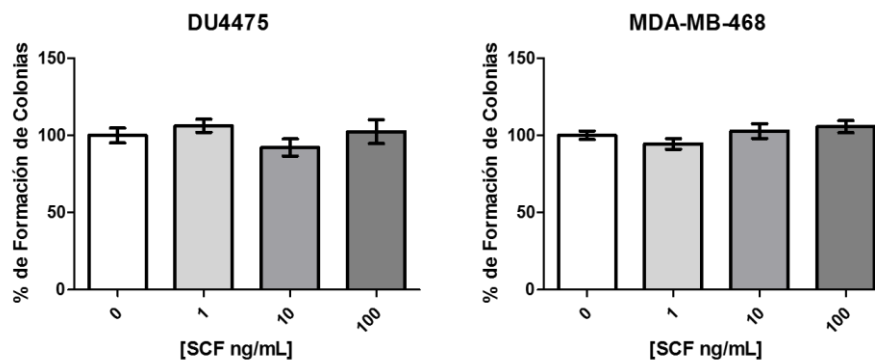


Figura 16. Formación de colonias de las líneas celulares de metástasis DU4475 y MDA-MB-468. Se añadió SCF a las concentraciones indicadas y las células se incubaron en agar suave durante siete días, sin embargo, no se observaron diferencias en la formación de colonias para ninguna de estas dos líneas celulares en ninguno de los tratamientos. Los porcentajes de formación de colonias se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF ni SFB (Control negativo, columna blanca) y representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Los porcentajes fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$.

Por otro lado, en la línea de etapa intermedia HCC70, y en las líneas de etapas tempranas HCC1937 y HCC1806 sí se observó una tendencia que sugiere un incremento en la capacidad de formar colonias en agar suave de una manera dosis dependiente al estímulo de SCF.

En la línea HCC70 se observó una diferencia estadísticamente significativa a las concentraciones de 10 y 100ng/ml de SCF con un incremento en la formación de colonias del 18% y 21.88% en comparación con el control sin tratamiento. En la concentración de 1 ng/ml de SCF se observó un incremento del 9%, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo (figura 17a).

En HCC1937, la adición del ligando de c-kit se tradujo en un incremento en la formación de colonias del 15%, 39% y 41% en comparación con el control, al ser estimuladas las células con 1, 10 y 100 ng/ml de SCF respectivamente. Los datos vuelven a repetir una tendencia dosis respuesta hacia el SCF, sin embargo, las diferencias estadísticamente significativas contra el control sin tratamiento para esta línea fueron a las concentraciones de 10 y 100 ng/ml (figura 17b).

La línea celular HCC1806 mostró un incremento en la capacidad de formar colonias en agar suave de 25%, 75% y 72% con la adición de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF respectivamente comparados contra el control sin tratamiento (figura 17c).

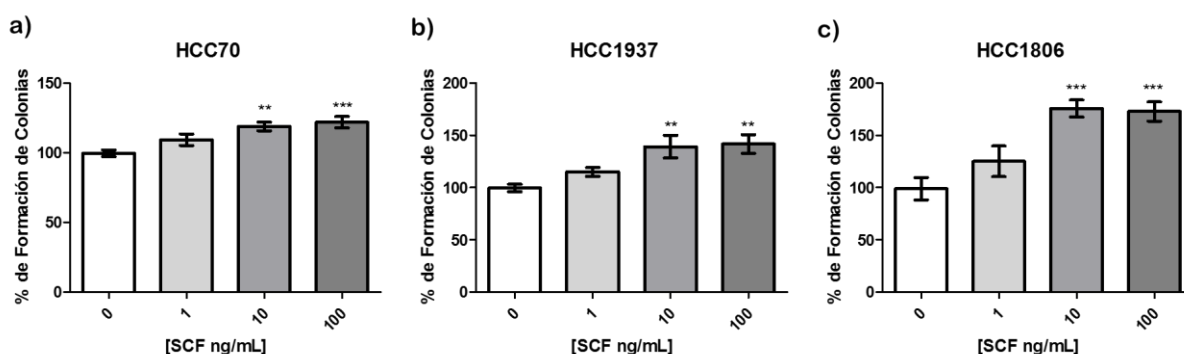


Figura 17. Formación de colonias de la línea celular de etapa intermedia HCC70 y de las líneas celulares de etapas tempranas HCC1937 y HCC1806. a) En HCC70 se observó un incremento en la formación de colonias del 9%, 18% y 21.88% a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF respectivamente. b) En HCC1937 se observó un incremento en la formación de colonias del 15%, 39% y 41% a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF respectivamente. c) En HCC1806 se observó un incremento en la formación de colonias del 25%, 75% y 72% a concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml de SCF respectivamente. En las tres líneas celulares se observó un patrón dosis dependiente a la adición de SCF. Los porcentajes de formación de colonias se obtuvieron normalizando al 100% el promedio de las lecturas de absorbancia de las células sin SCF ni SFB (Control negativo, columna blanca) y representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Los porcentajes fueron analizados con ANOVA y prueba de Dunnet $p > 0.05$, $**p < 0.01$ y $***p < 0.001$.

Finalmente, cabe recalcar que, comparando las absorbancias medidas de la formación de colonias en agar suave de las cinco líneas celulares, las líneas pertenecientes a etapas metastásicas DU4475 y MDA-MB-468 muestran intrínsecamente muy desarrollado el potencial para formar colonias, traduciéndose en un tamaño y número de colonias formadas mucho más grande. En contraste, las líneas representativas de etapas tempranas como HCC1937 y HCC1806 no presentan esta capacidad tan marcada ya que las colonias formadas eran mucho más pequeñas tanto de tamaño como de número que las formadas por las otras líneas celulares, aunque en ellas es donde la estimulación de c-Kit con su ligando incrementó de manera estadísticamente significativa la capacidad de formación de colonias (figura 18).

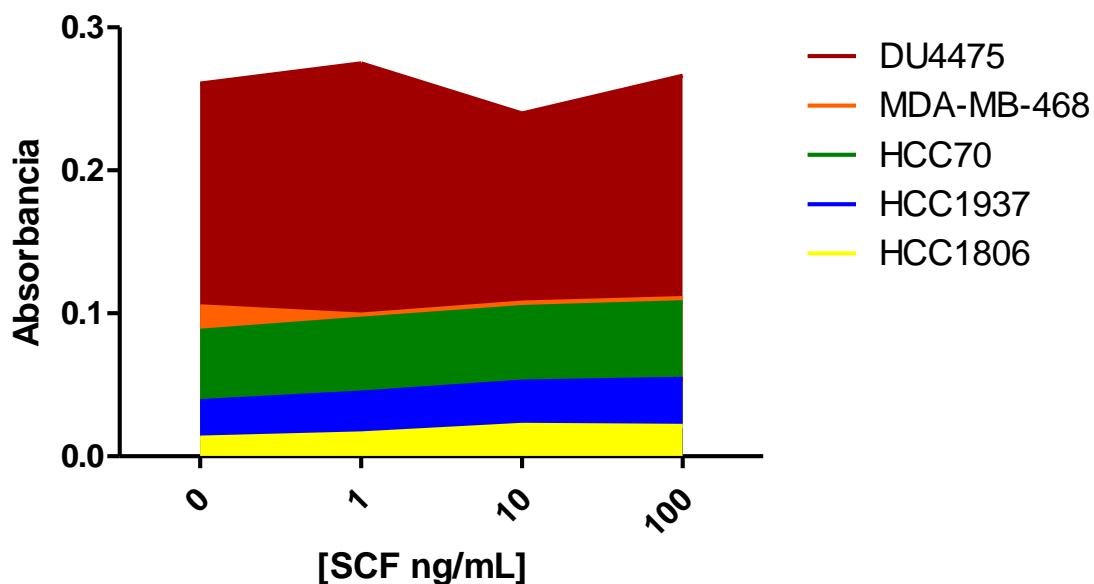


Figura 18. Absorbancia medida en los ensayos de formación de colonias en agar suave. En esta gráfica se observa una comparación entre las absorbancias de los ensayos de MTT en las diferentes líneas celulares y las distintas concentraciones de SCF. Las líneas de etapas avanzadas muestran absorbancias más altas, lo que se traduce en un mayor número de colonias formadas o en un tamaño más grande de las mismas, en comparación con las formadas por células de líneas de etapas tempranas, sin embargo, en estas últimas el potencial para formar colonias aumenta a concentraciones mayores de SCF, mientras que en las líneas de etapas tardías no se observa este comportamiento.

8. DISCUSIÓN

El estudio de los patrones de expresión de proteínas en las células cancerosas ha sido de gran ayuda para el entendimiento del cáncer y su progresión. La asociación de marcadores celulares a tipos específicos de cáncer ha ayudado a la clasificación de los mismos y al desarrollo de nuevos tratamientos. El ejemplo más claro es la presencia o ausencia de ER, PR y HER2 en cáncer de mama para indicar el tipo y el curso de la enfermedad, además de las terapias disponibles que puedan resultar más efectivas cuando se encuentra presente alguno o varios de estos receptores (Veer et al., 2002). En el caso que estén ausentes los tres receptores y se presente el denominado cáncer de mama triple negativo, da como resultado una alta heterogeneidad en el curso clínico y las alteraciones celulares asociadas a la evolución tumoral de los pacientes con este tipo de enfermedad. Otro punto importante en los triple negativos es que la información generada por los estudios de este tipo de tumores aún no ayuda a comprender totalmente el curso metastásico de esta enfermedad, por lo que impera una necesidad de hacer nuevos estudios a moléculas que generen oportunidades para el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento (Engebraaten et al., 2013).

Tomando en cuenta la necesidad de blancos terapéuticos en tumores triple negativos de la mama, en este estudio se analizó la presencia del receptor c-Kit en cinco líneas de CMTN y se analizó su posible participación en características del potencial metastásico de las células tumorales. Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se escogieron con la premisa de la subclasificación de los CMTN de Burstein y colegas en la que el subgrupo BLIS, con el peor pronóstico clínico asociado al desarrollo de metástasis, muestra una sobreexpresión del gen c-Kit. Si bien no se clasificó a las líneas celulares utilizadas en este trabajo con la firma de expresión génica que dan Burstein y colegas para el subgrupo BLIS, se utilizaron líneas celulares negativas a la presencia de los marcadores celulares de cáncer de mama ER, PR y HER2 (ubicándose en el grupo de tumores triple negativo) y que además presentan una morfología tipo basal (B. D. B. Lehmann et al., 2011), características incluyentes dentro de la descripción del subgrupo BLIS de Burstein y colegas.

El análisis de la presencia del receptor en las líneas celulares de CMTN se realizó a tres niveles: el mRNA por medio de RT-PCR, en la que se observó su presencia en las cinco líneas celulares, indicando una expresión basal de este gen (figura 7A), la proteína en extractos totales por *Western blot*, en donde se observó que las cinco líneas contenían a la proteína, sugiriendo la traducción del mensajero (figura 7B), y finalmente la presencia del receptor en la membrana celular por citometría de flujo.

En el presente trabajo se encontró que el porcentaje poblacional de la línea DU4475 positiva a c-Kit en membrana está por debajo del 1% (Figura 8), el que exista un mRNA y la proteína se encuentre presente en extractos totales de esta línea pero no se observe al receptor exportado a la membrana celular puede indicar una regulación a nivel de *splicing* alternativo, como se observa en seminomas o en tumores de etapas avanzadas de carcinoma prostático en las que se expresa frecuentemente la versión trunca del receptor (tr-Kit), la cual induce la activación de la familia de cinasas Src, a pesar de no encontrarse traslocada a la membrana por la falta de ciertos dominios protéicos (Paronetto et al., 2004). La presencia de c-kit membranal en menos del 1% de las células DU4475 hizo que esta línea se utilizara como ajena o no perteneciente al subgrupo que sobreexpresa al receptor, ya que no responde al estímulo del SCF del medio extracelular.

En cambio, las otras cuatro líneas celulares de CMTN analizadas en este estudio, el porcentaje de células con c-Kit en la membrana fue significativamente más alta, con más del 80% de células de las líneas MDA-MB468 y HCC70, y con aproximadamente el 70% y el 40% de las células de las líneas HCC1937 y HCC1806 respectivamente.

Un aspecto interesante de nuestros resultados con respecto al porcentaje poblacional de células que expresan c-Kit es el hecho de que las líneas celulares representativas de etapas tempranas, como HCC1806 y HCC1937, muestran un menor porcentaje de expresión; mientras que las líneas de una etapa intermedia HCC70, y de una etapa avanzada MDA-MB-468, el porcentaje poblacional de células c-Kit positivas es mayor (Figura 8). Esta observación es contraria a lo descrito en algunos estudios anteriores que mencionan una reducción en la expresión de c-Kit conforme progresa la transformación maligna del epitelio de la glándula mamaria (Talaiezadeh et al., 2012; Ulivi et al., 2004). Esta contradicción puede sustentarse principalmente en las metodologías empleadas y en la selección de las muestras evaluadas, ya que en los estudios mencionados se utiliza únicamente inmunohistoquímica para detectar c-Kit, y en el caso de Ulivi, se utiliza además RT-PCR con la cual se detecta la presencia del transcrito para c-Kit tanto en tejido sano como en tumores invasivos de cáncer de mama. De igual manera, Talaiezadeh y colegas y Ulivi y colegas no mencionan si los tumores evaluados muestran alguna positividad a los tres marcadores celulares ER, PR y HER2, y mucho menos los subclasifican en algún subgrupo de CMTN, lo que ya Burstein y colegas mencionan como una característica esencial para distinguir la etiología y progresión de los diferentes tipos de cáncer de mama triple negativos, sin embargo, cabe resaltar que en todos estos estudios se está de acuerdo en que la expresión de c-kit en etapas tempranas puede estar relacionado con la transformación celular en el cáncer de mama.

Los grupos de trabajo de Jansson, Kashiwagi y Kishen también han estudiado la relación de c-Kit con cáncer de mama, sin embargo, ellos sí utilizan la clasificación de los marcadores ER/PR/HER2 y separan a los tumores triple negativos de los positivos para cualquiera de estos receptores, específicamente en los CMTN han encontrado una alta presencia de expresión de c-Kit, además de otros marcadores celulares como las citoqueratinas 5/6 y EGFR, que, en conjunto, estos marcadores celulares indican un fenotipo tumoral tipo basal (Jansson et al., 2014b; Kashiwagi et al., 2013; Kishen et al., 2012). Estas observaciones apoyan a los resultados obtenidos en este trabajo que indican una alta expresión de c-Kit en las líneas de triple negativo con morfología basal MDA-MB-468, HCC70, HCC1937 y HCC1806. Con estudios posteriores en estas líneas celulares se podría analizar la expresión génica con la firma de genes propuesta por Burstein y asignarlas a un subgrupo de CMTN, con la finalidad de correlacionar los datos presentados en este trabajo de una manera más certera a el subtipo BLIS y determinar si la expresión de c-Kit puede ser utilizada como un marcador de pronóstico y posible blanco terapéutico para este subtipo tumoral.

Una vez caracterizada la expresión de c-Kit en nuestras líneas celulares se prosiguió a evaluar el efecto que presenta la activación de dicho receptor por su ligando en distintas características celulares del potencial metastásico en células de CMTN, entre ellas la viabilidad celular, la migración y el crecimiento independiente de anclaje.

En el presente estudio, la viabilidad celular se midió por medio del ensayo de MTT (figuras 9-13). En los resultados obtenidos no existe un cambio estadísticamente significativo en la viabilidad celular en ninguna de las líneas de CMTN evaluadas, independientemente de las concentraciones de SCF utilizadas para activar a c-Kit o del tiempo de exposición al factor (hasta 4 días).

En proyectos anteriores de nuestro grupo de trabajo, se había reportado en una línea celular no comercial de cáncer de mama (MBCD5) un aumento notable en la viabilidad celular a partir de las 48 horas de incubarlas con SCF a 10 ng/ml (González Jimenez, 2014), sin embargo, ellos utilizan 50 000 células por cada condición a evaluar, mientras que en nuestro trabajo se utilizaron 5000 en cada condición, lo que pudo haber reducido la sensibilidad del ensayo MTT utilizado para evaluar la viabilidad celular. Otra posible explicación es que debido a que el MTT se reduce por el complejo II mitocondrial, la succinato deshidrogenasa y el NADH, la reacción pudo verse alterada debido a la diferente actividad metabólica inherente a cada línea celular (Berridge & Tan, 1993). Para descartar esta posibilidad se podrían utilizar otros marcadores de proliferación celular como Ki-67, la cual es una proteína nuclear asociada a la proliferación celular (Schonk et al., 1989); PCNA, otra proteína nuclear involucrada en la síntesis de DNA (Matsumoto, Moriuchi, Koji, & Nakane, 1987); o un ensayo con

bromodeoxiuridina (BrdU), la cual se incorpora al DNA recién sintetizado de las células en proliferación y se puede detectar mediante una prueba de ELISA.

Los resultados de viabilidad celular observados en este trabajo muestran que no existe un efecto en la viabilidad celular en este tipo de CMTN a causa de la estimulación SCF, a diferencia de lo que se ha reportado para otros tipos de cáncer, en los que c-Kit promueve la viabilidad y proliferación celular en células troncales cancerosas de hígado (Huang, Hu, Li, Lu, & Li, 2015), en leucemia mieloide aguda (Pietsch et al., 1992), así como en el desarrollo normal y patológico de las células germinales (Rossi, 2013), en estos tipos de tumores es conocido que c-Kit potencializa la viabilidad y proliferación celular por medio de la activación de la vía de PI3K/AKT, existiendo generalmente un decremento en la actividad de p53 que conlleva al aumento de ciclina D1 actuando como un promotor del ciclo celular y llevando a la célula de la fase G1 a la fase de síntesis (Engelman, 2009; Koyasu, 2003; A. Yasuda et al., 2007).

Una aproximación que podría realizarse para corroborar nuestros resultados de viabilidad celular sería analizar si la vía PI3K/AKT se encuentra restringida, en las condiciones en las que se realizó el ensayo de MTT, en algún punto que limite la liberación de la ciclina D1 u otra molécula intermediaria involucrada en la progresión del ciclo celular; o, si bien, se encuentre activa alguna otra vía con una mayor sinergia que ocasione que la activación de c-Kit no sea suficiente para desencadenar la respuesta proliferativa en las líneas de TNBC estudiadas en este trabajo.

El hecho de que exista un control de la proliferación no descrito en células de cáncer de mama también se ha sugerido a partir de observaciones en la línea no comercial MBCD5 en nuestro equipo de trabajo, ya que en esta línea celular no se observa una sinergia en la señalización desencadenada por c-Kit y el receptor para eritropoyetina en cuanto a la proliferación celular cuando ambos receptores son estimulados de manera simultánea (González Jimenez, 2014). Este efecto es contrario a lo descrito para células troncales hematopoyéticas en los que sí se observa un efecto sinérgico al estimular estos dos receptores (Joneja, Chen, Seshasayee, Wrentmore, & Wojchowski, 1997). Lo que refuerza la sugerencia de que pueda existir algún tipo de regulación de la proliferación en las células de TNBC más fuerte que la dada por c-Kit.

Por otro lado, se sabe que la interacción del SCF con c-Kit puede inducir un efecto quimiotáctico en ciertos linajes celulares, como la quimiotaxis en células cebadas inducida por SCF, que ocurre principalmente en cuadros alérgicos y puede ser inhibida por el bloqueo del SCF por un anticuerpo (Kiener et al., 2000; Olsson, Rak, & Nilsson, 2000). En condiciones fisiológicas, el efecto quimiotáctico del SCF sobre c-Kit también se ve involucrado en la

migración de células progenitoras hematopoyéticas hacia la médula ósea (Méndez-Ferrer, Lucas, Battista, & Frenette, 2008), y de melanocitos en el desarrollo embrionario (Jeon, Kim, Kim, & Lee, 2009).

En un contexto tumoral, c-kit se ha visto relacionado con la migración de células de cáncer de páncreas (A. Yasuda et al., 2006) y colon (Bellone et al., 2001), y en trabajos previos del laboratorio demostraron la quimiotaxis hacia SCF de la línea MBCD5 de cáncer de mama (González Jimenez, 2014), por lo anterior se pensó que en las líneas celulares de CMTN evaluadas en este trabajo era posible observar algún efecto quimiotáctico hacia el SCF.

Primeramente, en los ensayos de migración en las células DU4475 no se observó migración hacia el SCF, lo que corresponde con la no expresión membranal del receptor, al igual que los datos de proliferación en los que no se observó respuesta alguna. En el caso de las líneas MDA-MB-468 y HCC70, a pesar de que un 86.96% y un 88.92% de la población celular, respectivamente, presentaban c-Kit membranal, no se observó una activación en la migración celular hacia el SCF. Sin embargo, la respuesta hacia el control positivo (SFB) fue muy evidente como se observa en la figura 14.

En el caso de las líneas HCC1937 y HCC1806, correspondientes a etapas tempranas de TNBC, es donde se observó una respuesta quimiotáctica hacia el SCF. Para la línea HCC1806 se observó a la máxima concentración de SCF utilizado un aumento en la migración del 17%, mientras que a concentraciones más bajas el efecto sobre la migración disminuyó, mostrando un patrón dosis respuesta (Figura 15a). Para HCC1937 se observó un aumento estadísticamente significativo en la migración de más del 20% repitiendo el patrón dosis respuesta (Figura 15b).

A pesar de que en los estudios de Ulivi y de Talaiezhadeh se evalúa únicamente la expresión de c-Kit en tumores mamarios y no evalúan la migración, concluyen en ambos estudios que las vías activadas por c-Kit pueden tener un papel relevante en las etapas tempranas del cáncer de mama, lo que coincide parcialmente con los resultados obtenidos en este estudio sobre la migración. A pesar de que en las líneas celulares de etapas avanzadas de este trabajo no se pierde la expresión del receptor, como mencionan Ulivi y de Talaiezhadeh, la nula respuesta migratoria puede estar involucrada con una disminución de la señalización activada por c-Kit, por lo que sería interesante analizar las principales moléculas señalizadoras que activa c-Kit bajo este estímulo y analizar las diferencias entre las vías de señalización activadas en las líneas de etapas tempranas de TNBC contra las de etapas tardías.

Se sabe que la migración celular guiada por la activación de c-Kit involucra la vía de las MAPK, por medio de p38 principalmente (Jeong, Na, Hong, & Kim, 2003), sin embargo, la

migración de las células tumorales es altamente adaptativa y los mecanismos moleculares empleados por las células para este proceso pueden estar determinados en gran medida por las propiedades químicas y físicas del estroma y la matriz extracelular, como la composición proteica y la arquitectura de la misma (Tozluoğlu et al., 2013). Debido a que la migración celular responde a todas estas propiedades externas, se han realizado muchos trabajos en modelos de dos y tres dimensiones (2D y 3D) para tratar de definir los mecanismos de la migración celular en lo más parecido a un microambiente tumoral donde se está en contacto con más proteínas además del quimioatrayente (Carey et al., 2014), por lo tanto, sería interesante analizar con ensayos de este tipo si la respuesta migratoria en las líneas celulares de etapas tardías de TNBC se mantiene nula o si existe un cambio, y, de igual manera si aumenta la respuesta migratoria observada hacia el SCF en las líneas de etapas tempranas.

En la última parte de este trabajo, se buscó evaluar una característica inherentes al proceso metastásico: el crecimiento independiente de anclaje, que se midió mediante la formación de colonias en agar suave (Hamburger & Salmon, 1977). Éste ensayo es que permite cuantificar la tumorigenicidad midiendo la habilidad de las células de proliferar y formar colonias en una suspensión semisólida de agar, lo que puede traducirse en la agresividad celular y la capacidad para formar nuevos tumores. En el medio de agar suave las células no transformadas no pueden duplicarse debido a la ausencia de un sustrato y comienzan un proceso de “anoikis”. En las células que sobreviven se da una activación de vías de señalización que conllevan a la transformación celular y pueden comenzar a formar colonias (Wang, 2004).

En los ensayos realizados de formación de colonias para las líneas DU4475 y MDA-MB-468 no se observó ninguna diferencia significativa al aplicar el SCF en comparación con células a las que no se les agregó el factor de crecimiento (figura 16). Sin embargo, para HCC70, HCC1937 y HCC1806 sí se observó una respuesta positiva en la formación de colonias por causa de la activación de c-Kit con SCF. Este aumento en la capacidad de formación e colonias mostró un patrón dosis dependiente, aunque una diferencia significativa contra el control sin tratamiento se observó a partir de 10 ng/ml de SCF (figura 17).

En las líneas tempranas de CMTN es donde se observó que c-Kit ejerce un papel importante en la progresión tumoral, aumentando la capacidad de formar colonias hasta en un 41% en HCC1937 y un 72% en HCC1806 con la concentración más alta de SCF, mientras que en las líneas de etapas avanzadas no existe un porcentaje de cambio en la capacidad de formar colonias en la presencia o ausencia de SCF, a pesar de que es en estas líneas donde se encuentra expresado en un mayor porcentaje de células c-Kit.

Mattox y Von Hoff mencionan que cada línea celular, independientemente del tipo de cáncer que sea, presenta una diferente capacidad de formación de colonias en agar. En otros estudios se ha reportado también que líneas celulares o células obtenidas de etapas avanzadas o sitios metastásicos muestran la mayor capacidad para crecer de manera independiente de anclaje, en comparación con aquellas líneas celulares que provienen de etapas iniciales (Mattox & Von Hoff, 1980; Nomura, Tashiro, & Hisamatsu, 1989; Sutherland, Mather, Carter, Cerise, & Kremenz, 1983). Los ensayos de formación de colonias que se presentan en este trabajo coinciden con la observación anterior, en la figura 18 se señala a las líneas celulares derivadas de sitios metastásicos (DU4475 en rojo y MDA-MB-468 en anaranjado) como aquéllas que muestran una mayor facilidad para formar colonias en el agar suave, mientras que en la línea celular HCC1806 (amarillo) derivada de una etapa temprana de CMTN son pocas las células que logran el proceso de transformación para adquirir la capacidad de formar colonias, sin embargo, éstas se ven favorecidas al ser estimuladas con SCF.

Esto sugiere que las células presentan perfiles de expresión génica distintos, así como diferentes vías de señalización activas que les permiten tener un crecimiento independiente de anclaje mucho mayor en las líneas derivadas de etapas metastásicas, por lo que este trabajo abre la perspectiva de analizar éstas vías de señalización en respuesta a la activación de c-Kit en las características asociadas al potencial metastásico como el crecimiento independiente de anclaje y la migración celular.

En resumen, los resultados de este trabajo soportan la idea de que el receptor c-Kit puede tener un papel relevante en etapas tempranas en la progresión de la enfermedad, ya que líneas celulares representativas de estos estadios de TNBC muestran una respuesta positiva y dosis dependiente al SCF, tanto en migración como en formación de colonias, además, permite el planteamiento de futuros análisis que ayuden a dilucidar los mecanismos moleculares por los cuales se da la migración y formación de colonias dependiente de la activación de c-Kit, por lo que un estudio más a fondo de estas interrogantes puede proponer al receptor c-Kit como un posible marcador de prognosis y blanco terapéutico en tumores de etapas tempranas de CMTN que sobreexpresen a este receptor.

9. CONCLUSIONES

El receptor c-Kit tiene una expresión diferencial en las líneas celulares de etapas avanzadas MDA-MB-468, intermedias HCC70, y tempranas como HCC1937 y HCC1806 de TNBC, siendo la expresión mayor en las etapas avanzadas, sin embargo, esta expresión diferencial no se encuentra relacionada con la respuesta a SCF. En la línea DU4475 a pesar de estar presente el mRNA y proteína de c-Kit, la exportación a la membrana celular es casi nula, ya que sólo el 0.93% de la población lo presenta.

En cuanto a las características evaluadas asociadas al potencial metastásico, la estimulación de c-Kit no tiene efectos en la viabilidad celular de las cinco líneas evaluadas. Tampoco se observa migración celular en las líneas representativas de etapas avanzadas como respuesta a la activación de c-Kit, sin embargo, en las líneas de etapas tempranas hay un efecto de migración celular a SCF dependiente de la dosis.

En el caso del crecimiento independiente de anclaje, de manera similar, en las líneas celulares de etapas tardías DU4475 y MDA-MB-468 no hay cambios en su capacidad de formar colonias, mientras que ésta aumenta por la activación de c-Kit en las líneas celulares de etapas tempranas HCC1806 y HCC1937, e intermedias como HCC70.

10. REFERENCIAS

- Abramson, V. G., Lehmann, B. D., Ballinger, T. J., & Pietenpol, J. A. (2015). Subtyping of triple-negative breast cancer: Implications for therapy. *Cancer*, *121*(1), 8–16. <http://doi.org/10.1002/cncr.28914>
- Anders, C. K., Zagar, T. M., & Carey, L. A. (2013). The management of early-stage and metastatic triple-negative breast cancer: A review. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *27*(4), 737–749. <http://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.05.003>
- Arnes, J. B., Brunet, J. S., Stefansson, I., Bégin, L. R., Wong, N., Chappuis, P. O., ... Foulkes, W. D. (2005). Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *11*(11), 4003–4011. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2064>
- Awada, A., Bozovic-Spasojevic, I., & Chow, L. (2012). New therapies in HER2-positive breast cancer: A major step towards a cure of the disease? *Cancer Treatment Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.01.00>
- Becker, S. (2015). A historic and scientific review of breast cancer: The next global healthcare challenge. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, *131*, S36–S39. <http://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.03.015>
- Bellone, G., Carbone, A., Sibona, N., Bosco, O., Tibaudi, D., Smirne, C., ... Rodeck, U. (2001). Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Research*, *61*(5), 2200–2206.
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Bhikoo, R., Srinivasa, S., Yu, T. C., Moss, D., & Hill, A. G. (2011). Systematic review of breast cancer biology in developing countries (part 1): Africa, the Middle East, Eastern Europe, Mexico, the Caribbean and South America. *Cancers*, *3*(2), 2358–2381. <http://doi.org/10.3390/cancers3022358>
- Blobe, G. C., Schiemann, W. P., & Lodish, H. F. (2000). Role of Transforming Growth Factor β in Human Disease. *The New England Journal of Medicine*, *342*(18), 1350–8. <http://doi.org/10.1056/NEJM200005043421807>
- Bose, S. (2015). Triple-negative Breast Carcinoma : Morphologic and Molecular Subtypes. *Adv Anat Pathol*, *22*(5), 306–313.
- Brody, J. R., & Kern, S. E. (2004). Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *BioTechniques*, *36*(2), 214–216.
- Burstein, M. D., Tsimelzon, A., Poage, G. M., Covington, K. R., Contreras, A., Fuqua, S. A. W., ... Brown, P. H. (2015). Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clinical Cancer Research*, *21*(7), 1688–1698. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0432>
- Calhoun, B. C., & Collins, L. C. (2015). Predictive markers in breast cancer: An update on ER and HER2 testing and reporting. *Seminars in Diagnostic Pathology*, *32*(5), 362–369. <http://doi.org/10.1053/j.semmp.2015.02.011>
- Carey, S. P., Rahman, A., Kraning-Rush, C. M., Romero, B., Somasegar, S., Torre, O. M.,

- ... Reinhart-King, C. a. (2014). Comparative mechanisms of cancer cell migration through 3D matrix and physiological microtracks. *AJP: Cell Physiology*, 308(6), C436-47. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00225.2014>
- Carolina, N., & Reserve, C. W. (2011). Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple Negative Breast Cancer. *The Oncologist*, 18(2), 1138–1143. <http://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0348>
- Chan, K. K., Matchett, K. B., McEnhill, P. M., Dakir, E. H., McMullin, M. F., El-Tanani, Y., ... El-Tanani, M. (2015). Protein deregulation associated with breast cancer metastasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26(4), 415–423. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.05.002>
- Chávarri-Guerra, Y., Villarreal-Garza, C., Liedke, P. E. R., Knaul, F., Mohar, A., Finkelstein, D. M., & Goss, P. E. (2012). Breast cancer in Mexico: A growing challenge to health and the health system. *The Lancet Oncology*. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70246-2](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70246-2)
- Cheang, M. C. U., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., ... Nielsen, T. O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1368–1376. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1658>
- Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(April), 309–315. <http://doi.org/10.1038/nrd773>
- De Abreu, F. B., Schwartz, G. N., Wells, W. A., & Tsongalis, G. J. (2014). Personalized therapy for breast cancer. *Clinical Genetics*, 86(1), 62–67. <http://doi.org/10.1111/cge.12381>
- Engebraaten, O., Vollan, H. K. M., & Børresen-Dale, A.-L. (2013). Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1064–74. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.05.033>
- Engelman, J. A. (2009). Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat. Rev. Cancer*, 9(8), 550–62. <http://doi.org/10.1038/nrc2664>
- Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698–707. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
- Fulford, L. G., Easton, D. F., Reis-Filho, J. S., Sofronis, A., Gillett, C. E., Lakhani, S. R., & Hanby, A. (2006). Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*, 49(1), 22–34. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02453.x>
- Fulford, L. G., Reis-Filho, J. S., Ryder, K., Jones, C., Gillett, C. E., Hanby, A., ... Lakhani, S. R. (2007). Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Research : BCR*, 9(1), R4. <http://doi.org/10.1186/bcr1636>
- Goh, J. N., Loo, S. Y., Datta, A., Siveen, K. S., Yap, W. N., Cai, W., ... Kumar, A. P. (2016). microRNAs in breast cancer: Regulatory roles governing the hallmarks of cancer. *Biological Reviews*, 91(2), 409–428. <http://doi.org/10.1111/brv.12176>
- González Jimenez, L. (2014). *El papel de los receptores para eritropoyetina (EPOR) y para el factor de crecimiento SCF (c-Kit) en cáncer de mama*. UNAM.
- Hamburger, A. W., & Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science, New Series*, 197(4302), 461–3. <http://doi.org/10.1126/science.560061>

- Han, Z. B., Ren, H., Zhao, H., Chi, Y., Chen, K., Zhou, B., ... Han, Z. C. (2008). Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α directly enhances the transcriptional activity of stem cell factor (SCF) in response to hypoxia and epidermal growth factor (EGF). *Carcinogenesis*, 29(10), 1853–1861. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgn066>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Treuter, E., ... Stro, A. (2007). Estrogen Receptors : How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiology Review*, 87, 905–931. <http://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>
- Hemmings, C., & Yip, D. (2014). The changing face of GIST: implications for pathologists. *Pathology*, 46(2), 141–8. <http://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000047>
- Hernández-Blanquisset, A., Touya, D., Strasser-Weippl, K., Ruiz, R., St. Louis, J., & Goss, P. (2016). Current and emerging therapies of HER2-positive metastatic breast cancer. *The Breast*, 29, 170–177. <http://doi.org/10.1016/j.breast.2016.07.026>
- Huang, H., Hu, M., Li, P., Lu, C., & Li, M. (2015). Mir-152 inhibits cell proliferation and colony formation of CD133(+) liver cancer stem cells by targeting KIT. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(2), 921–928. <http://doi.org/10.1007/s13277-014-2719-x>
- Igoucheva, O., & Alexeev, V. (2009). MicroRNA-dependent regulation of cKit in cutaneous melanoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(3), 790–794. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.152>
- INEGI. (2011). Proyecto de Información Básica de INEGI. Retrieved from <http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/prodyserv/iris3/seccion/proyinfbasica.cfm>
- Jansson, S., Bendahl, P. O., Grabau, D. A., Falck, A. K., Fernö, M., Aaltonen, K., & Rydén, L. (2014a). The three receptor tyrosine kinases c-KIT, VEGFR2 and PDGFR β , closely spaced at 4q12, show increased protein expression in triple-negative breast cancer. *PLoS ONE*, 9(7). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0102176>
- Jeon, S., Kim, N. H., Kim, J. Y., & Lee, A. Y. (2009). Stem cell factor induces ERM proteins phosphorylation through PI3K activation to mediate melanocyte proliferation and migration. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 22(1), 77–85. <http://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00519.x>
- Jeong, H. J., Na, H. J., Hong, S. H., & Kim, H. M. (2003). Inhibition of the stem cell factor-induced migration of mast cells by dexamethasone. *Endocrinology*, 144(9), 4080–4086. <http://doi.org/10.1210/en.2003-0115>
- Jiménez Sánchez, A. (2014). *Evaluación del efecto del Stem Cell Factor en el potencial metastásico de células de cáncer de prostata*. Tesis Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- Joneja, B., Chen, H. C., Seshasayee, D., Wrentmore, a L., & Wojchowski, D. M. (1997). Mechanisms of stem cell factor and erythropoietin proliferative co-signaling in FDC2-ER cells. *Blood*, 90(9), 3533–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9345037>
- Kashiwagi, S., Yashiro, M., Takashima, T., Aomatsu, N., Kawajiri, H., Ogawa, Y., ... Hirakawa, K. (2013). C-Kit expression as a prognostic molecular marker in patients with basal-like breast cancer. *British Journal of Surgery*, 100(4), 490–496. <http://doi.org/10.1002/bjs.9021>

- Kiener, H. P., Hofbauer, R., Tohidast-Akrad, M., Walchshofer, S., Redlich, K., Bitzan, P., ... Valent, P. (2000). Tumor necrosis factor α promotes the expression of stem cell factor in synovial fibroblasts and their capacity to induce mast cell chemotaxis. *Arthritis and Rheumatism*, 43(1), 164–174. [http://doi.org/10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<164::AID-ANR21>3.0.CO;2-Z](http://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<164::AID-ANR21>3.0.CO;2-Z)
- Kishen, S., Pillai, K., Tay, A., Nair, S., Leong, C.-O., Kanapathy Pillai, S. K., ... Leong, C.-O. (2012). Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women. *BMC Clinical Pathology*, 12(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1472-6890-12-18>
- Koyasu, S. (2003). The role of PI3K in immune cells. *Nature Immunology*, 4(4), 313–319. <http://doi.org/10.1038/ni0403-313>
- Langley, K. E., Bennett, L. G., Wypych, J., Yancik, S. a, Liu, X. D., Westcott, K. R., ... Zsebo, K. M. (1993). Soluble stem cell factor in human serum. *Blood*, 81(3), 656–660.
- Lara-Medina, F., Pérez-Sánchez, V., Saavedra-Pérez, D., Blake-Cerda, M., Arce, C., Motola-Kuba, D., ... Arrieta, Ó. (2011). Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: High prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity. *Cancer*, 117(16), 3658–3669. <http://doi.org/10.1002/cncr.25961>
- Lehmann, B. D. B., Bauer, J. a J., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, a B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. a. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750–2767. <http://doi.org/10.1172/JCI45014DS1>
- Lehmann, B. D., & Pietenpol, J. A. (2015). Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 24 Suppl 2, S36-40. <http://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.009>
- Lennartsson, J., Blume-Jensen, P., Hermanson, M., Pontén, E., Carlberg, M., & Rönstrand, L. (1999). Phosphorylation of Shc by Src family kinases is necessary for stem cell factor receptor/c-kit mediated activation of the Ras/MAP kinase pathway and c-fos induction. *Oncogene*, 18(40), 5546–5553. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1202929>
- Lennartsson, J., & Rönstrand, L. (2012a). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiological Reviews*, 92(4), 1619–49. <http://doi.org/10.1152/physrev.00046.2011>
- Lev, S., Blechman, J. M., Givol, D., & Yarden, Y. (1994). Steel factor and c-kit protooncogene: genetic lessons in signal transduction. *Crit Rev Oncog*, 5(2–3), 141–168. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531500>
- Liang, J., Wu, Y. L., Chen, B. J., Zhang, W., Tanaka, Y., & Sugiyama, H. (2013). The C-Kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 9(5), 435–443. <http://doi.org/10.7150/ijbs.6087>
- Makretsov, N. A., Huntsman, D. G., Nielsen, T. O., Yorida, E., Peacock, M., Cheang, M. C. U., ... Gilks, C. B. (2004). Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(18 I), 6143–6151. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0429>
- Matsumoto, K., Moriuchi, T., Koji, T., & Nakane, P. K. (1987). Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *The EMBO Journal*, 6(3), 637–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=553445&tool=pmcentrez&ren>

dertype=abstract

- Matthews, D. J., & Gerritsen, M. E. (2015). *Targeting Protein Kinases for Cancer Therapy. The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Mattox, D. E., & Von Hoff, D. D. (1980). Culture of human head and neck cancer stem cells using soft agar. *Archives of Otolaryngology (Chicago, Ill. : 1960)*, 106(11), 672–674.
- McAllister, S. S., Gifford, A. M., Greiner, A. L., Kelleher, S. P., Saelzler, M. P., Ince, T. A., ... Weinberg, R. A. (2008). Systemic Endocrine Instigation of Indolent Tumor Growth Requires Osteopontin. *Cell*, 133(6), 994–1005. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.045>
- McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P., & Freedman, G. M. (2016). Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *Journal of Nuclear Medicine : Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 57 Suppl 1(Supplement_1), 9S–16S. <http://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>
- Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., & Frenette, P. S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452(7186), 442–447. <http://doi.org/10.1038/nature06685>
- Minn, A. J., Gupta, G. P., Siegel, P. M., Bos, P. D., Shu, W., Giri, D. D., ... Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*, 436(July), 518–524. <http://doi.org/10.1038/nature03799>
- Mori, S., Chang, J. T., Andrechek, E. R., Matsumura, N., Baba, T., Yao, G., ... Nevins, J. R. (2009). Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene*, 28(31), 2796–805. <http://doi.org/10.1038/onc.2009.139>
- Nomura, Y., Tashiro, H., & Hisamatsu, K. (1989). In Vitro Clonogenic Growth and Metastatic Potential of Human Operable Breast Cancer. *Cancer Research*, 49(19), 5288–5293.
- Olsson, N., Rak, S., & Nilsson, G. (2000). Demonstration of mast cell chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid collected from asthmatic patients before and during pollen season. *J Allergy Clin Immunol*, 105(3), 455–461. <http://doi.org/10.1067/mai.2000.104380>
- Oosterhuis, J. W., & Looijenga, L. H. J. (2005). Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nature Reviews. Cancer*, 5(3), 210–222. <http://doi.org/10.1038/nrc1568>
- Paronetto, M. P., Farini, D., Sammarco, I., Maturo, G., Vespasiani, G., Geremia, R., ... Sette, C. (2004). Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *The American Journal of Pathology*, 164(4), 1243–1251. [http://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63212-9](http://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63212-9)
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. a, ... Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <http://doi.org/10.1038/35021093>
- Pietsch, T., Kyas, U., Steffens, U., Yakistan, E., Hadam, M. R., Ludwig, W. D., ... Welte, K. (1992). Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood*, 80(5), 1199–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1381238>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galv??n, P., Fern??ndez, A., Gaba, L., ... Mu??oz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*, 24, S26–S35. <http://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>

- Previati, M., Manfrini, M., Galasso, M., Zerbinati, C., Palatini, J., Gasparini, P., & Volinia, S. (2013). Next generation analysis of breast cancer genomes for precision medicine. *Cancer Letters*, 339(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.018>
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S., & Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics*, 33(1), 49–54. <http://doi.org/10.1038/ng1060>
- Reber, L., Da Silva, C. A., & Frossard, N. (2006). Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *European Journal of Pharmacology*, 533(1–3), 327–340. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.067>
- Reyes, C., Jorda, M., & Gomez-Fernandez, C. (2013). Salivary Gland – like Tumors of the Breast Express Basal-type Immunohistochemical Markers. *Appl Immunohistochem*, 21(4), 283–286.
- Rivenbark, A. G., O'Connor, S. M., & Coleman, W. B. (2013). Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: Challenges for personalized medicine. *American Journal of Pathology*, 183(4), 1113–1124. <http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.08.002>
- Roberts, R., & Govender, D. (2015). Gene of the month: KIT. *Journal of Clinical Pathology*, 68(9), 671–4. <http://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-203207>
- Roskoski, R. (2005). Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(3), 1307–15. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.150>
- Rossi, P. (2013). Transcriptional control of KIT gene expression during germ cell development. *The International Journal of Developmental Biology*, 57(2–4), 179–84. <http://doi.org/10.1387/ijdb.130014pr>
- Rossi, P., Marziali, G., Albanesi, C., Charlesworth, A., Geremia, R., & Sorrentino, V. (1992). A novel c-kit transcript, potentially encoding a truncated receptor, originates within a kit gene intron in mouse spermatids. *Developmental Biology*, 152(1), 203–207. [http://doi.org/10.1016/0012-1606\(92\)90172-D](http://doi.org/10.1016/0012-1606(92)90172-D)
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. a. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491. <http://doi.org/10.1126/science.2448875>
- Samayawardhena, L. A., Hu, J., Stein, P. L., & Craig, A. W. B. (2006). Fyn kinase acts upstream of Shp2 and p38 mitogen-activated protein kinase to promote chemotaxis of mast cells towards stem cell factor. *Cellular Signalling*, 18(9), 1447–1454. <http://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.11.005>
- Sangle, N. A., & Perkins, S. L. (2011). Core-binding factor acute myeloid leukemia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(11), 1504–1509. <http://doi.org/10.5858/arpa.2010-0482-RS>
- Schonk, D. M., Kuijpers, H. J. H., van Drunen, E., van Dalen, C. H., Geurts van Kessel, A. H. M., Verheijen, R., & Ramaekers, F. C. S. (1989). Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Human Genetics*, 83(3), 297–299. <http://doi.org/10.1007/BF00285178>
- Shapira, I., Lee, A., Vora, R., & Budman, D. R. (2013). P53 mutations in triple negative breast cancer upregulate endosomal recycling of epidermal growth factor receptor (EGFR) increasing its oncogenic potency. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(2), 284–292. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.05.003>

- Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*, *23*(48), 8017–23. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1208159>
- Spritz, R. A., Holmes, S. A., Itin, P., & Kuster, W. (1993). Novel Mutations of the KIT (Mast/Stem Cell Growth Factor Receptor) Proto-Oncogene in Human Piebaldism. *Genetics*, *88*, 22–25. <http://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12358440>
- Stefansson, O. A., Jonasson, J. G., Olafsdottir, K., Hilmarsdottir, H., Olafsdottir, G., Esteller, M., ... Eyfjord, J. E. (2011). CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics*, *6*(5), 638–649. <http://doi.org/10.4161/epi.6.5.15667>
- Sun, J., Pedersen, M., & Rönstrand, L. (2008). Gab2 is involved in differential phosphoinositide 3-kinase signaling by two splice forms of c-Kit. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(41), 27444–27451. <http://doi.org/10.1074/jbc.M709703200>
- Sutherland, C. M., Mather, F. J., Carter, R. D., Cerise, E. J., & Krementz, E. T. (1983). Breast cancer as analyzed by the human tumor stem cell assay. *Surgery*, *94*(2), 370–375. [http://doi.org/0039-6060\(83\)90115-0](http://doi.org/0039-6060(83)90115-0) [pii]
- Suyama, M., & Ariyoshi, Y. (1991). Preferential Expression of c-kit Protooncogene Transcripts in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, *51*(9), 2416–2419. [http://doi.org/10.1016/0169-5002\(92\)90235-C](http://doi.org/10.1016/0169-5002(92)90235-C)
- Szałek, E., Karbownik, A., Sobanska, K., Połom, W., Grabowski, T., Wolc, A., ... Grzeskowiak, E. (2014). The influence of the time-of-day administration of the drug on the pharmacokinetics of sunitinib in rabbits. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *18*(16), 2393–2399. <http://doi.org/10.1007/978-3-642-01222-8>
- Taherian-Fard, A., Srihari, S., & Ragan, M. A. (2014). Breast cancer classification: Linking molecular mechanisms to disease prognosis. *Briefings in Bioinformatics*, *16*(3), 461–474. <http://doi.org/10.1093/bib/bbu020>
- Takahashi, T., & Shibuya, M. (1997). The 230 kDa mature form of KDR/Fik-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, *14*(17), 2079–2089. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1201047>
- Talaiezadeh, A., Jazayeri, S. N., & Nateghi, J. (2012). Expression of c-kit protein in cancer vs. normal breast tissue. *Wspolczesna Onkologia*, *16*(4), 306–309. <http://doi.org/10.5114/wo.2012.30058>
- Telli, M. L., Jensen, K. C., Vinayak, S., Kurian, A. W., Lipson, J. A., Flaherty, P. J., ... Ford, J. M. (2015). Phase II study of gemcitabine, carboplatin, and iniparib as neoadjuvant therapy for triple-negative and BRCA1/2 mutation-associated breast cancer with assessment of a tumor-based measure of genomic instability: PrECOG 0105. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(17), 1895–1901. <http://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0085>
- Teschendorff, A. E., Miremadi, A., Pinder, S. E., Ellis, I. O., & Caldas, C. (2007). An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biology*, *8*(8), R157. <http://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r157>
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(6), 442–454. <http://doi.org/10.1038/nrc822>
- Timokhina, I., Kissel, H., Stella, G., & Besmer, P. (1998). Kit signaling through PI 3-kinase

- and Src kinase pathways: An essential role for Rac1 and JNK activation in mast cell proliferation. *EMBO Journal*, 17(21), 6250–6262. <http://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6250>
- Tozluoğlu, M., Tournier, A. L., Jenkins, R. P., Hooper, S., Bates, P. a., & Sahai, E. (2013). Matrix geometry determines optimal cancer cell migration strategy and modulates response to interventions. *Nature Cell Biology*, 15(7), 1–14. <http://doi.org/10.1038/ncb2775>
- Trieselmann, N. Z., Soboloff, J., & Berger, S. A. (2003). Mast cells stimulated by membrane-bound, but not soluble, steel factor are dependent on phospholipase C activation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(4), 759–766. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-2349-8>
- Turner, N., Moretti, E., Siclari, O., Migliaccio, I., Santarpia, L., D'Incalci, M., ... Di Leo, A. (2013). Targeting triple negative breast cancer: Is p53 the answer? *Cancer Treatment Reviews*, 39(5), 541–550. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.12.001>
- Ulivi, P., Zoli, W., Medri, L., Amadori, D., Saragoni, L., Barbanti, F., ... Silvestrini, R. (2004). c-kit and SCF expression in normal and tumor breast tissue, 33–42.
- Vaca-Paniagua, F., Alvarez-Gomez, R. M., Maldonado-Martinez, H. A., Perez-Plasencia, C., Fragoso-Ontiveros, V., Lasa-Gonsebatt, F., ... Olivier, M. (2015). Revealing the molecular portrait of triple negative breast tumors in an understudied population through omics analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *PLoS ONE*, 10(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0126762>
- Veer, V. L., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., ... Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530–536. <http://doi.org/http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/415530a>
- Vennapusa, B., Oman, S. A., Parasher, G., & Cerilli, L. A. (2010). C-kit-positive gastric metastasis of lobular carcinoma of the breast masquerading as gastrointestinal stromal tumor. *Breast Cancer*, 17(4), 303–305. <http://doi.org/10.1007/s12282-009-0116-x>
- Villarreal-Garza, C., Weitzel, J. N., Llacuachaqui, M., Sifuentes, E., Magallanes-Hoyos, M. C., Gallardo, L., ... Narod, S. A. (2015). The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(2), 389–394. <http://doi.org/10.1007/s10549-015-3312-8>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10(8), 789–799. <http://doi.org/10.1038/nm1087>
- Vollebergh, M. A., Lips, E. H., Nederlof, P. M., Wessels, L. F. A., Schmidt, M. K., van Beers, E. H., ... Linn, S. C. (2011). An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Annals of Oncology*, 22(7), 1561–1570. <http://doi.org/10.1093/annonc/mdq624>
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, 465(1), 1–14. <http://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>
- Wang, L.-H. (2004). Molecular signaling regulating anchorage-independent growth of cancer cells. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 71(6), 361–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15592654>
- Weigelt, B., Peterse, J. L., & van 't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers

and models. *Nature Reviews. Cancer*, 5(August), 591–602.
<http://doi.org/10.1038/nrc1670>

Went, P. T., Dirnhofer, S., Bundi, M., Mirlacher, M., Schraml, P., Mangialaio, S., ... Sauter, G. (2004). Prevalence of KIT expression in human tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 22(22), 4514–4522. <http://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.125>

WHO. (2012). Globocan. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

Woodman, S. E., & Davies, M. A. (2010). Targeting KIT in melanoma: A paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochemical Pharmacology*.
<http://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.04.032>

Wypych, J., Bennett, L. G., Schwartz, M. G., Clogston, C. L., Lu, H. S., Broudy, V. C., ... Langley, K. E. (1995). Soluble kit receptor in human serum. *Blood*, 85(1), 66–73.
Retrieved from
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7528574
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7528574>

Yang, S. X., Polley, E., & Lipkowitz, S. (2016). New insights on PI3K/AKT pathway alterations and clinical outcomes in breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 45, 87–96. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.03.004>

Yasuda, A., Sawai, H., Takahashi, H., Ochi, N., Matsuo, Y., Funahashi, H., ... Manabe, T. (2006). The stem cell factor/c-kit receptor pathway enhances proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer*, 5, 46. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-5-46>

Yasuda, A., Sawai, H., Takahashi, H., Ochi, N., Matsuo, Y., Funahashi, H., ... Manabe, T. (2007). 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(9), 2292–2300. <http://doi.org/10.1007/s10620-007-9759-7>

Yasuda, T., & Kurosaki, T. (2008). Regulation of lymphocyte fate by Ras/ERK signals. *Cell Cycle*. <http://doi.org/10.4161/cc.7.23.7103>